

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

ANGÉLICA HOLLUNDER KLIPPEL

**Determinação estrutural e busca por inibidores da
enzima desoxi-hipusina sintase de organismos
eucarióticos causadores de doenças negligenciadas**

Araraquara-SP
2023

ANGÉLICA HOLLUNDER KLIPPEL

**Determinação estrutural e busca por inibidores da
enzima desoxi-hipusina sintase de organismos
eucarióticos causadores de doenças negligenciadas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara-SP
2023

K169d Klippel, Angélica Hollunder.
Determinação estrutural e busca por inibidores da enzima desoxi-
hipusina sintase de organismos eucarióticos causadores de doenças
negligenciadas / Angélica Hollunder Klippel. – Araraquara: [S.n.], 2023.
230 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita
Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Biologia Molecular.

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.

1. eIF5A. 2. Desoxi-hipusina sintase. 3. Doenças tropicais negligenciadas.
4. Leishmaniose. 5. Descoberta de fármacos. I. Zanelli, Cleslei Fernando,
orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Determinação estrutural e busca por inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase de organismos eucarióticos causadores de doenças negligenciadas

AUTORA: ANGÉLICA HOLLUNDER KLIPPEL

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de conhecimento: Biologia Molecular pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO (Participação Virtual)
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física do Câmpus de São Carlos da Universidade de São Paulo - USP

Prof. Associado SANDRO ROBERTO MARANA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica / Instituto de Química do Câmpus de São Carlos da Universidade de São Paulo - USP

Prof.^a Dr.^a PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira do Câmpus de Registro da Unesp

Araraquara, 27 de fevereiro de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria para superar as dificuldades.

Aos meus pais (Deoclério e Tereza), irmãs (Andréia e Valéria) e cunhados (Charles e Luciano), pelo afeto, apoio, ensinamentos e pela compreensão nos muitos momentos importantes nos quais estava ausente por causa das obrigações acadêmicas. Sem vocês não seria nada!!!

Ao Matthew, meu querido companheiro, por todo amor, suporte, atenção e por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu duvidei.

Ao restante da família e amigos, por estarem presentes nos momentos felizes e principalmente nos não tão felizes.

A todos os mestres que, ao longo de toda a minha formação, colaboraram para a construção dos meus conhecimentos.

Ao meu orientador de doutorado, o Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, pela oportunidade de executar este trabalho, pela confiança depositada em mim, por todo suporte e por proporcionar inúmeros momentos de discussão que foram fundamentais para a elaboração desta tese.

À Suélen, pela grande parceria científica durante a execução deste trabalho e também pela amizade que construímos ao longo do processo. Muito obrigada por ter me acolhido em sua casa e me dado todo suporte quando eu mais precisei!!!

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos, Ana, Bianca, Fernanda, Keylla, Luis, Marco, Mariana, Maria Olívia, Naira, Natália, Suélen, Tatiana e Weslei, cuja influência não se limitou aos experimentos e reuniões científicas. Muito obrigada por fazer essa jornada ser mais leve!!!

Ao professor Dr. Wesley C. Van Voorhis, pela oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório na Universidade de Washington e pela participação nas discussões científicas. Sua criatividade, conhecimento e paixão pela ciência serão sempre uma fonte de inspiração.

Aos queridos colaboradores do laboratório do Dr. Van Voorhis, Justin, Kayode, Logan, Lynn, Matt, Roger e Ryan, pela ótima receptividade em Seattle, pelo ambiente de trabalho proporcionado e por contribuírem com discussões produtivas.

Aos pesquisadores principais do Centro de Química Medicinal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Dra. Katlin Brauer Massirer, Dr. Mário Henrique

Bengtson e Dr. Rafael Lemos Miguez Couñago, pela colaboração imprescindível durante o meu doutorado.

Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Química Medicinal da UNICAMP, André, Angela, Bruno, Caio, Carla, Carolina, Claudia, Erika, Fulvia, Gabriel, Gabriela, Gabriele, Gustavo, Heloisa, Israel, Ítalo, Jessica, Jon, Lucas, Luiz, Marcella, Micael, Nathalia, Paula, Paulo, Priscila, Rebeka, Renan, Ricardo, Sophia, Stanley, Taniris e Vitor, por todo suporte científico e pelos momentos de descontração com boas risadas. Aos professores Dr. Fernando Rogério Pavan, Dr. Norival Alves Santos Filho e Dr. Rafael Victório Carvalho Guido, pela participação e contribuição durante o exame geral de qualificação deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora da defesa do doutorado, Dra. Patrícia Soares Santiago, Dr. Rafael Victório Carvalho Guido e Dr. Sandro Roberto Marana, por terem se disponibilizado a contribuir com o aprimoramento deste trabalho. Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP em Araraquara, ao Centro de Química Medicinal da UNICAMP e ao Centro de Doenças Infecciosas Emergentes e Reemergentes (CERID) da Universidade de Washington, pelo apoio institucional de infraestrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas concedidas para realização do projeto no país (processo nº 2018/16672-1) e no exterior (processo nº 2019/24812-0); pelo auxílio à pesquisa – Temático “INCT 2014: Centro de Química Medicinal de Acesso Aberto”, processo nº 2014/50897-0; e pelo auxílio à pesquisa - Parceria para Inovação Tecnológica – PITE “Centro de Biologia Química de Proteínas Quinases: alavancando desenvolvimento de fármacos através de pesquisa de acesso aberto”, processo nº 2013/50724-5.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo nº 88887.161266/2017-00.

O presente trabalho também foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com suporte do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico (PADC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP em Araraquara.

Muito obrigada!!!

“Não se pode esperar construir um mundo melhor sem aprimorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade, sendo nosso dever particular ajudar aqueles a quem possamos ser mais úteis”.

(Marie Curie)

RESUMO

O fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é altamente conservado em eucariotos e essencial para a proliferação celular. eIF5A é modificado pós-traducionalmente através de uma reação muito específica, chamada hipusinação, a qual é necessária para sua função. A hipusinação ocorre em duas etapas, envolvendo as enzimas desoxi-hipusina sintase (DHPS) e desoxi-hipusina hidroxilase (DOOH). Considerando a essencialidade da hipusinação e de eIF5A, a DHPS e a DOOH correspondem a alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos para inibir a proliferação de vários organismos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é determinar a estrutura tridimensional e buscar inibidores para as DHPSs dos seguintes organismos causadores de doenças tropicais negligenciadas: *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), *Histoplasma capsulatum* (Hc), *Brugia malayi* (Bm) e *Leishmania sp.* (duas isoformas: A e B). Para tanto, foram padronizadas as condições de clonagem, produção em *Escherichia coli* e purificação dessas proteínas. Isso possibilitou o estabelecimento de um ensaio bioquímico fácil de ser miniaturizado para a HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA, e a determinação da estrutura cristalográfica da BmDHPSA e da HcDHPSA. No entanto, essas estruturas apresentam uma arquitetura muito similar à da enzima humana (HsDHPS), o que dificulta o desenvolvimento de inibidores seletivos para as DHPSs desses patógenos. Portanto, novos esforços foram direcionados para a obtenção das *Leishmania sp.* DHPSs na forma solúvel a partir de *E. coli*, visto que essas enzimas provavelmente formam um heterocomplexo, diferentemente da HsDHPS. Após combinar uma série de estratégias, as DHPSs de *L. donovani* (LdDHPSAB) e de *L. major* (LmDHPSAB) foram produzidas na forma solúvel e ativa a partir de *E. coli*, o que permitiu a realização de um *high-throughput drug screening in vitro* com a LdDHPSAB, empregando a reação parcial das DHPSs acoplada ao ensaio NAD⁺/NADH-Glo™. Dos 26771 compostos testados inicialmente a 10 µM, 44 compostos (*hits*) inibiram a atividade da LdDHPSAB em mais de 60%. Uma triagem secundária confirmou que 24 (57%) dos *hits* exibiram efeitos inibitórios consistentes (maior do que 60%) sobre a atividade da LdDHPSAB. Depois de excluir os *hits* que também inibiram a atividade das enzimas do ensaio NAD⁺/NADH-Glo™, os 13 compostos restantes foram analisados quanto à concentração-resposta empregando o mesmo ensaio acoplado. Nove desses 13 compostos apresentaram um IC₅₀ contra a atividade da LdDHPSAB na faixa micromolar baixa. Dentre esses, os compostos MMV1674024 e MMV904563 apresentaram um maior potencial para futuras otimizações com o intuito de melhorar a potência de inibição sobre a atividade das *Leishmania sp.* DHPSs. Além disso, os dados de inibição *in vitro* sugerem que a inibição das *Leishmania sp.* DHPSs sem afetar a atividade da HsDHPS corresponde a uma tarefa viável, confirmando a hipótese de que a DHPS é um alvo interessante para ser explorado em *Leishmania sp.* Ainda, empregando o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH, foi possível determinar que o composto MMV1674024 exerce uma inibição sobre a atividade da LmDHPSAB do tipo mista em relação ao NAD⁺ e à espermidina. Finalmente, foram obtidos cristais para a LmDHPSAB preparada na presença de NAD⁺ e do composto MMV1674024. Entretanto, esses cristais não difrataram durante a coleta de dados de difração por raios X, mesmo após tentativas de otimização das condições de cristalização.

Palavras-chave: eIF5A; desoxi-hipusina sintase; doenças tropicais negligenciadas; leishmaniose; descoberta de fármacos.

ABSTRACT

The eukaryotic translation factor 5A (eIF5A) is highly conserved in eukaryotes and is essential for cell proliferation. eIF5A undergoes an extremely specific post-translational modification, called hypusination, required for eIF5A function. Hypusination occurs in two steps that involve the enzymes deoxyhypusine synthase (DHPS) and deoxyhypusine hydroxylase (DOOH). Considering the essentiality of hypusination for eIF5A function, DHPS and DOOH are promising targets for developing new drugs to stop cell proliferation in various organisms. In this context, the aim of this work is to determine the three-dimensional structure and search for DHPS inhibitors of the following organisms that cause neglected tropical diseases: *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), *Histoplasma capsulatum* (Hc), *Brugia malayi* (Bm) and *Leishmania sp.* (two isoforms: A and B). For this purpose, the conditions for cloning, production in *Escherichia coli* and purification of these proteins were established. This enabled the adaptation of an easy-to-miniaturize biochemical assay for HcDHPSA, BmDHPSA and PbDHPSA, and the determination of the crystallographic structure of BmDHPSA and HcDHPSA. However, these structures present a very similar architecture to the human enzyme (HsDHPS), which hinders the development of selective inhibitors for the DHPs from those pathogens. Therefore, all the efforts were directed towards obtaining *Leishmania sp.* DHPs in a soluble form from *E. coli*, as these enzymes probably form a heterocomplex, unlike HsDHPS. After combining a series of strategies, it was possible to produce recombinant *L. donovani* (LdDHPSAB) and *L. major* (LmDHPSAB) DHPs in a soluble and active form from *E. coli*. A high-throughput screening assay was established *in vitro* with the LdDHPSAB, in which the LdDHPSAB activity was quantified using NAD⁺/NADH-Glo™ assay coupled with the partial reaction of the DHPs. Of the 26771 compounds initially screened at 10 µM, 44 compounds (hits) inhibited LdDHPSAB activity by over 60%. The secondary screening confirmed that 24 (57%) hits exhibited consistent inhibitory effects (inhibition above 60%) on LdDHPSAB activity. Then, 11 hit compounds that also inhibited the enzymes from the NAD⁺/NADH-Glo™ assay were excluded from further analysis. The remaining 13 hit compounds were analyzed for dose-response using the same coupled assay. Nine out of those 13 compounds presented IC₅₀ against LdDHPSAB in the lower micromolar range. Among these, the compounds MMV1674024 and MMV904563 showed increased potential for future optimizations to improve the inhibition potency against *Leishmania sp.* DHPs activity. Furthermore, the *in vitro* data suggested that inhibiting *Leishmania sp.* DHPS targets without inhibiting the human counterpart is a feasible task, confirming the hypothesis that DHPS is an interesting target to be explored in *Leishmania sp.* Also, using the assay based on the detection of NADH fluorescence, it was possible to determine that the compound MMV1674024 exerts a mixed-type inhibition on the activity of the LmDHPSAB in relation to NAD⁺ and spermidine. Finally, crystals were obtained for LmDHPSAB prepared in the presence of NAD⁺ and the compound MMV1674024. However, these crystals did not diffract during x-ray diffraction data collection, even after attempts to optimize the crystallization conditions.

Keywords: eIF5A; deoxyhypusine synthase; neglected tropical diseases; leishmaniasis; drug discovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da tradução em eucariotos	22
Figura 2. Papéis de eIF5A durante a síntese proteica.....	25
Figura 3. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A.....	27
Figura 4. Modelo para a ação de eIF5A hipusinado no ribossomo.....	28
Figura 5. Mecanismo proposto para a reação da DHPS	31
Figura 6. Estrutura da DHPS humana ligada ao NAD ⁺ e ao GC7.....	36
Figura 7. Alinhamento múltiplo de sequências baseado na estrutura da BmDHPS, HsDHPS, LmDHPSB, LmDHPSA, TbDHPSp e TbDHPSc.....	36
Figura 8. Estrutura da DHPS de <i>T. brucei</i> (TbDHPSc:DHPSp)	38
Figura 9. O biorreator LEX cultiva até 24 culturas individuais de 2 L.....	64
Figura 10. SDS-PAGE das frações purificadas obtidas no teste de expressão em pequena escala	86
Figura 11. Purificação das construções PbDHPSA-cb001 e PbDHPSA-cb002 em larga escala	88
Figura 12. Purificação das construções HcDHPSA-cb001 e HcDHPSA-cb002 em larga escala	89
Figura 13. Purificação em larga escala das construções BmDHPSA-cb001 e BmDHPSA-cb002 em larga escala.....	90
Figura 14. Análise por espectrometria de massa intacta das DHPSs purificadas a partir de culturas em larga escala	91
Figura 15. Reação parcial catalisada pelas DHPSs	93
Figura 16. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da HcDHPSA-cb001 e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	96
Figura 17. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da BmDHPSA-cb001 e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	97
Figura 18. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PbDHPSA-cb001 e determinação do IC ₅₀ para o GC7.....	98
Figura 19. Cristais obtidos a partir das DHPSs <i>full-length</i> de <i>H. Capsulatum</i> e <i>B. malayi</i> na presença de NAD ⁺ e GC7	99
Figura 20. Estrutura da BmDHPSA-cb001 ligada ao cofator NAD ⁺	101
Figura 21. Contatos interprotoméricos do homotetrâmero da BmDHPSA-cb001	102
Figura 22. Determinação do estado oligomérico da BmDHPSA-cb001 em solução.....	103
Figura 23. Detalhes do sítio ativo da BmDHPSA-cb001.....	105
Figura 24. Estrutura da HcDHPSA-cb001	109
Figura 25. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de co-expressão em pequena escala da LmDHPSA-cb001 e LmDHPSB-cb001 nas linhagens de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-R3-pRARE2 e BL21-pGKJE8 (GroES-EL)	113
Figura 26. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão com a LmDHPSA com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i> em pequena escala.....	114
Figura 27. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão com a LmDHPSB com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i> em pequena escala.....	115
Figura 28. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de co-expressão da LmDHPSA-cb007 e da LmDHPSB-cb005 com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i> na linhagem BL21 – pGKJE8 (GroES-EL) em pequena escala.....	116
Figura 29. Purificação da LmDHPSA-cb007 com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i> em larga escala	117

Figura 30. Purificação da LmDHPSB-cb005 com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i> em larga escala.	118
Figura 31. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão em pequena escala com as LmDHPSs clonadas em pNIC-CTH0, pNIC-ZB e pSUMO-LIC.	128
Figura 32. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão em pequena escala com as <i>Leishmania sp.</i> DHPSs <i>full-length</i> clonadas nos vetores AVA.	130
Figura 33. Purificação em larga escala da LdDHPSA-cb002	132
Figura 34. Purificação em larga escala da LdDHPSB-cb002.	133
Figura 35. Purificação em larga escala da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 em combinação	135
Figura 36. Purificação em larga escala da LmDHPSA-cb018 e da LmDHPSB-cb010 em combinação	137
Figura 37. Purificação em larga escala da HsDHPS.	139
Figura 38. Etapa extra de purificação por cromatografia de troca iônica com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002.	140
Figura 39. Ensaio de atividade enzimática <i>in vitro</i> com as diferentes amostras obtidas com a purificação das duas isoformas da LdDHPS	143
Figura 40. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH empregando a reação parcial da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002.	146
Figura 41. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH empregando a reação parcial da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010	147
Figura 42. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH empregando a reação parcial da HsDHPS.	148
Figura 43. <i>High-throughput screening in vitro</i> primário empregando o ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002.	150
Figura 44. <i>High-throughput screening in vitro</i> primário empregando a reação parcial da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 acoplada com o ensaio NAD ⁺ /NADH-Glo™	154
Figura 45. Grupos funcionais compartilhados pelos <i>hits</i> da coleção de pequenas moléculas MMV12K BF3	164
Figura 46. Grupos funcionais compartilhados por alguns <i>hits</i> da coleção de pequenas moléculas MMV14K HGL.	165
Figura 47. SDS-PAGE das frações obtidas a partir do teste de expressão em pequena escala com as DHPSs de <i>Leishmania sp.</i>	176
Figura 48. Purificação em larga escala da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 em combinação	178
Figura 49. Purificação em larga escala da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 em combinação	181
Figura 50. Purificação em larga escala das LmDHPSs utilizando o detergente CHAPS no tampão de lise	182
Figura 51. Purificação em larga escala da HsDHPS	184
Figura 52. Análise de espectrometria de massa intacta das DHPSs purificadas a partir de culturas em larga escala	185
Figura 53. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010	188
Figura 54. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial da HsDHPS.	189

Figura 55. Concentração-resposta dos compostos MMV1674024 e MMV1732934 contra a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS utilizando o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH.....	190
Figura 56. Efeito do GC7 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação de espermidina.....	192
Figura 57. Efeito do composto MMV1674024 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação de espermidina.....	194
Figura 58. Efeito do composto MMV1674024 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação do NAD ⁺	195
Figura 59. Cristais obtidos para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 na presença de NAD ⁺ e MMV1674024	199

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>E. coli</i> empregadas neste trabalho	44
Tabela 2. Plasmídeos empregados neste trabalho	44
Tabela 3. Oligonucleotídeos, plasmídeos e DNA molde para a PCR utilizados na clonagem das DHPs de interesse.....	46
Tabela 4. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos com a HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA	69
Tabela 5. Dados cristalográficos e estatística de refinamento para a estrutura da BmDHPSA	72
Tabela 6. Dados cristalográficos e estatística de refinamento para a estrutura da HcDHPSA	73
Tabela 7. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos com a LdDHPSAB, LmDHPSAB e HsDHPS	76
Tabela 8. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos com a LmDHPSAB e a HsDHPS	79
Tabela 9. Informações detalhadas sobre as construções das DHPs alvo deste estudo.....	83
Tabela 10. Condições empregadas no teste de expressão em pequena escala para as duas isoformas da LmDHPS	111
Tabela 11. Informações detalhadas sobre as construções das LmDHPSs clonadas em pNIC-CTH0, pSUMO-LIC e pNIC-Zb.....	121
Tabela 12. Informações detalhadas sobre as construções das Leishmania sp. DHPs clonadas em vetores AVA.....	124
Tabela 13. Valores de IC ₅₀ para o GC7 contra a LdDHPS e a HsDHPS	152
Tabela 14. Estruturas dos hits da coleção MMV12K BF3 confirmados e seus valores de IC ₅₀	157
Tabela 15. Estruturas dos <i>hits</i> da coleção MMV14K HGL confirmados e seus valores de IC ₅₀	159
Tabela 16. Parâmetros clássicos da química medicinal calculados pelo software DataWarrior para os hits obtidos com o HTS	169

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
α	alfa
β	beta
Δ	delta (estatística) ou deleção (genética)
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
^3H	radioisótopo de hidrogênio trício
40S	subunidade menor do ribossomo
60S	subunidade maior do ribossomo
80S	ribossomos de eucariotos
Å	angstrom
AEBSF	4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluoreto hidrocloreto
aa-tRNAs	aminoacil-tRNAs
A-tRNA	tRNA localizado no sítio A do ribossomo
BmDHPSA	desoxi-hipusina sintase de <i>Brugia malayi</i>
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CQMED	Centro de Química Medicinal
C-terminal	carboxi-terminal
D.O. _{600nm}	densidade óptica a 600 nm
DDM	n-dodecil- β -D-maltosídeo
DHPS	desoxi-hipusina sintase
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DOHH	desoxi-hipusina hidroxilase
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
eEFs	fatores de alongamento eucarióticos

eIF5A	<i>eukaryotic translation initiation factor 5A</i>
eIFs	fatores de iniciação eucarióticos
eRFs	fatores de liberação eucarióticos
E-tRNA	tRNA localizado no sítio E do ribossomo
g	grama
GC7	N1-guanil-1,7-diaminoheptano
h	hora
HcDHPSA	desoxi-hipusina sintase de <i>Histoplasma capsulatum</i>
HEPES	ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
HsDHPS	desoxi-hipusina sintase de <i>Homo sapiens</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IC ₅₀	concentração inibitória média
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IEx	cromatografia de troca iônica
IMAC	cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
K _{av}	coeficientes de partição
kb	kilobase
kDa	quilodalton
K _m	constante de Michaelis-Menten
K _{obs}	constante de velocidade observável de pseudo-primeira ordem
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
LdDHPSA	isoforma A da desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania donovani</i>
LdDHPSB	isoforma B da desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania donovani</i>
LIC	<i>Ligation Independent Cloning</i>
LmDHPSA	isoforma A da desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>
LmDHPSB	isoforma B da desoxi-hipusina sintase de <i>Leishmania major</i>
M	molar
m/v	relação massa/volume
Met-tRNA ^{iMet}	tRNA iniciador de metionina
mg	miligrama

min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MMV	<i>Medicines for Malaria Venue</i>
mRNA	RNA mensageiro
NAD ⁺	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
ng	nanograma
Ni-NTA	matriz de ácido nitriloacético-níquel
nm	nanômetros
nM	nanomolar
N-terminal	amino-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PA-0,5G	meio de cultura não indutor
pb	pares de base
PbDHPSA	desoxi-hipusina sintase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	polietilenoglicol
PEI	polietilenimina
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PTC	centro peptidiltransferase do ribossomo
P-tRNA	tRNA localizado no sítio P do ribossomo
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
s	segundo
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SEC	cromatografia de exclusão molecular

SSGCID	<i>Seattle Structural Genomics Center for Infectious Diseases</i>
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TCEP	tris-2-carboxietil-fosfino
TEV	Tobacco etch Virus
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)
tRNA	RNA transportador
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade de atividade enzimática
UV	ultravioleta
V	volt
v/v	relação volume/volume
V _{max}	velocidade máxima
<i>xg</i>	aceleração gravitacional
ZYP-5052	meio de cultura de autoindução

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Visão geral da tradução em eucariotos	20
1.2. Fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)	23
1.3. Hipusinação de eIF5A	26
1.4. Desoxi-hipusina sintase (DHPS)	29
1.5. Potencial da DHPS como alvo terapêutico	32
1.6. Inibidores da DHPS	33
1.7. Estrutura tridimensional da DHPS	35
1.8. Descoberta de fármacos baseada na estrutura do alvo	39
1.9. Doenças tropicais negligenciadas (DTNs)	40
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo Geral	43
2.2. Objetivos Específicos	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Clonagem das DHPSS dos patógenos eucariotos por clonagem independente de ligação (LIC)	52
3.2. Subclonagem da LmDHPSA e da LmDHPSB no vetor pETDuet-1	54
3.3. Clonagem independente de ligação (LIC) das DHPSS de <i>Leishmania sp.</i> em vetores de expressão alternativos	55
3.4. PCR de colônia	57
3.5. Teste de expressão em <i>E. coli</i> em pequena escala (volume de cultura = 1 mL) com as DHPSS dos patógenos eucariotos com indução por IPTG	58
3.6. Teste de expressão em <i>E. coli</i> em pequena escala das <i>Leishmania sp.</i> DHPSS produzidas por autoindução	60
3.7. Produção das DHPSS recombinantes em larga escala (volume $\geq 1,5$ L)	62
3.8. Produção das DHPSS recombinantes em larga escala usando o biorreator LEX	63
3.9. Purificação em larga escala das DHPSS de organismos patogênicos eucariotos	65
3.9.1. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	65
3.9.2. Cromatografia de troca iônica	67
3.9.3. Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	67
3.10. Ensaio enzimático com a HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA	68
3.11. Triagens de cristalização para PbDHPS, HcDHPS e BmDHPS	70
3.12. Resolução da estrutura da BmDHPSA e da HcDHPSA	71
3.13. Determinação do estado oligomérico da BmDHPSA	74
3.14. <i>High-throughput drug screening in vitro</i> com a LdDHPSA-cb002+ LdDHPSB-cb002	74
3.14.1. Coleções de compostos	74
3.14.2. Ensaio enzimático baseado na fluorescência do NADH	75

3.14.3. Ensaio enzimático baseado em luminescência utilizando a reação acoplada NAD ⁺ /NADH-Glo™	77
3.15. Ensaio enzimático com a LmDHPSA-cb018+ LmDHPSB-cb010 e HsDHPS	78
3.16. Análise do perfil de inibição do composto MMV1674024 sobre a LmDHPSAB	80
3.17. Triagens de cristalização com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1. Clonagem das DHPSS dos patógenos eucariotos no vetor de expressão em <i>E. coli</i>	82
4.2. Teste de expressão em <i>E. coli</i> das DHPSS dos patógenos eucariotos em pequena escala (volume cultura = 1 mL)	85
4.3. Produção e purificação em larga escala (volume cultura = 1,5 L) das DHPSS de patógenos eucariotos a partir de <i>E. coli</i>	87
4.4. Estabelecimento de um ensaio bioquímico simples e aplicável para o rastreamento em larga escala de inibidores para HcDHPSA-cb001, BmDHPSA-cb001 e PbDHPSA-cb00192	
4.5. Cristalização da HcDHPSA-cb001 e da BmDHPSA-cb001	99
4.6. Determinação da estrutura cristalográfica da BmDHPSA ligada ao NAD ⁺	100
4.7. Sítio ativo da BmDHPSA	104
4.8. Mecanismo de reação proposto para a BmDHPSA	106
4.9. Determinação da estrutura cristalográfica da HcDHPSA-cb001	107
4.10. Expressão em pequena escala das isoformas da LmDHPS em condições modificada	109
4.11. Co-expressão das duas isoformas da LmDHPS	112
4.12. Expressão em pequena escala das isoformas da LmDHPS com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i>	113
4.13. Expressão em larga escala das isoformas da LmDHPS com otimização de códons para a produção de proteínas em <i>E. coli</i>	116
4.14. Clonagem das <i>Leishmania sp.</i> DHPSS em vetores de expressão de <i>E. coli</i> alternativos	120
4.15. Expressão em pequena escala (volume = 1 mL) das isoformas da LmDHPS clonadas em pNIC-CTH0, pNIC-ZB e pSUMO-LIC	127
4.16. Expressão em pequena escala das <i>Leishmania sp.</i> DHPSS <i>full-length</i> clonadas em vetores AVA	129
4.17. Produção das <i>Leishmania sp.</i> DHPSS utilizando o biorreator LEX e purificação dessas proteínas em larga escala	131
4.18. Etapa extra de purificação por cromatografia de troca iônica para as isoformas da LdDHPS clonadas no vetor pAVA-MBP	140
4.19. Ensaio de atividade enzimática <i>in vitro</i> com as isoformas da LdDHPS	142
4.20. Estabelecimento de um ensaio bioquímico simples e aplicável para o rastreamento em larga escala de inibidores para a LdDHPSA+LdDHPSB, LmDHPSA+LmDHPSB e HsDHPS	144
4.21. <i>High-throughput screening</i> (HTS) <i>in vitro</i> de inibidores com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002	149
4.21.1. Ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH	149

4.21.2. Ensaio enzimático baseado em luminescência utilizando a reação acoplada NAD ⁺ /NADH-Glo™	151
4.22. Análise do potencial dos <i>hits</i> obtidos com o HTS para futuras otimizações	167
4.23. Nova expressão em pequena escala das <i>Leishmania sp.</i> DHPSS	175
4.24. Purificação em larga escala da LdDHPS, LmDHPS e HsDHPS	176
4.25. Ensaio de atividade enzimática <i>in vitro</i> por fluorescência com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS	186
4.26. Análise do perfil de inibição do composto MMV1674024 sobre a LmDHPS	191
4.27. Ensaios de cocristalização com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010, NAD ⁺ e o composto MMV1674024	198
5. CONCLUSÕES	201
6. REFERÊNCIAS	205
APÊNDICE	223

1. INTRODUÇÃO

1.1. Visão geral da tradução em eucariotos

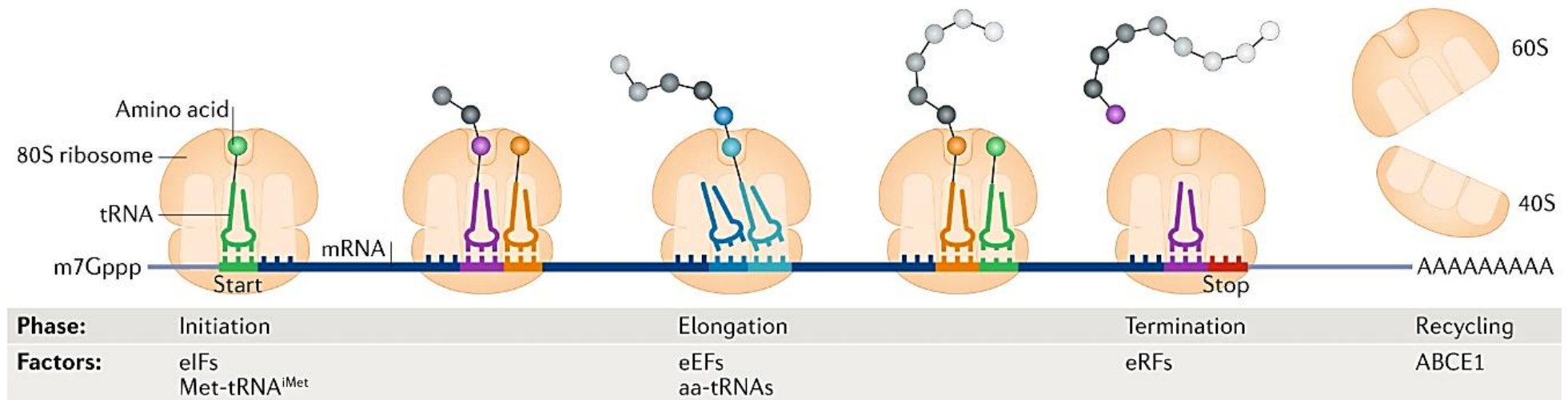
A tradução da informação genética codificada em uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) para a sequência de aminoácidos de uma proteína corresponde a um processo fundamental em todas as formas de vida. A síntese proteica permite que as células e tecidos mantenham a homeostase e reajam a sinais externos, sendo que a sua desregulação está relacionada a várias doenças, representando assim uma etapa crítica da expressão gênica (HERSHEY; SONENBERG; MATHEWS, 2019; JANI; PAPPACHAN, 2022; LU, 2022; NEELAGANDAN et al., 2020).

A síntese proteica é catalisada por uma máquina macromolecular chamada ribossomo. Os ribossomos de eucariotos são formados por quatro tipos de RNA ribossomal (rRNA) e mais de 80 proteínas ribossomais (HERSHEY; SONENBERG; MATHEWS, 2019). Cada ribossomo consiste em duas subunidades que devem ser montadas para que a síntese proteica ocorra. A subunidade menor (40S) liga-se ao mRNA e contém o sítio onde o anticódon do RNA transportador (tRNA) é combinado com a sequência complementar no mRNA. A subunidade maior (60S) contém o local onde são formadas as ligações peptídicas entre os aminoácidos trazidos pelos tRNAs ao ribossomo (HERSHEY; SONENBERG; MATHEWS, 2019; MARCHINGO; CANTRELL, 2022; SCHULLER; GREEN, 2018). Os tRNAs transitam entre três sítios dentro do ribossomo: sítio E (*exit* ou de saída), que se liga ao tRNA desacilado (descarregado) antes que este se dissocie do ribossomo; sítio P (peptidil), que sustenta a cadeia nascente covalentemente ligada ao tRNA; e sítio A (aminoacil), que corresponde à entrada para os tRNAs carregados no ribossomo (SCHULLER; GREEN, 2018).

A tradução é um processo altamente dinâmico e cíclico composto por quatro etapas principais: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem de ribossomos (Figura 1) (HERSHEY; SONENBERG; MATHEWS, 2019; NEELAGANDAN et al., 2020; XU; LIU; SONG, 2022). Na iniciação da tradução, várias proteínas chamadas fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) facilitam a montagem adequada das subunidades 40S e 60S ribossômicas para formar o complexo 80S no códon de início do mRNA com o Met-tRNA^{Met} iniciador posicionado no sítio P do ribossomo. Durante

o alongamento da tradução, o complexo 80S se move ao longo do mRNA, três nucleotídeos por vez, estendendo a proteína codificada, em coordenação com vários fatores de alongamento eucarióticos (eEFs) e aminoacil-tRNAs (aa-tRNAs). Quando o complexo 80S atinge o códon de parada, proteínas chamadas fatores de liberação eucarióticos (eRFs) são empregadas para facilitar a liberação do peptídeo nascente. Finalmente, após a terminação, as subunidades 40S e 60S do ribossomo são recicladas para que possam participar de um novo ciclo de tradução (Figura 1) (HERSHEY; SONENBERG; MATHEWS, 2019; MATEYAK; KINZY, 2017; NEELAGANDAN et al., 2020; SCHULLER; GREEN, 2018).

Figura 1. Visão geral da tradução em eucariotos. A tradução começa com a iniciação, onde as subunidades 40S e 60S do ribossomo são posicionadas no códon de início com o tRNA iniciador ligado a metionina (Met-tRNA^{iMet}) no sítio P do ribossomo, através da ação de uma série de proteínas denominadas fatores de iniciação eucarióticos (eIFs). Em seguida, o alongamento envolve a síntese da cadeia polipeptídica através das ações coordenadas de fatores de alongamento eucarióticos (eEFs) e aminoacil-tRNAs (aa-tRNAs), até que o ribossomo atinja o códon de parada. Nesta fase de terminação, a cadeia polipeptídica é liberada através das ações dos fatores de liberação eucarióticos (eRFs). Finalmente, as subunidades do ribossomo são recicladas pela ATPase ABCE1 para que ocorra um novo ciclo da tradução.



Fonte: Adaptado de SCHULLER; GREEN, 2018.

1.2. Fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)

O processo de tradução apresenta componentes muito conservados ao longo da evolução (OLSEN; WOESE, 1997; OUZOUNIS; KYRPIDES, 1996). O fator de tradução de eucariotos 5A (*eukaryotic translation initiation factor 5A*; eIF5A) corresponde a um exemplo desse fato, pois está presente em eucariotos e em arqueas (BENNE; HERSHEY, 1978; KYRPIDES; WOESE, 1998; WOLFF et al., 2007). Apesar de não ser encontrado em eubactérias (KLIER et al., 1993; PARK; LEE; JOE, 1997; PARK; WOLFF; FOLK, 1993), eIF5A possui um homólogo estrutural e funcional nesses organismos, o fator de alongamento P (EF-P) (BLAHA; STANLEY; STEITZ, 2009; DEVER; GUTIERREZ; SHIN, 2014; ROSSI et al., 2014a). Além do fato de ser conservado, eIF5A mostrou-se essencial para a viabilidade celular em todos os organismos testados até o momento (DEVER; GUTIERREZ; SHIN, 2014; NGUYEN et al., 2015; NISHIMURA et al., 2012; PARK et al., 2010; ROSSI et al., 2014a).

Na maioria dos eucariotos, eIF5A apresenta duas isoformas, como por exemplo, eIF5A1 e eIF5A2 em humanos. Essas isoformas compartilham uma identidade de sequência de aminoácidos de mais de 90% e são produzidas em diferentes condições (BARBA-ALIAGA; ALEPUZ, 2022). eIF5A1 é a principal isoforma, sendo produzido em praticamente todos os tecidos, enquanto eIF5A2 é produzido principalmente nos testículos, cérebro e células tumorais (CLEMENT et al., 2006; JENKINS; HÅÅG; JOHANSSON, 2001; MATHEWS; HERSHEY, 2015).

eIF5A foi isolado pela primeira vez a partir de ribossomos extraídos de lisados de reticulócitos de coelho, em 1976, e foi inicialmente classificado como um fator de iniciação da tradução, com base na sua atividade estimuladora da síntese de metionil-puomicina *in vitro* (BENNE; HERSHEY, 1978; KEMPER; BERRY; MERRICK, 1976; SCHREIER; ERNI; STAEHELIN, 1977). Este experimento corresponde a um ensaio modelo para se testar a influência de moléculas na formação da primeira ligação peptídica, onde se mede a transferência de metionina radioativa do tRNA^{Met} iniciador para o acceptor puomicina (PARK et al., 2022). No entanto, com o passar do tempo o papel de eIF5A no alongamento de sequências específicas, ricas em prolina, foi desvendado (GUTIERREZ et al., 2013; LI et al., 2014). Estudos mais recentes demonstraram que eIF5A afeta a tradução de uma forma mais geral, sendo que essa proteína é capaz de se ligar ao ribossomo com o sítio E vazio, podendo participar da

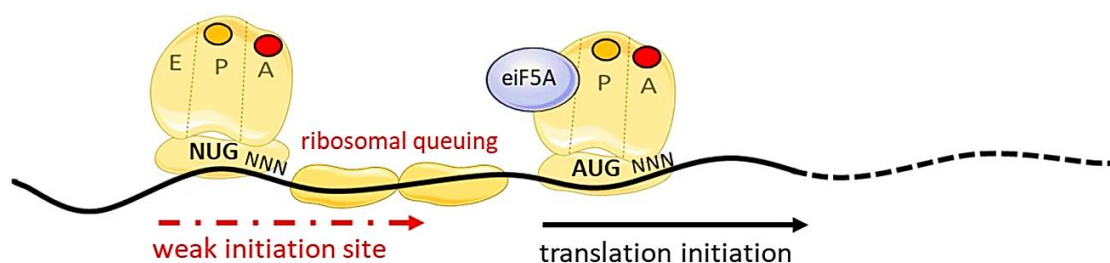
iniciação, alongamento e terminação da tradução (DEVER; IVANOV, 2018; MELNIKOV et al., 2016; PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHMIDT et al., 2016; SCHULLER et al., 2017).

Na etapa de iniciação, a supressão da pausa ribossomal causada por eIF5A é necessária para manter a fidelidade da seleção do códon de início, pois esse evento mantém a varredura eficiente do mRNA promovida pelos ribossomos e a iniciação da tradução no local apropriado (Figura 2). Na ausência de eIF5A, a pausa dos ribossomos leva a utilização de códons de início não ideais e ao aumento da produção de proteínas com extensão na região N-terminal (IVANOV et al., 2018; MANJUNATH et al., 2019). Durante o alongamento da tradução, eIF5A alivia o *stalling* (atraso ou parada) dos ribossomos (Figura 2) em vários *motifs* peptídicos além das poliprolinas, facilitando a formação de ligações peptídicas que são mais difíceis para serem formadas pelo centro peptidiltransferase do ribossomo (PTC), tais como prolinas consecutivas ou combinações de prolinas, glicinas e aminoácidos carregados. Na terminação da tradução, eIF5A estimula a hidrólise da ligação peptidil-tRNA mediada por eRF1 (Figura 2). Portanto, esses papéis expandidos para eIF5A na tradução ajudam a explicar sua natureza essencial e a abundância em eucariotos (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER et al., 2017).

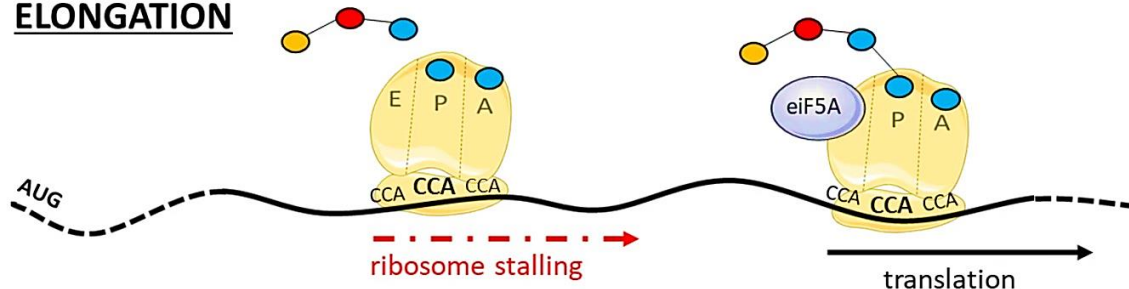
O interesse em pesquisas relacionadas a eIF5A vem crescendo devido a essa proteína ser altamente produzida em diferentes tipos de câncer, sendo indispensável para o crescimento tumoral e estando intimamente relacionada com a agressividade do tumor (HAO et al., 2020; KAISER; AGOSTINELLI, 2022; KIM et al., 2022; LI et al., 2022; MATHEWS; HERSHEY, 2015; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016; ZHENG et al., 2020). Além disso, eIF5A tem sido associado a várias outras condições patológicas humanas, incluindo diabetes (IMAM et al., 2019; KULKARNI et al., 2022; MAIER; TERSEY; MIRMIRA, 2010; PADGETT et al., 2021), síndromes neurológicas raras (FAUNDES et al., 2021; PARK et al., 2022), infecções virais pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), ebola e herpes vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (FICHES et al., 2022; MANCONE et al., 2017; OLSEN et al., 2018; OLSEN; CONNOR, 2017; SEOANE et al., 2022).

Figura 2. Papéis de eIF5A durante a síntese proteica. eIF5A se liga a ribossomos com o sítio E vazio, podendo assim participar da iniciação, alongamento e terminação da tradução. Na etapa de iniciação da tradução, a supressão da pausa ribossômica por eIF5A é necessária para manter a fidelidade da seleção do códon de início. A supressão da pausa ribossômica por eIF5A mantém a varredura eficiente do mRNA pelos ribossomos e a iniciação da tradução no local apropriado (direita). Na ausência de eIF5A, os ribossomos pausados impedem a varredura apropriada do mRNA, aumentam o tempo de permanência e a iniciação à montante, levando a utilização de códons de início não ideais (esquerda). eIF5A é crucial na etapa de alongamento da tradução, pois facilita a formação de ligações peptídicas que são mais difíceis para serem formadas pelo PTC do ribossomo, recuperando o *stalling* do mesmo. Finalmente, eIF5A participa da terminação da tradução estimulando a hidrólise da ligação peptidil-tRNA mediada por eRF1 (RF).

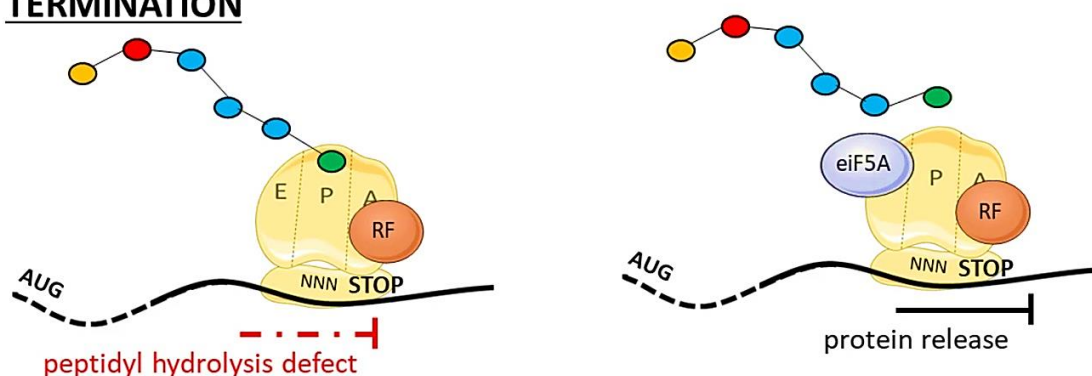
INITIATION



ELONGATION



TERMINATION



Fonte: adaptado de TAUC et al., 2021.

A depleção de eIF5A resulta em fenótipos pleiotrópicos relacionados a múltiplos processos celulares, como, por exemplo, progressão do ciclo celular (CHATTERJEE et al., 2006; PARK et al., 2010; ZANELLI; VALENTINI, 2005), translocação de

proteínas para o retículo endoplasmático (ROSSI et al., 2014b), ativação da resposta a proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático (MANDAL; MANDAL; PARK, 2016), apoptose (BARBA-ALIAGA; ALEPUZ, 2022; MARTELLA et al., 2020; YAO et al., 2022b), migração celular e metástase (LIU et al., 2021b; NING et al., 2020; ZHENG et al., 2020), senescência celular (JIANG; LOAYZA-PUCH, 2022), autofagia (LUBAS et al., 2018; ZHANG et al., 2019), resposta antimicrobiana de macrófagos (GOBERT et al., 2020) e modulação da função mitocondrial (BARBA-ALIAGA; ALEPUZ, 2022; PULESTON et al., 2019). Entretanto, ainda não está completamente claro se eIF5A atua direta ou indiretamente por meio da tradução para afetar esses processos.

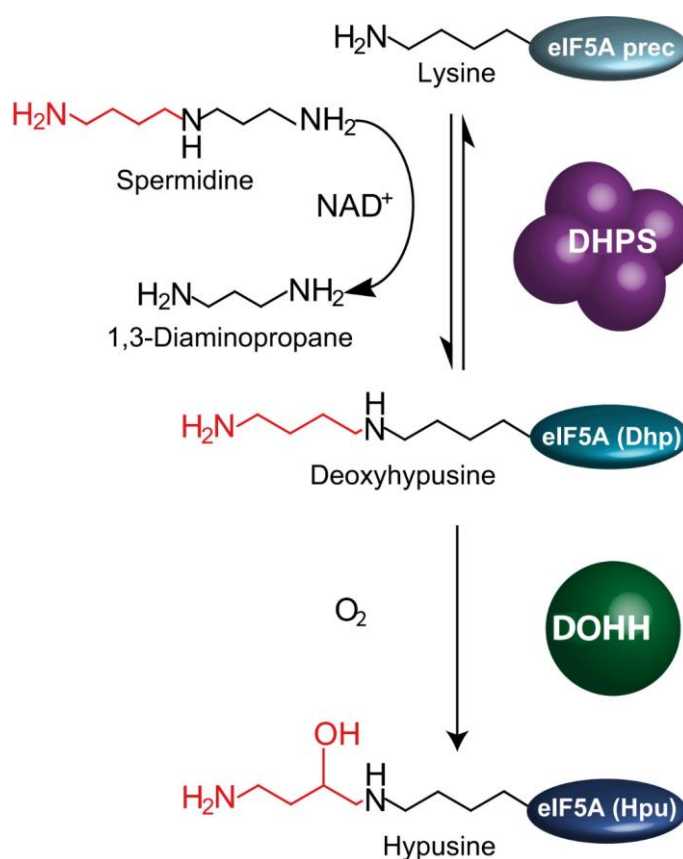
1.3. Hipusinação de eIF5A

Para desempenhar corretamente sua função na tradução, eIF5A deve passar por uma modificação pós-traducional única chamada hipusinação (Figura 3) (CHEN; LIU, 1997; PARK, 2006, p. 200; PARK; LEE; JOE, 1997; PARK; WOLFF, 2018). Na primeira etapa da hipusinação, a enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) catalisa a transferência do grupo aminobutil da poliamina espermidina para uma lisina particular (Lys50 em humanos) de eIF5A precursor (Figura 3). Em eucariotos, a hidroxilação deste grupo, pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH), termina a maturação de eIF5A com a formação do aminoácido hipusina (N ϵ -(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina) (Figura 3) (PARK, 2006; PARK et al., 2010; PARK; WOLFF, 2018).

Estudos estruturais envolvendo eIF5A ligado ao ribossomo 80S de *Saccharomyces cerevisiae* foram essenciais para desvendar o mecanismo da regulação da tradução por eIF5A hipusinado (Figura 4) (MELNIKOV et al., 2016; SCHMIDT et al., 2016). Essas estruturas revelaram que eIF5A se liga ao sítio E do ribossomo, adjacente ao tRNA localizado no sítio P do ribossomo (P-tRNA) (Figura 4B), com a cadeia lateral da hipusina alcançando o PTC do ribossomo. A cadeia lateral da hipusina interage com a extremidade do P-tRNA através de uma ligação de hidrogênio (Figura 4C). Esta interação estabiliza e orienta a alça peptídil para facilitar o ataque nucleofílico pelo tRNA localizado no sítio A do ribossomo (A-tRNA) (Figura 4C) (PARK et al., 2022; SCHMIDT et al., 2016). Embora esse reposicionamento do P-tRNA tenha potencial de auxiliar na síntese de todas as ligações peptídicas, alguns resíduos de aminoácidos, como prolinas consecutivas ou

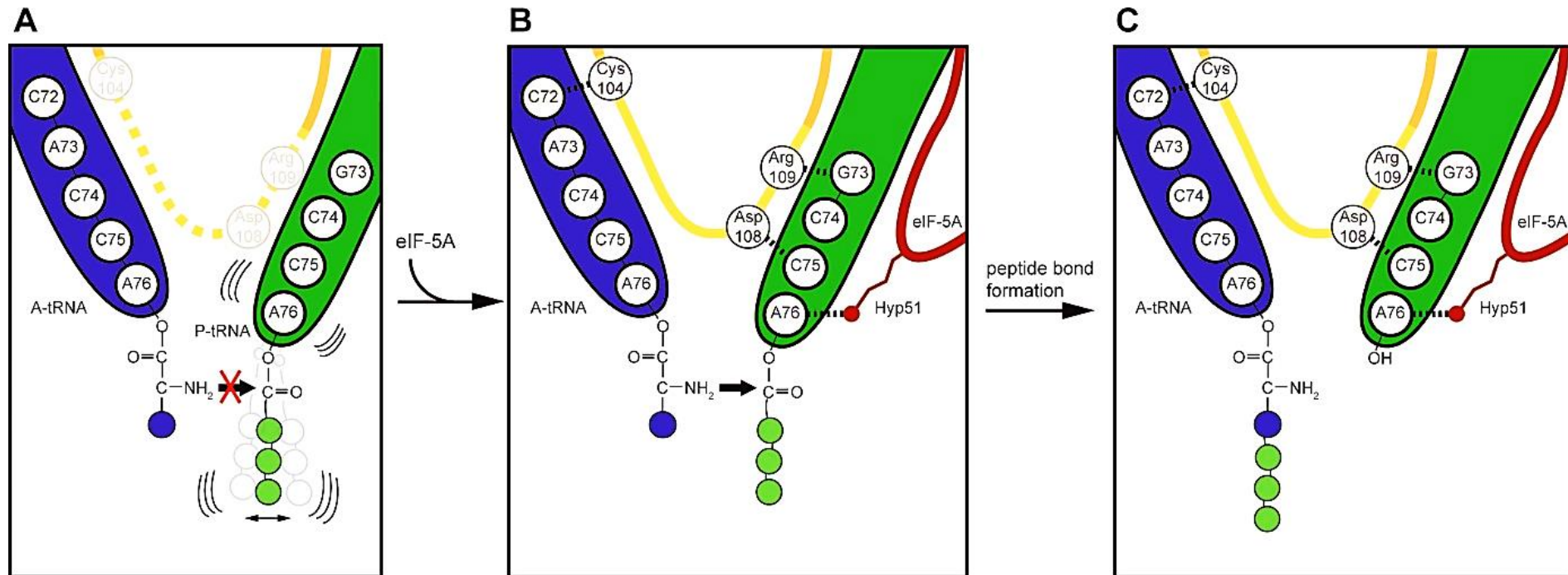
combinações de prolínas, glicinas e aminoácidos carregados, que são conhecidos por serem substratos pobres para a formação da ligação peptídica, apresentam uma necessidade maior da atuação de eIF5A (BARBA-ALIAGA; ALEPUZ, 2022; GUTIERREZ et al., 2013).

Figura 3. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A DHPS catalisa a primeira etapa da hipusinação, transferindo a porção aminobutil da espermidina para um resíduo de lisina específico do eIF5A precursor (eIF5A prec) para formar a desoxi-hipusina (eIF5A(Dhp)) e 1,3-diaminopropano. A segunda etapa da hipusinação é catalisada pela DOHH e envolve a hidroxilação da desoxi-hipusina ligada à proteína, formando assim a hipusina (eIF5A(Hpu)).



Fonte: Adaptado de KALTENEGGER et al., 2021.

Figura 4. Modelo para a ação de eIF5A hipusinado no ribossomo. (A) Certas cadeias polipeptídicas nascentes desestabilizam o tRNA localizado no sítio P do ribossomo (P-tRNA) (verde) e impedem a formação de ligações peptídicas com o tRNA localizado no sítio A do ribossomo (A-tRNA) (azul). **(B)** Os ribossomos paralisados são reconhecidos por eIF5A, que se liga no sítio E vazio de tal forma que o resíduo de hipusina (Hyp51 em *S. cerevisiae*) interaja com a extremidade do P-tRNA. Essa interação estabiliza o P-tRNA na geometria ideal para a formação de ligações peptídicas de forma mais eficiente. **(C)** A formação de ligações peptídicas resulta em um tRNA desacilado no sítio P e a um A-tRNA contendo a cadeia polipeptídica nascente estendida em um aminoácido.



Fonte: SCHMIDT et al., 2016.

A característica mais notável da hipusinação é a estrita especificidade em relação ao seu substrato eIF5A, como evidenciado pela marcação radioativa exclusiva das isoformas de eIF5A após a cultura de células de mamífero na presença de espermidina radioativa. As interações macromoleculares entre eIF5A(Lys) e DHPS, e aquelas entre eIF5A(Dhp) e DOHH, podem ser a base para essa especificidade (PARK et al., 2022). Adicionalmente, a hipusina é formada apenas pós-traducionalmente em eIF5A e não há nenhuma via conhecida para a sua síntese como um aminoácido livre (PARK et al., 2022). Após décadas de pesquisa, os reflexos biológicos da hipusinação e sua regulação em eucariotos e na saúde humana ainda estão sendo desvendados (PARK et al., 2022).

A síntese da hipusina exclusivamente em uma única proteína representa uma das modificações pós-traducionais mais específicas conhecidas até o momento. (PARK et al., 2022; PARK; WOLFF, 2018). O alto grau de conservação dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação de eIF5A em diferentes espécies atestam a importância vital deste aminoácido incomum (CHEN; LIU, 1997; MAGDOLEN et al., 1994; PARK et al., 2022). Além disso, ambas enzimas modificadoras de eIF5A são também conservadas evolutiva e funcionalmente (CHEN; LIU, 1997; PARK et al., 2010, 2022; WOLFF et al., 2007).

Vale destacar ainda que a hipusina parece ser essencial para a função de eIF5A, sendo que as duas enzimas responsáveis por essa modificação são dedicadas a esta via, correspondendo assim a interessantes alvos para intervenções terapêuticas (KAISER; AGOSTINELLI, 2022; MATHEWS; HERSHEY, 2015; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016; PARK et al., 2017, 2022; PARK; WOLFF, 2018; TAUC et al., 2021). Nas células de mamíferos, os inibidores das enzimas biossintéticas da hipusina exercem efeitos antiproliferativos (JAKUS et al., 1993; NISHIMURA et al., 2005; PARK et al., 1994), inclusive em linhagens celulares tumorais, levando à parada da progressão do ciclo celular (HANAUKE-ABEL et al., 1994).

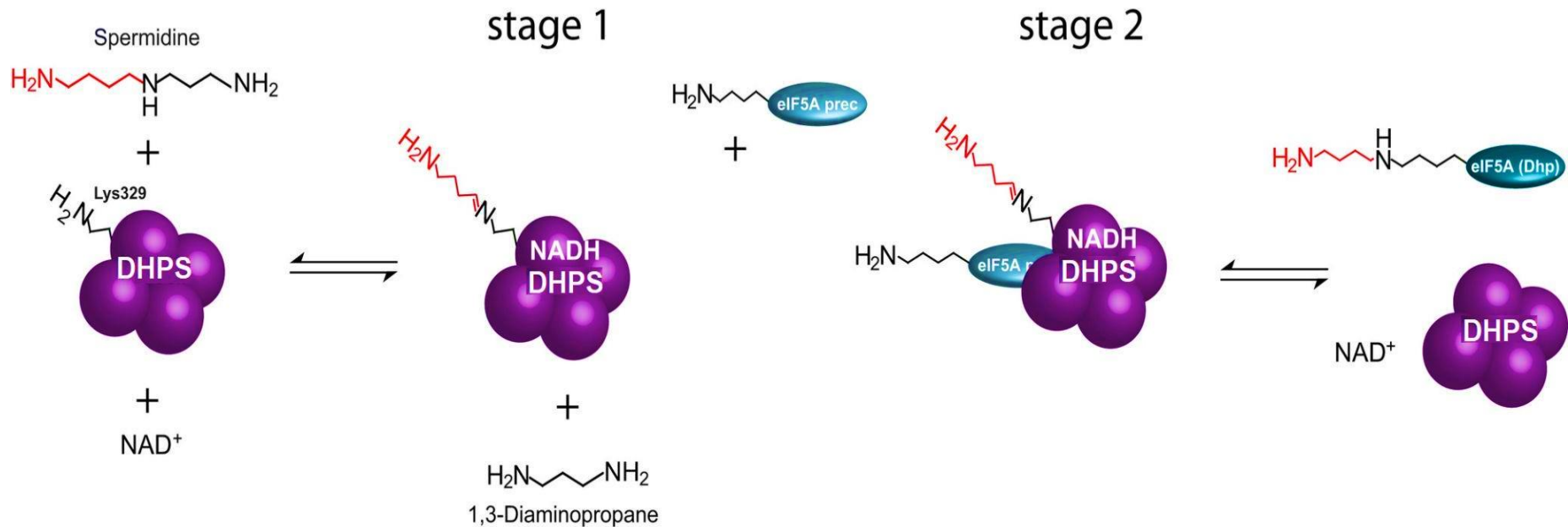
1.4. Desoxi-hipusina sintase (DHPS)

Os genes que codificam a DHPS estão presentes em todas as espécies verificadas de arqueas e eucariotos. Além disso, essa enzima, assim como eIF5A, mostrou-se essencial em todos os organismos estudados até o momento (AROONSRI

et al., 2019; KERSTING et al., 2016; NGUYEN et al., 2013, 2015; NISHIMURA et al., 2012; PARK et al., 2010; PARK; LEE; JOE, 1997; SASAKI; ABID; MIYAZAKI, 1996; SCHNIER et al., 1991; WOLFF et al., 2007). Por outro lado, arqueas não possuem homólogos evidentes para a DOHH (PARK, 2006; WOLFF et al., 2007). Ainda, a DOHH não é essencial para *S. cerevisiae*, é essencial apenas em algumas condições de crescimento para *Schizosaccharomyces pombe* e é essencial nos eucariotos multicelulares testados, o que evidencia um aumento da importância da segunda etapa da hipusinação ao longo da evolução (PARK et al., 2010, 2022; PARK; WOLFF, 2018; PEGG, 2018). A progressão evolutiva da essencialidade e da estringência estrutural de eIF5A e sua modificação pós-traducional pode ter sido ditada por um aumento na demanda para traduzir proteínas complexas com maior fidelidade e eficiência em eucariotos superiores (PARK et al., 2022; WOLFF et al., 2007).

Quanto ao mecanismo de ação, a DHPS utiliza NAD^+ como cofator e a reação pode ser dividida em duas reações parciais (Figura 5) (PARK et al., 2003). Na primeira reação parcial, um hidrogênio da espermidina é transferido para o NAD^+ para gerar desidroespermidina e NADH; em seguida, um resíduo de lisina conservado (Lys329 na HsDHPS) ataca a espermidina oxidada, formando um aduto covalente enzima-butilimina e liberando 1,3-diaminopropano (Figura 5) (WOLFF; FOLK; PARK, 1997; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). Na segunda parte da reação, eIF5A precursor liga-se a DHPS e a fração butilimina é então transferida para o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina específico de eIF5A (Lys50 em humanos) e em seguida reduzido em desoxi-hipusina pela regeneração do NAD^+ (Figura 5) (KALTENEGGER et al., 2021; PARK et al., 2017). Aparentemente apenas um único eIF5A precursor (eIF5A prec) se liga a DHPS (tetrâmero, apresentado adiante no texto) a cada ciclo da reação (Figura 5).

Figura 5. Mecanismo proposto para a reação da DHPS. Primeiro, a espermidina é clivada pela redução do NAD^+ , a sua porção butilamina é transferida para um resíduo de lisina específico da DHPS (Lys329 em humanos) para formar um intermediário enzima-butilimina e o 1,3-diaminopropano é liberado (*stage 1*). Em seguida, eIF5A precursor liga-se a DHPS e a fração butilimina é transferida para um resíduo de lisina específico no eIF5A precursor antes de ser reduzido para desoxi-hipusina pela regeneração do NAD^+ (eIF5A (Dhp)) (*stage 2*).



Fonte: adaptado de KALTENEGGER et al., 2021.

1.5. Potencial da DHPS como alvo terapêutico

O envolvimento em várias doenças, juntamente com a alta especificidade e relevância funcional da hipusinação, levaram vários pesquisadores a considerar eIF5A e sua via de modificação como um alvo terapêutico importante e promissor, estimulando o desenvolvimento de inibidores direcionados à hipusinação (KAISER; AGOSTINELLI, 2022; OLSEN; CONNOR, 2017; PARK; WOLFF, 2018; TAUC et al., 2021; TURPAEV, 2018).

Diferentes inibidores já foram descritos para a DHPS (JAKUS et al., 1993; LIU et al., 2021a; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016; TANAKA et al., 2020a, 2020b) e para a DOHH (HOQUE et al., 2009; OLSEN; CONNOR, 2017). Entretanto, os inibidores direcionados à DHPS são os mais bem caracterizados. Além disso, a DOHH necessita de ferro como cofator. Assim sendo, os inibidores para a DOHH disponíveis atualmente são quelantes de ferro (KAISER; AGOSTINELLI, 2022; KIM et al., 2006; VU et al., 2009), que acabam afetando a atividade de outras enzimas (CLEMENT et al., 2002) e a sua utilização induz a vários efeitos colaterais (CLEMENT et al., 2002; TURPAEV, 2018). Até o momento, nenhum inibidor direcionado à formação do complexo DHPS/eIF5A foi desenvolvido (D'AGOSTINO et al., 2020).

A inibição da DHPS tem sido apontada em diversos estudos como um alvo promissor para intervenções farmacológicas, principalmente voltadas ao tratamento de câncer (BANDINO et al., 2014; CONI et al., 2020; KAISER; AGOSTINELLI, 2022; KIM et al., 2022; LIU et al., 2021a; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016), diabetes (COUGNON et al., 2021; MAIER; TERSEY; MIRMIRA, 2010; ROBBINS et al., 2010; TERSEY et al., 2014; TURPAEV, 2018), doenças isquêmicas (BOUROUROU et al., 2021; MELIS et al., 2017), terapia antirretroviral (OLSEN et al., 2018; OLSEN; CONNOR, 2017; SCHRÖDER et al., 2016; SCHROEDER et al., 2014) e no tratamento de infecções causadas por organismos eucarióticos patogênicos, como por exemplo, *Trypanosoma brucei* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; NGUYEN et al., 2015), *Leishmania donovani* (CHAWLA et al., 2010), *Leishmania major* (SILVA et al., 2020), *Plasmodium vivax* (KERSTING et al., 2016), *Plasmodium falciparum* (AROONSRI et al., 2019) e *Entamoeba histolytica* (JEELANI; NOZAKI, 2021).

1.6. Inibidores da DHPS

O desenvolvimento de inibidores para a DHPS de humano (HsDHPS) é uma atividade em andamento para novas terapias anticâncer (LIU et al., 2021a; TANAKA et al., 2020a, 2020b). Esforços semelhantes para desenvolver inibidores para as DHPSs de organismos patogênicos são dificultados pela falta de informações estruturais e ensaios para a triagem de compostos. Além disso, as funções celulares e os mecanismos reguladores das DHPSs nesses organismos não são completamente compreendidos (SILVA et al., 2020).

Vários análogos da espermidina, que corresponde ao substrato da HsDHPS, foram caracterizados como inibidores dessa enzima. Dentre estes inibidores competitivos, o composto mais potente *in vitro* foi o N1-guanil-1,7-diaminoheptano (GC7), com um valor de K_i em torno de 10 nM, que é 400 vezes menor do que o valor do K_m da HsDHPS para a espermidina (JAKUS et al., 1993; PARK et al., 1994). Além disso, dados de cocristalização confirmaram a ligação específica do GC7 ao sítio ativo da HsDHPS (TANAKA et al., 2020a; UMLAND et al., 2004).

O GC7 é amplamente utilizado para inibir a hipusinação de eIF5A em células de mamíferos (BANDINO et al., 2014; LOU et al., 2013) e mostra um efeito antiproliferativo em várias linhagens de células tumorais em cultura (CHEN et al., 1996; JASIULIONIS et al., 2007; SHI et al., 1996). No entanto, o uso terapêutico do GC7 é limitado, pois seus efeitos celulares não são restritos à atuação sobre a DHPS, podendo inibir diferentes enzimas que utilizam a espermidina como substrato, resultando assim em efeitos colaterais (KAISER; AGOSTINELLI, 2022; LIU et al., 2021a; OLIVERIO et al., 2014; TANAKA et al., 2020b; TAUC et al., 2021; TURPAEV, 2018). Além disso, a biodisponibilidade desse composto é restringida pelas poliaminas oxidases fisiológicas presentes no sangue. Por esses motivos o CG7 não é utilizado em ensaios clínicos (D'AGOSTINO et al., 2020; LIU et al., 2021a; TAUC et al., 2021; TURPAEV, 2018).

A guanilhidrazona CNI-1493 foi identificada como um inibidor eficiente da HsDHPS, sendo capaz de suprimir o ciclo de replicação do HIV-1 em culturas de células (HAUBER et al., 2005). Posteriormente foi descrito que análogos do CNI-1493 suprimem a replicação do HIV-1 de maneira dose-dependente, sem efeitos colaterais tóxicos (SCHRÖDER et al., 2016). Ainda, o CNI-1493 foi testado como um inibidor de

proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) em um ensaio clínico em pacientes com a doença de Crohn, sendo que uma resposta clínica foi observada em 67% dos pacientes após quatro semanas de tratamento (HOMMES et al., 2002). Entretanto, resta determinar se esses efeitos clínicos foram em parte relacionados ao efeito inibitório do CNI-1493 sobre a hipusinação de eIF5A, uma vez que esse composto foi descrito posteriormente como um inibidor da HsDHPS (SOMMER et al., 2004). Contudo, uma desvantagem do CNI-1493 é sua instabilidade em solução (SCHRÖDER et al., 2016).

Com base na estrutura de inibidores conhecidos da HsDHPS, Ziegler e colaboradores conceberam 20 compostos, incluindo o DHSI-15, que foi capaz de inibir a síntese de hipusina no ensaio *in vitro* (ZIEGLER et al., 2012). DHSI-15 exerce um efeito antiproliferativo forte em células BCR-ABL, incluindo mutantes resistentes ao Imatinib. Apesar disso, este inibidor não se encontra atualmente em uso clínico (TAUC et al., 2021).

Para obter inibidores da HsDHPS mais eficazes na prevenção da ativação de eIF5A em células tumorais em proliferação, uma nova série de potentes inibidores alostéricos foi desenvolvida recentemente, a partir da otimização da estrutura de um composto *hit* obtido por meio de um ensaio de *high-throughput screening* (HTS) (TANAKA et al., 2020a). O inibidor mais potente da série foi o bromobenzotiofeno YT-11g, apresentando um IC₅₀ de 62 nM. A análise por cristalografia de raios X desse composto ligado à HsDHPS revelou uma mudança conformacional nessa enzima, sugerindo a presença de um novo sítio alostérico (TANAKA et al., 2020a). Embora a atividade anticancerígena do YT-11g precise ser melhor avaliada, a descoberta desse sítio alostérico abriu novos caminhos para projetar inibidores alostéricos para a HsDHPS (TANAKA et al., 2020a; TAUC et al., 2021).

Outro trabalho recente descreveu uma nova classe de inibidores alostéricos potentes para a HsDHPS (TANAKA et al., 2020b), no qual foram empregados estudos de relação estrutura-atividade, explorando os *scaffolds* bicíclicos dos *hits* provenientes de um ensaio HTS, que foram sugeridos como grupo farmacofórico (TANAKA et al., 2020b). Esses compostos foram caracterizados como inibidores competitivos de NAD⁺ e, dentre estes, o derivado de 5,6-dihidrotieno[2,3-c]piridina (26d) apresentou um IC₅₀ de 9,2 nM. Adicionalmente, a análise por cristalografia de raios X do complexo HsDHPS/26d demonstrou um modo de ligação distinto ao sítio alostérico da HsDHPS,

em comparação com o inibidor YT-11g relatado anteriormente (TANAKA et al., 2020b). Portanto, esse fato demonstra a versatilidade do sítio alostérico da HsDHPS como um sítio drogável, que pode ser utilizado para o desenvolvimento de inibidores para essa enzima (TANAKA et al., 2020b).

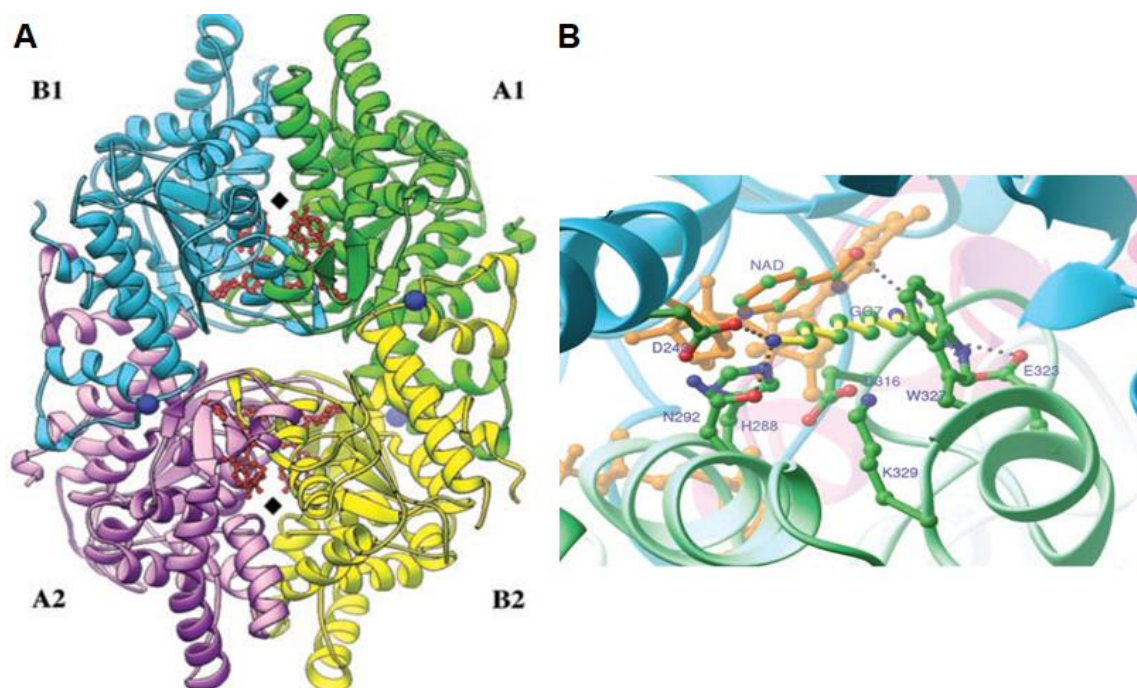
Também explorando o novo sítio alostérico da HsDHPS, derivados da 5-(2-metoxifenoxi)-2-fenilpirimidin-4-amina foram projetados e sintetizados (LIU et al., 2021a). Dentre eles, o composto 8m foi o mais potente ($IC_{50} = 14$ nM) e apresentou excelente inibição contra células de melanoma, superior à do GC7. Além disso, este composto foi capaz de inibir a migração de células de melanoma e inibiu efetivamente o desenvolvimento de melanoma em um estudo *in vivo*, apresentando baixa toxicidade (LIU et al., 2021a).

1.7. Estrutura tridimensional da DHPS

Outro fato que torna a DHPS um melhor alvo de estudo, em comparação com a DOHH, é que existem mais informações a respeito de sua estrutura, incluindo a estrutura cristalográfica da HsDHPS ligada ao seu cofator NAD^+ (LIAO et al., 1998), a inibidores (TANAKA et al., 2020a, 2020b; UMLAND et al., 2004) e a algumas poliaminas, incluindo seu substrato, a espermidina (WAȚTOR; WILK; GRUDNIK, 2020).

Com relação à estrutura tridimensional, a HsDHPS se organiza na forma de um homotetrâmero que consiste em quatro monômeros idênticos de aproximadamente 40 kDa (LIAO et al., 1998; UMLAND et al., 2004). As estruturas cristalográficas desta enzima em complexo com NAD^+ (PDB: 1DHS) (LIAO et al., 1998) e em complexo com NAD^+ e GC7 (PDB: 1RQD) (Figura 6A) (UMLAND et al., 2004), revelaram que os monômeros se associam em dois pares de dímeros, totalizando quatro sítios ativos por molécula, localizados nas interfaces dos dímeros (LIAO et al., 1998; UMLAND et al., 2004). A espermidina se liga à HsDHPS em uma cavidade estreita composta por aminoácidos com propriedades físico-químicas específicas capazes de estabelecer uma rede característica de interação com o ligante, ancorando-a no sítio de ligação (Figura 6B) (LEE; UM; PARK, 2001; WAȚTOR; WILK; GRUDNIK, 2020).

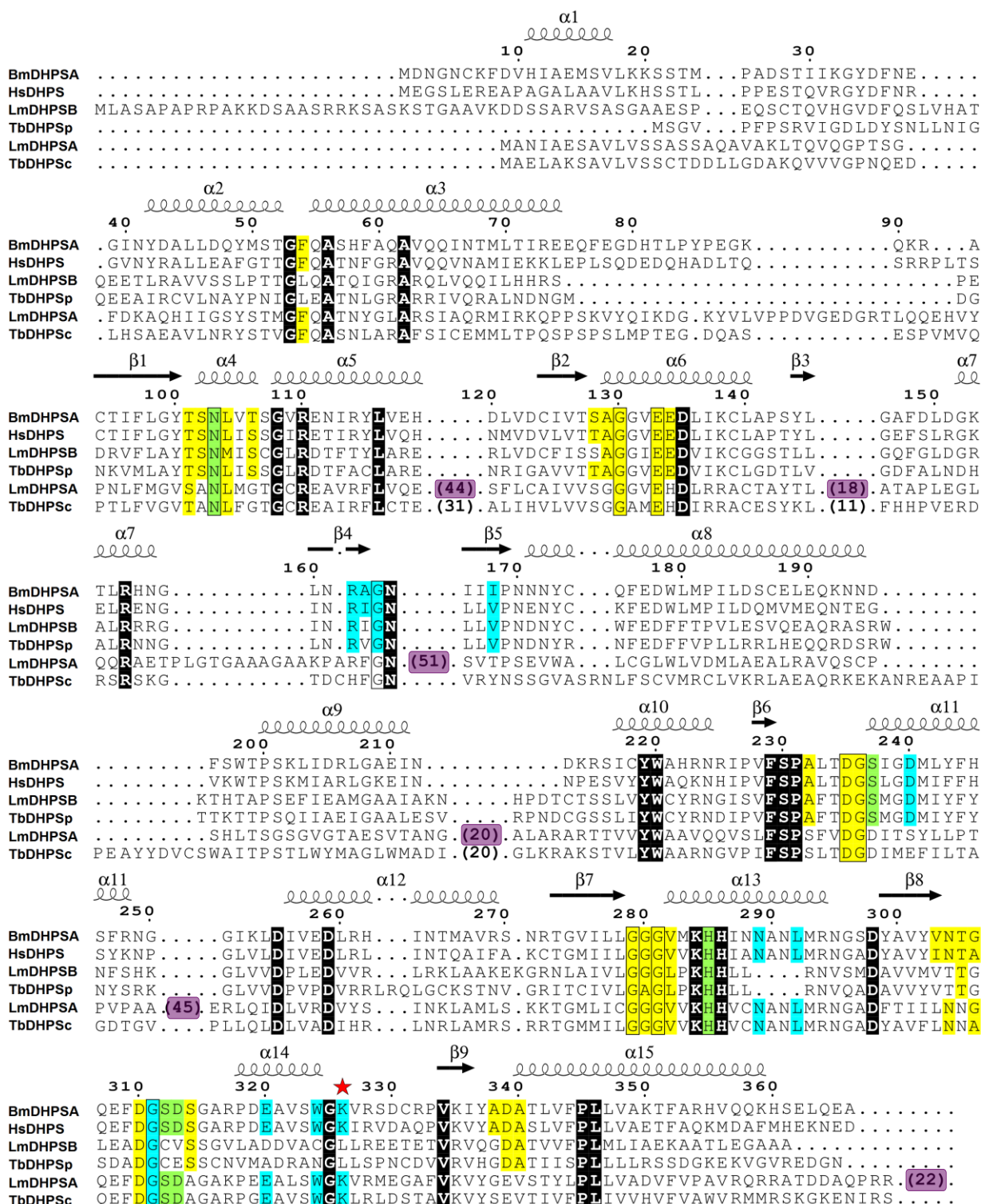
Figura 6. Estrutura da DHPS humana ligada ao NAD⁺ e ao GC7. (A) Tetrâmero da HsDHPS ligada ao NAD⁺ (PDB ID: 1RLZ), com cada monômero indicado por uma cor diferente, sendo o NAD⁺ representado em vermelho. Os diamantes pretos indicam a localização dos sítios ativos da enzima. **(B)** O inibidor GC7 (em amarelo) ligado ao sítio ativo da HsDHPS. As interações entre o GC7 e a DHPS são indicadas pelas linhas pontilhadas pretas (PDB ID: 1RQD).



Fonte: adaptado de UMLAND et al., 2004.

Ao contrário dos demais eucariotos, os genomas dos tripanossomatídeos e *Entamoeba sp.* codificam dois genes parálogos da DHPS (NGUYEN et al., 2013). No caso de *Trypanosoma sp.* e *Leishmania sp.*, uma dessas isoformas parece estar desativada cataliticamente, ou seja, não possui alguns resíduos de aminoácidos essenciais para a sua atividade (Figura 7) (NGUYEN et al., 2013; PHILLIPS, 2018).

Figura 7. Alinhamento múltiplo de sequências baseado na estrutura da BmDHPS, HsDHPS, LmDHPSB, LmDHPSA, TbDHPSp e TbDHPSc (próxima página). Os resíduos destacados em amarelo participam da ligação ao NAD⁺, em azul à espermidina ou ao GC7 (mesma região) e, em verde, da ligação a ambos. Os resíduos destacados em preto ou emoldurados em uma caixa são conservados em todas as DHPSs analisadas. A lisina catalítica encontra-se marcada com uma estrela vermelha. As lacunas são indicadas por pontos pretos. Para maior clareza, as inserções grandes da LmDHPSA foram omitidas e seus comprimentos estão indicados entre parênteses destacados em roxo. A estrutura secundária (α -hélices e folhas β) e a numeração mostrada na linha superior são relativas à estrutura da BmDHPSA. As sequências e estruturas das proteínas utilizadas no alinhamento foram: BmDHPSA (UniProt ID A0A0J9XTC4; PDB ID 6W3Z); HsDHPS (UniProt ID P49366, PDB ID 1DHS); LmDHPSB/DHPSA (UniProt IDs Q4QD19 / Q4Q3H5); e TbDHPSp/DHPSc (UniProt IDs Q4GZD1 / Q38BX0, PDB ID 6DFT). O alinhamento estrutural foi realizado através do programa PROMALS3D (PEI; GRISHIN, 2007).

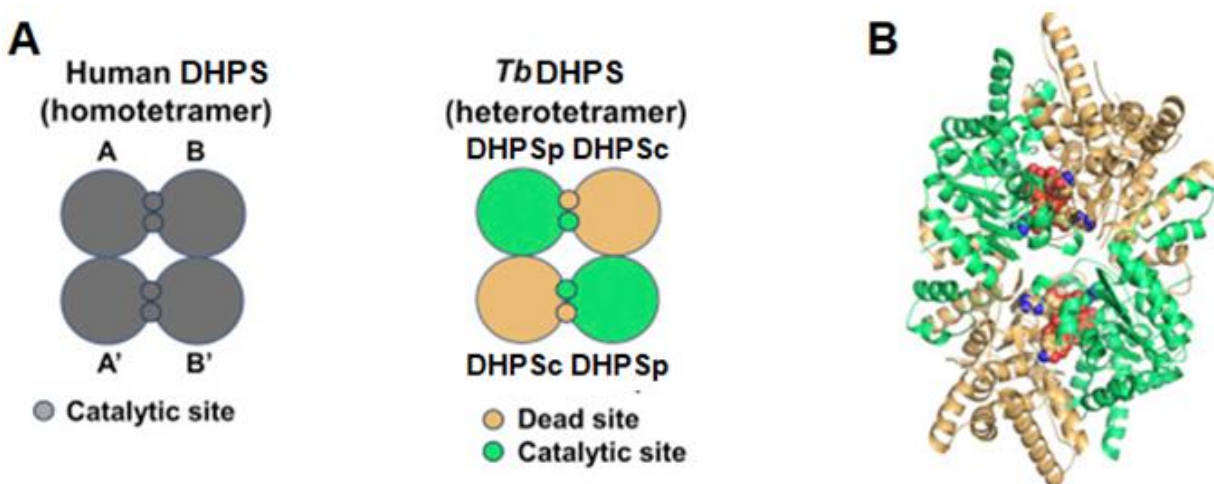


Fonte: SILVA et al., 2020.

Diferentemente da HsDHPS, a DHPS de *T. brucei* corresponde a um heterotetrâmero (dímero de heterodímeros) formado por uma isoforma cataliticamente deficiente (TbDHPSc; c para catalítica) e outra inativa (TbDHPSp; p para proenzima), sendo a DHPSc homóloga da HsDHPS (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018).

Cada heterodímero contém dois sítios de ligação ao NAD⁺, um localizado no sítio catalítico funcional enquanto o outro está localizado em um sítio remanescente inativo, devido ao fato de não possuir alguns resíduos catalíticos chave (Figura 7), incluindo a lisina catalítica essencial para a realização da hipusinação (Lys329 para HsDHPS; Lys418 para TbDHPSc) (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018). A oligomerização entre a DHPSc e a DHPSp resulta em um aumento de mais de 1000 vezes na atividade catalítica em comparação com a atividade da DHPSc sozinha (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; NGUYEN et al., 2013). Uma arquitetura heterotetramérica semelhante é sugerida para as DHPSs parálogas de *Leishmania major* (SILVA et al., 2020).

Figura 8. Estrutura da DHPS de *T. brucei* (TbDHPSc:DHPSp). (A) Representação da DHPS humana (HsDHPS) e de *T. brucei* (TbDHPSc:DHPSp). A HsDHPS (cinza) forma dois sítios ativos funcionais equivalentes em cada uma das duas interfaces dos dímeros do homotetrâmetro. No caso da TbDHPSc:DHPSp, um sítio catalítico e um sítio inativo são formados entre a DHPSc (laranja) e a DHPSp (verde) na interface do dímero; o tetrâmetro é composto por um dímero de heterodímeros. (B) Estrutura heterotetramérica da TbDHPSc:DHPSp com os quatro moléculas de NAD⁺ ligadas mostradas como esferas.



Fonte: adaptado de AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018.

Sendo assim, estas diferenças estruturais significativas entre a DHPS de agentes patogênicos e a enzima humana podem ser exploradas para o desenvolvimento de moléculas que interajam especificamente com a enzima do parasita, não gerando efeitos tóxicos ao hospedeiro (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; AROONSRI et al., 2022; BILSLAND et al., 2016; CHAWLA et al., 2010; PEGG, 2018; SILVA et al., 2020).

Um exemplo de que a inibição seletiva da hipusinação em agentes patogênicos é possível foi descrita para *Fusarium graminearum*, onde há estudos mostrando que a inibição da DHPS nesse fungo durante a infecção do trigo promoveu uma ação específica sobre o patógeno sem gerar interferência no desenvolvimento dos grãos (MARTINEZ-ROCHA et al., 2016; WORIEDH et al., 2011).

1.8. Descoberta de fármacos baseada na estrutura do alvo

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína fornece pistas sobre sua função, mecanismo pelo qual essa função ocorre e, em alguns casos, até mesmo como esta é regulada (BROWN; SHOTTON, 2015; BURLEY, 2021; SWARBRICK et al., 2020). A ideia de utilizar informações sobre a estrutura de uma proteína para orientar a concepção de novos agentes terapêuticos teve origem entre os anos 1950 e 1960, quando as primeiras estruturas das proteínas mioglobina e hemoglobina foram elucidadas por cristalografia de raios X (JASKOLSKI; DAUTER; WLODAWER, 2014; THOMAS et al., 2017). Esse evento culminou com a determinação das propriedades de transporte e armazenamento do oxigênio dessas proteínas, esclareceu as bases moleculares da anemia falciforme e potenciais tratamentos para esta doença (PERUTZ; ROSA; SCHECHTER, 1978).

Similarmente, a determinação da sequência de aminoácidos e da estrutura tridimensional da insulina foi empregada para projetar insulinas sintéticas de ação lenta para o tratamento do diabetes (THOMAS et al., 2017). Esses estudos inovadores exemplificam como a exploração terapêutica sempre esteve intimamente ligada ao entendimento da estrutura e função das proteínas. É importante ressaltar que a disponibilidade das estruturas tridimensionais de proteínas relevantes terapeuticamente também permitiu a identificação e caracterização de sítios potenciais para a ligação de inibidores, fornecendo assim a base para o desenvolvimento de fármacos baseadas em estruturas (VAN MONTFORT; WORKMAN, 2017).

O planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo tornou-se uma ferramenta muito útil para o desenvolvimento de novos medicamentos (ANDERSON, 2003; BURLEY, 2021; MAVEYRAUD; MOUREY, 2020; ROBERTSON; MEYEROWITZ; SKINIOTIS, 2022; TARI, 2012; THOMAS et al., 2017), sendo que os

primeiros exemplos dessa abordagem foram o uso da estrutura da renina para projetar anti-hipertensivos e da estrutura da protease do HIV-1 no planejamento de antivirais contra a AIDS. Atualmente, essa técnica tem sido muito empregada para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer e de agentes infecciosos, incluindo os direcionados ao SARS-CoV-2 e a organismos causadores de doenças negligenciadas (AMELIA et al., 2022; BURLEY, 2021; DAI et al., 2020; FERREIRA; DE MORAES; ANDRICOPULO, 2022; JIN et al., 2020; SONI; PRATAP, 2022; THOMAS et al., 2017; YAO et al., 2022a).

É importante ressaltar que a disponibilidade das estruturas tridimensionais de proteínas também permite uma inspeção da topologia do sítio de ligação do fármaco (BURLEY, 2021). Além disso, as propriedades eletrostáticas, como distribuição de carga, podem ser cuidadosamente examinadas (BLANEY, 2012; CONS et al., 2022; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009). O uso dessas informações facilita o processo de aprimoramento da molécula do fármaco, destacando as possíveis interações existentes no sítio de ligação, sendo que esse conhecimento é empregado na tentativa de gerar aumentos de potência e seletividade das moléculas (BROWN; SHOTTON, 2015; BURLEY, 2021; CONS et al., 2022; MAVEYRAUD; MOUREY, 2020; NERO; PARKER; MORTON, 2018; ROBERTSON; MEYEROWITZ; SKINIOTIS, 2022). Essa modulação seletiva de um alvo por ligantes de alta afinidade gera uma interferência em processos celulares específicos, conduzindo assim aos efeitos terapêuticos desejados (BURLEY, 2021; PHILLIPS; RATHOD, 2010; URWYLER, 2011; VAN MONTFORT; WORKMAN, 2017).

1.9. Doenças tropicais negligenciadas (DTNs)

No âmbito da necessidade de melhoria na seletividade dos fármacos disponíveis, as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) se destacam. Estas doenças são consideradas negligenciadas por não serem economicamente atrativas para o desenvolvimento de medicamentos (DA CONCEIÇÃO et al., 2022; EISENSTEIN, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

O plano estratégico da OMS voltado ao controle das DTNs para o período de 2021 a 2030 reconhece um conjunto heterogêneo de 20 condições infecciosas que devem ser priorizadas: (1) úlcera de Buruli, (2) doença de Chagas, (3) dengue e

chikungunya, (4) dracunculíase, (5) equinococose, (6) leishmaniose, (7) hanseníase, (8) filariose linfática, (9) oncocercose, (10) raiva, (11) esquistossomose, (12) helmintos transmitidos pelo solo (ascaridíase, ancilostomíase e tricuriase), (13) teníase e cisticercose, (14) tracoma, (15) trematodíases alimentares, (16) tripanossomíase africana, (17) boubá (treponematoses endêmicas), (18) micoses sistêmicas, (19) sarna e outras ectoparasitoses e (20) envenenamento por picada de serpentes (DA CONCEIÇÃO et al., 2022; JACOBSEN et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

As DTNs ocorrem predominantemente em países tropicais e subtropicais, afetando pessoas vulneráveis que vivem na pobreza e em contato com organismos infecciosos, além de diversos tipos de vetores (HOTEZ et al., 2020). Essas doenças afetam cerca de 1,5 bilhão de pessoas e causam até 500000 mortes por ano (BANGERT et al., 2017; KLOHE et al., 2019; SRIPA et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Apesar do grande número de pessoas acometidas, existem poucas opções terapêuticas para o tratamento das DTNs. Além disso, tais medicamentos apresentam efeitos colaterais graves nos pacientes e o surgimento de organismos infecciosos resistentes aos medicamentos disponíveis tem sido relatado (FIORAVANTI et al., 2020; PHILLIPS, 2018; SCARIOT et al., 2022; WENG; CHEN; WANG, 2018). Ainda, a escassez de alvos validados é uma grande desvantagem no contexto das DTNs (FERREIRA; DE MORAES; ANDRICOPULO, 2022).

A falta de atenção para essas doenças é desproporcional à sua importância global (WENG; CHEN; WANG, 2018), sendo que as DTNs foram ignoradas por fabricantes de medicamentos e formuladores de políticas públicas por décadas (AL JALALI; ZEITLINGER, 2020; EL-SAYED; KAMEL, 2020; HOTEZ; PECOUL, 2010). Coordenados pela OMS, organizações filantrópicas, governos nacionais e a indústria farmacêutica tem feito esforços para melhorar esse cenário, mas o controle das DTNs ainda é inadequado e difícil, sendo que a falta de medicamentos seguros, eficazes e acessíveis é um fator determinante para tal situação (AL JALALI; ZEITLINGER, 2020; DA CONCEIÇÃO et al., 2022; LAGO; DOMINGUES PASSERO, 2022; WENG; CHEN; WANG, 2018). As necessidades de tratamento não atendidas causam alta mortalidade e incapacidade, impondo assim consequências sociais e econômicas severas para as pessoas afetadas (BANGERT et al., 2017; WENG; CHEN; WANG, 2018).

Para complicar ainda mais a situação das DTNs, a pandemia da COVID-19 afetou gravemente os sistemas de saúde e as economias em todo o mundo e resultou na suspensão de muitos serviços e programas de saúde, incluindo aqueles voltados para a mitigação das DTNs (BROOKER et al., 2021). Diversos estudos recentes demonstram extrema preocupação com o controle das DTNs durante e após a pandemia da COVID-19 (AKINOKUN et al., 2021; EHRENBURG et al., 2020, 2021; EISENSTEIN, 2021; HOTEZ; FENWICK; MOLYNEUX, 2021; MARTÍNEZ-JUÁREZ et al., 2020; MCKAY et al., 2021; MIGUEL et al., 2021; PAUL; SINGH, 2022). A previsão é que a COVID-19 continuará a desviar os recursos financeiros e humanos necessários para o combate das DTNs, podendo até reverter o progresso alcançado até o momento no controle e eliminação das mesmas (EHRENBURG et al., 2020, 2021; ELPHICK-POOLEY; ENGELS, 2022; MIGUEL et al., 2021; PAUL; SINGH, 2022). Ainda, o impacto econômico negativo que a COVID-19 tem gerado está levando uma grande parcela da população mundial à pobreza extrema, o que é um agravante para a ocorrência das DTNs (AKINOKUN et al., 2021; EHRENBURG et al., 2020, 2021; HOTEZ; FENWICK; MOLYNEUX, 2021; PAUL; SINGH, 2022).

Nesse contexto, considerando a natureza altamente específica da hipusinação, as enzimas biosintéticas da hipusina, principalmente a DHPS, apresentam-se como alvos potenciais para intervenções terapêuticas, incluindo as voltadas para patógenos eucariotos causadores de DTNs. Esse fato é de extrema importância, pois há uma grande necessidade da descoberta de novas moléculas seguras, eficazes e acessíveis para o tratamento dessas doenças. Além disso, já foram descritas diferenças estruturais significativas entre a HsDHPS e a DHPS de alguns parasitas causadores de DTNs, o que pode favorecer a descoberta de inibidores seletivos para esses organismos (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; AROONSRI et al., 2022; CHAWLA et al., 2010; PHILLIPS, 2018; SILVA et al., 2020) através da caracterização da estrutura tridimensional da DHPS dos mesmos e da triagem de inibidores em larga escala.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a estrutura tridimensional da enzima DHPS (primeira etapa da hipusinação) de diferentes organismos patogênicos causadores de doenças tropicais negligenciadas e buscar inibidores para essas enzimas por meio de um ensaio de *high-throughput drug screening in vitro*. Para tanto, foram escolhidas as DHPSS dos seguintes organismos patogênicos: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Brugia malayi* e *Leishmania sp.* (duas isoformas).

2.2. Objetivos Específicos

- Produção das DHPSS dos patógenos escolhidos em *Escherichia coli*, após a clonagem de várias porções dos genes de interesse, além do gene completo, através da metodologia de clonagem independente de ligação (*Ligation Independent Cloning*; LIC);
- Purificação das DHPSS produzidas de forma solúvel em *E. coli*;
- Rastreamento automatizado para obtenção de cristais das proteínas purificadas;
- Determinação da estrutura cristalográfica por difração de raios X das DHPSS das quais se obtenham cristais de tamanho e organização suficientes para a determinação de uma estrutura de alta resolução (em torno de 2 Å);
- Padronização e aumento de escala do ensaio enzimático *in vitro* com as DHPSS de interesse para buscar inibidores direcionados às DHPSS desses patógenos através do ensaio de *high-throughput drug screening in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As informações sobre as linhagens de *Escherichia coli*, os plasmídeos e os materiais utilizados para a clonagem das DHPs de interesse estão listados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Linhagens de *E. coli* empregadas neste trabalho.

Linhagens	Genótipo	Origem
Mach1™	<i>F</i> $\phi 80(lacZ)\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(rK-mK+) \Delta recA1398$ <i>endA1 tonA</i>	Invitrogen
GC5™	<i>F</i> $\phi 80(lacZ)\Delta M15 \Delta (lacZYAargF)U169 endA1 recA1$ <i>relA1 gyrA96 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 thi-1 l-</i> <i>T1R</i>	Sigma-Aldrich
BL21(DE3)-R3- pRARE2	<i>F</i> <i>ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (Chlor^R)</i>	(GILEADI et al., 2008)
BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	<i>F</i> -, <i>ompT</i> , <i>hsdSB(rB - mB -)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>pGKJE8 (Chlor^R)</i>	Takara Bio

Fonte: autoria própria.

Tabela 2. Plasmídeos empregados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Origem
pNIC28-Bsa4	Vetor de expressão pET; <i>tag</i> His ₆ no N-terminal; sítio de clivagem por protease TEV; sítios para clonagem LIC; gene <i>sacB</i> como “ <i>stuffer</i> ” e seleção negativa; kan ^R ; <i>T7pr</i>	SGC-Oxford (STOLS et al., 2002)
pNIC-CTH0	Vetor de expressão pET; <i>tag</i> His ₆ no C-terminal; sítio de clivagem por protease TEV; sítios para clonagem LIC; gene <i>sacB</i> como “ <i>stuffer</i> ” e seleção negativa; kan ^R ; <i>T7pr</i>	SGC-Oxford
pSUMO-LIC	Vetor de expressão pET; <i>tags</i> His ₆ e SUMO no N-terminal; sítio de clivagem por protease de SUMO; sítios para clonagem LIC; gene <i>sacB</i> como “ <i>stuffer</i> ” e seleção negativa; kan ^R ; <i>T7pr</i>	SGC-Oxford (WEEKS; DRINKER; LOLL, 2007)
pNIC-Zb	Vetor de expressão pET; <i>tags</i> His ₆ e Z-basic (ZB) no N-terminal; sítio de clivagem por protease TEV; sítios para clonagem LIC; gene <i>sacB</i> como “ <i>stuffer</i> ” e seleção negativa; kan ^R ; <i>T7pr</i>	SGC-Oxford (HEDHAMMAR; HOBBER, 2007)

pETDuet-1	Vetor de expressão pET com dois sítios de clonagem múltipla para co-expressão de proteínas; <i>Tag His₆</i> no N-terminal do sítio de clonagem múltipla 1 e <i>S•Tag™</i> no C-terminal do sítio de clonagem múltipla 2 ; <i>amp^R</i> ; <i>T7pr</i>	Merck Millipore
pAVA0421	Vetor de expressão pET; <i>tag His₆</i> no N-terminal; sítio de clivagem por HRV-protease 3C; sítios para clonagem LIC; <i>amp^R</i> ; <i>T7pr</i>	Wesley Courtlandt Van Voorhis
pAVA-MBP	Vetor de expressão pET; <i>tags His₆</i> e MBP no N-terminal; sítio de clivagem por HRV-protease 3C; sítios para clonagem LIC; <i>amp^R</i> ; <i>T7pr</i>	(HEWITT et al., 2011)
pAVA-TRX	Vetor de expressão pET; <i>tags His₆</i> e TrxA no N-terminal; sítio de clivagem por HRV-protease 3C; sítios para clonagem LIC; <i>amp^R</i> ; <i>T7pr</i>	Wesley Courtlandt Van Voorhis
pAVA-SUMO	Vetor de expressão pET; <i>tags His₆</i> e SUMO no N-terminal; sítio de clivagem por protease de SUMO; sítios para clonagem LIC; <i>amp^R</i> ; <i>T7pr</i>	Wesley Courtlandt Van Voorhis
pVZ1142	pET24b/HsDHPS-His ₆ ; Vetor de expressão pET contendo a isoforma A da DHPS de humano; <i>tag His₆</i> não clivável no C-terminal; <i>kan^R</i> ; <i>T7pr</i>	John Hershey

Fonte: autoria própria.

Tabela 3. Oligonucleotídeos, plasmídeos e DNA molde para a PCR utilizados na clonagem das DHPSs de interesse.

Oligonucleotídeo	Plasmídeo	Sequência (5'-3') ^a	Organismo/ Sigla da DHPS	Molde para a PCR
BmDHPSA F1	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GGACAACGGTAACTGTAAATTCGATGTTC	<i>B. malayi</i> (BmDHPSA)	Gene sintético
BmDHPSA F2	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GGGTAAGTAAATTCGATGTTTCATATCGCC	<i>B. malayi</i> (BmDHPSA)	Gene sintético
BmDHPSA F3	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GAAATTCGATGTTTCATATCGCCGAAATGT	<i>B. malayi</i> (BmDHPSA)	Gene sintético
BmDHPSA F4	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GGATGTTTCATATCGCCGAAATGTCC	<i>B. malayi</i> (BmDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA F1	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GGCAGGCAACGGTGTGGA	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA F2	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GGGTGTGGACGGGACCTCT	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA F3	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GTCTGCTGTCCCGTCAGTC	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA F4	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GCCGTCAGTCTCCACCGCT	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA F1	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GGCGAATATTGCGGAGTCTGC	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSA F2	pNIC-CTH0	TTAAGAAGGAGATATACT ATGGCCAACATAGCGGAATCGGC	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA F3	pSUMO-LIC	ACCAGGAGCAAACGGGAGGT ATGGCCAACATAGCGGAA	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA F4	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TACTTCCAATCCAT GGCCAACATAGCGGAATCG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSB F1	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GCTTGCTCTGCCCCAGC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico
LmDHPSB F2	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GCCGGCCAAGAAGGACTCC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico
LmDHPSB F3	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GTCCGCTGCGTCCCGTAGG	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico
LmDHPSB F4	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCCAT GAAGGATGACTCATCAGCGAGAGT	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico
LmDHPSB F5	pNIC-CTH0	TTAAGAAGGAGATATACT ATGTTAGCGAGTGCACCGGCA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F6	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TACTTCCAATCCAT GTTAGCGAGTGCACCGGC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F7	pSUMO-LIC	ACCAGGAGCAAACGGGAGGT ATGTTAGCGAGTGCACCG	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F8	pSUMO-LIC	ACCAGGAGCAAACGGGAGGT CCAGCCAAGAAAGATTCAGC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético

LmDHPSB F9	pNIC-CTH0	TTAAGAAGGAGATATACTATGCCAGCCAAGAAAGATTTCAGCCG	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F10	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TACTTCCAATCCATGCCAGCCAAGAAAGATTTCAGC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F11	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TACTTCCAATCCATGTCAGCCGCGAGTCGTAGA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F12	pSUMO-LIC	ACCAGGAGCAAACGGGAGGTTTCAGCCGCGAGTCGTAGA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F13	pNIC-CTH0	TTAAGAAGGAGATATACTATGTCAGCCGCGAGTCGTAGAAAGT	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F14	pSUMO-LIC	ACCAGGAGCAAACGGGAGGTAAAGATGATTCTTCGGCACG	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F15	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TACTTCCAATCCATGAAAGATGATTCTTCGGCACGGG	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB F16	pNIC-CTH0	TTAAGAAGGAGATATACTATGAAAGATGATTCTTCGGCACGGGTTTC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LbDHPSA AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCGATGGCGAGCATTGCGGAG	<i>L. brasiliensis</i> (LbDHPSA)	DNA genômico
LbDHPSB AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCGATGGCTGCCTCTGACTCAGC	<i>L. brasiliensis</i> (LbDHPSB)	DNA genômico
LdDHPSA AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCGATGGCGAATATTGCGGAATCTGC	<i>L. donovani</i> (LdDHPSA)	DNA genômico
LdDHPSB AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCGATGCTTGCCTCTGTCCCAGC	<i>L. donovani</i> (LdDHPSB)	DNA genômico

LiDHPSA AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCG ATGGCGAATATTGCGGAATCTGC	<i>L. infantum</i> (LiDHPSA)	DNA genômico
LiDHPSB AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCG ATGCTTGCCTCTGTCCCAGC	<i>L. infantum</i> (LiDHPSB)	DNA genômico
LmDHPSA AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCG ATGGCGAATATTGCGGAGTCTG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSB AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCG ATGCTTGCCTCTGCCCCA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico
LmeDHPSA AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCG ATGGCGAATATTGCGGAGTCTG	<i>L. mexicana</i> (LmeDHPSA)	DNA genômico
LmeDHPSB AVA F	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	GGGTCCTGGTTCG ATGCTTACCTCTGCTCCAGCG	<i>L. mexicana</i> (LmeDHPSB)	DNA genômico
PbDHPSA F1	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCC ATGAATTCACAATCTAAAAGCGCTCCTTCA	<i>P. brasiliensis</i> (PbDHPSA)	cDNA
PbDHPSA F2	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCC ATGTCACAATCTAAAAGCGCTCCTTCA	<i>P. brasiliensis</i> (PbDHPSA)	cDNA
PbDHPSA F3	pNIC28-Bsa4	TACTTCCAATCC ATGAGCGCTCCTTCATCGGCA	<i>P. brasiliensis</i> (PbDHPSA)	cDNA
BmDHPSA R1	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTG TCAGGCTTCTTGCAATTCGGA	<i>B. malayi</i> (BmDHPSA)	Gene sintético

HcDHPSA R1	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAACAACGGGAACCTTCCGG	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA R2	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTACGGCAACGAAGAACCAGA	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA R3	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAAGACCAGGGTTGCCGTTT	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
HcDHPSA R4	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAAGGTGCCTCCTTGACCTC	<i>H. capsulatum</i> (HcDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R1	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAATTCTCCACGACACAGGTG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSA R2	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAAGGAGACGTCTTGCGGCAG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSA R3	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAAGGAGATTGCCTCCTGCG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSA R4	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAAGGCTGCGCGTCGTCCGT	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSA R5	pNIC-CTH0	GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCGCTCACCGCGACACAAATG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R6	pSUMO-LIC	CAGACCGCCACCGCTTCACTCACCGCGACACAAATG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R7	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TATCCACCTTTACTGTCACTCACCGCGACACAAATG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R8	pNIC-CTH0	GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCGGAGACATCCTGAGGTAAAC	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R9	pSUMO-LIC	CAGACCGCCACCGCTTCAGGAGACATCCTGAGGTAAAC	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R10	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TATCCACCTTTACTGTCAAGGAGACATCCTGAGGTAAACG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R11	pSUMO-LIC	CAGACCGCCACCGCTTCAGGACGATTGGCGTCTGCG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R12	pNIC-CTH0	GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCGGACGATTGGCGTCTGCG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R13	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TATCCACCTTTACTGTCAAGGACGATTGGCGTCTGCG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R14	pSUMO-LIC	CAGACCGCCACCGCTTCAGGTTGCGCGTCGTCCGT	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R15	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TATCCACCTTTACTGTCAAGGTTGCGCGTCGTCCGT	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	Gene sintético
LmDHPSA R16	pNIC-CTH0	GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCGGGTTGCGCGTCGTCCGT	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB R1	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTCAAGCTGCAGCCCCCTCCAG	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico

LmDHPSB R2	pSUMO-LIC	CAGACCGCCACCGCTTCAGGCTGCGGCACCCTCTAA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB R3	pNIC28-Bsa4 pNIC-Zb	TATCCACCTTTACTGTCAGGCTGCGGCACCCTCTAA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LmDHPSB R4	pNIC-CTH0	GATTGGAAGTAGAGGTTCTCTGCGGCTGCGGCACCCTCTAA	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	Gene sintético
LbDHPSA AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTTCTGTGCTGTTTACTAAACGCCCTTCACCACACTGGTG	<i>L. brasiliensis</i> (LbDHPSA)	DNA genômico
LbDHPSB AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTTCTGTGCTGTTTACTACGCTGCTGCATCCTCCAG	<i>L. brasiliensis</i> (LbDHPSB)	DNA genômico
LdDHPSA AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTTCTGTGCTGTTTATCATTCTCCAAGACACGGGTGGG	<i>L. donovani</i> (LdDHPSA)	DNA genômico
LdDHPSB AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTTCTGTGCTGTTTATTACGCTGCGGCCCGC	<i>L. donovani</i> (LdDHPSB)	DNA genômico
LiDHPSA AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTTCTGTGCTGTTTATCATTCTCCAAGACACGGGTGGG	<i>L. infantum</i> (LiDHPSA)	DNA genômico
LiDHPSB AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTTCTGTGCTGTTTATTACGCTGCGGCCCGC	<i>L. infantum</i> (LiDHPSB)	DNA genômico

LmDHPSA AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTT CGTGCTGTTTATCATTCTCCACGACACAGGTGAG	<i>L. major</i> (LmDHPSA)	DNA genômico
LmDHPSB AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTT CGTGCTGTTTATTACGCTGCAGCCCCCTC	<i>L. major</i> (LmDHPSB)	DNA genômico
LmeDHPSA AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTT CGTGCTGTTTATCATTCTCCAGCACACGGGC	<i>L. mexicana</i> (LmeDHPSA)	DNA genômico
LmeDHPSB AVA R	pAVA0421 pAVA-MBP pAVA-TRX pAVA-SUMO	CTTGTT CGTGCTGTTTATTACGCTGCTGCCCTCTCCA	<i>L. mexicana</i> (LmeDHPSB)	DNA genômico
PbDHPSA R1	pNIC28-Bsa4	TATCCACCTTTACTGTC ATTTTGCAGCTGTTTCTCAGTCC	<i>P. brasiliensis</i> (PbDHPSA)	cDNA

^a: Região destacada em negrito representa a sequência para a clonagem independente de ligação para cada vetor utilizado.

Fonte: autoria própria.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos da UNESP, no Campus de Araraquara; no Centro de Química Medicinal (CQMED) da UNICAMP; e no grupo de purificação de proteínas do *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Diseases* (SSGCID) do Dr. Wesley C. Van Voorhis, na Universidade de Washington, Seattle-EUA (BEPE FAPESP 2019/24812-0). As Figuras Suplementares 1 e 2 demonstram o fluxo de trabalho realizado no CQMED e na Universidade de Washington, respectivamente.

O cultivo das linhagens de *E. coli*, modo de preparo e composição dos meios de cultura e soluções, bem como as técnicas utilizadas neste trabalho foram realizadas de acordo com protocolos padrão (AUSUBEL et al., 2003; BRYAN et al., 2011; CHOI et al., 2011; STUDIER, 2005).

A Figura Suplementar 3 compreende a representação das principais construções (porções dos genes de interesse) utilizadas neste trabalho e a Figura Suplementar 4 resume quais construções foram empregadas durante os principais experimentos executados neste trabalho.

3.1. Clonagem das DHPSS dos patógenos eucariotos por clonagem independente de ligação (LIC)

Foram desenhados conjuntos de oligonucleotídeos que amplificavam as sequências completas (*full-length*) e sequências parciais de cada DHPSS de interesse (Tabela 3). Essas sequências parciais geraram proteínas truncadas, com a remoção de trechos possivelmente não estruturados, o que poderia favorecer a produção das DHPSS solúveis em *E. coli* e a aquisição de estruturas compactas durante os ensaios de cristalização (GILEADI et al., 2008; SAVITSKY et al., 2010). Para determinar quais seriam os segmentos da sequência do gene alvo clonados, aqui denominados construções, a melhor correspondência para essas proteínas no *Protein Data Bank* (PDB) foi identificada, através da ferramenta BLAST (MADDEN; TATUSOV; ZHANG, 1996). Após esse processo, foi executado um alinhamento múltiplo das sequências das DHPSS com a sequência de maior correspondência no PDB, através do software de predição de estrutura secundária GenomeThreader (GREMME et al., 2005) para determinar quais regiões poderiam ser removidas nas diferentes DHPSS.

Após esse processo, as regiões codificadoras dos genes das DHPSS de *P.*

brasiliensis (PbDHPSA, gene ID: 22579983), *H. capsulatum* (HcDHPSA, gene ID: 5442746), *B. malayi* (BmDHPSA, gene ID: 6098167) e *L. major* (duas isoformas: LmDHPSA, gene ID: 5654787; LmDHPSB, gene ID: 5651301) foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos que continham as sequências LIC para cada vetor utilizado (regiões destacadas na Tabela 3).

No caso das LmDHPSs, além da utilização do DNA genômico como molde para a PCR, também foram adquiridos genes sintéticos com a otimização de códons para *E. coli* para as duas isoformas (Integrated DNA Technologies; IDT), como uma estratégia para aumentar o rendimento na produção dessas proteínas. Informações detalhadas sobre sequências de oligonucleotídeos, DNA molde utilizado para a PCR e os vetores de expressão em *E. coli* empregados durante a clonagem estão disponíveis na Tabela 3.

As reações de PCR para as clonagens foram realizadas nas seguintes condições: tampão da enzima *Phusion Polymerase* 1X, 200 µM de cada dNTP, DNA molde (200 ng no caso de DNA genômico ou cDNA e 12,5 ng no caso de gene sintético; Tabela 3), 0,5 µM de cada combinação de oligonucleotídeos (descrita nos resultados) e 1 U de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB), em um volume de 50 µL e utilizando uma ciclagem *touch-down PCR* (GILEADI et al., 2008). Para confirmar a amplificação do segmento alvo (inserto), os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/V) em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 1:10000 (V/V) de *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific). O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada através do fotodocumentador L-PIX EX (Loccus). No caso de sucesso na amplificação, os produtos de PCR foram purificados pelo kit *Pure link PCR purification* (Invitrogen). Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram clonados no vetor de expressão de proteínas em *E. coli* pNIC28-Bsa4 (Tabela 2) pela metodologia de clonagem LIC (SAVITSKY et al., 2010; STOLS et al., 2002; TOSARINI et al., 2018).

Para realizar a clonagem LIC, o plasmídeo pNIC28-Bsa4 foi digerido com a enzima de restrição *BsaI*, sendo em seguida purificado com o kit *Pure link PCR purification* (Invitrogen). Após esse processo, os insertos e o vetor linearizado foram incubados com a enzima DNA polimerase T4, com o intuito de gerar extremidades complementares de fitas simples entre o inserto e o vetor, através de sua atividade 3'-

exonuclease, para promover o anelamento entre eles. Para isso, os insertos foram tratados com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dCTP 5 mM e o vetor linearizado foi tratado com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dGTP 5 mM, seguindo as recomendações do fabricante. Após essa etapa, 4 µL dos insertos e 2 µL do vetor foram incubados por 30 min à temperatura ambiente para promover o anelamento entre eles.

Após essa etapa de anelamento, as células quimicamente competentes Mach1 de *E. coli* (Thermo Fisher Scientific; Tabela 1) foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos recombinantes. As células foram então plaqueadas em meio Luria-Bertani sólido (LB-ágar; triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% e ágar 2%) suplementado com canamicina 50 µg/mL e sacarose 5%. O meio foi suplementado com sacarose, pois os sítios LIC nos vetores são separados por um fragmento *stuffer* que carrega o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, que confere sensibilidade à sacarose e fornece uma seleção negativa contra o vetor não digerido no meio de cultura suplementado com sacarose (GILEADI et al., 2008). Ainda, os clones positivos foram rastreados por PCR de colônia e confirmados por sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

3.2. Subclonagem da LmDHPSA e da LmDHPSB no vetor pETDuet-1

A sequência completa dos genes da LmDHPSA e da LmDHPSB clonados no vetor pNIC28-Bsa4 (descrito no tópico 3.1) foram subclonados no vetor pETDuet-1 (Tabela 2) com o intuito de realizar a co-expressão dessas proteínas. A clonagem da LmDHPSA foi realizada no sítio de clonagem múltipla 1 (MCS-1) do pETDuet-1, utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, enquanto que a clonagem da LmDHPSB foi realizada no sítio de clonagem múltipla 2 (MCS-2) utilizando as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I.

Na primeira etapa de clonagem, os plasmídeos pETDuet-1 e pNIC28-Bsa4 contendo a LmDHPSB (pNIC28-Bsa4/LmDHPSB) foram digeridos separadamente com as enzimas *Nde*I-FD (Thermo Fischer Scientific) e *Xho*I-FD (Thermo Fischer Scientific), na presença do tampão *FastDigest Green Buffer* 1X (Thermo Fischer Scientific), totalizando um volume de 100 µL, sendo que esta reação de digestão foi incubada a 37 °C por 45 min. Em seguida, o produto da digestão foi analisado por

eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificado utilizando o kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Na segunda etapa da clonagem, o vetor pNIC28-Bsa4 contendo a LmDHPSA (pNIC28-Bsa4/LmDHPSA) e o pETDuet-1 já contendo a inserção da LmDHPSB (pETDuet-1/LmDHPSB), foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I-FD (Thermo Fischer Scientific) e *Hind*III-FD (Thermo Fischer Scientific), na presença do tampão *FastDigest Green Buffer* 1X (Thermo Fischer Scientific), totalizando um volume de 100 µL, sendo que esta reação de digestão foi incubada a 37 °C por 45 min. Após esse processo, o produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificado utilizando o kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

As reações de ligação envolvendo o pETDuet-1 e os insertos eram constituídas pelo tampão da ligase 1X, uma proporção molar de três partes de inserto para uma parte do vetor (40 ng) e 1 U/µL de DNA ligase T4 (Invitrogen), totalizando um volume de 20 µL. Essas reações foram incubadas por 16 h a 14 °C e, após esse período, 10 µL do produto da ligação foram utilizados para transformar as células quimicamente competentes Mach1 de *E. coli* (Thermo Fisher Scientific; Tabela 1) por choque térmico. Em seguida, essas células foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com ampicilina 50 µg/mL. A clonagem foi confirmada por diagnóstico de restrição, onde foram empregadas as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, e por sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

Duas linhagens de *E. coli* de expressão de proteínas, a BL21 (DE3)-R3-pRARE2 e a BL21-pGKJE8 (Tabela 1), foram transformadas por choque térmico com o vetor pETDuet-1 carreando as LmDHPSs para gerar os clones de expressão, assim como descrito no tópico 3.1.

3.3. Clonagem independente de ligação (LIC) das DHPSs de *Leishmania* sp. em vetores de expressão alternativos

As construções desenhadas inicialmente para a LmDHPSA (gene ID: 5654787) e LmDHPSB (gene ID: 5651301) também foram clonadas por LIC em três vetores de expressão adicionais (pNIC-CTH0, pNIC-Zb e pSUMO-LIC; Tabela 2), utilizando como DNA molde os genes sintéticos com a otimização de códons para a produção de

proteínas recombinantes em *E. coli* adquiridos a partir da IDT. Informações detalhadas sobre sequências de oligonucleotídeos, DNA molde utilizado para a PCR e os vetores de expressão de *E. coli* empregados durante o processo de clonagem estão disponíveis na Tabela 3.

A amplificação dos genes de interesse (insertos) foi realizada por PCR, como descrito no tópico 3.1. Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram clonados nos vetores pNIC-CTH0, pSUMO-LIC e pNIC-Zb (Tabela 2), conforme descrito anteriormente (SAVITSKY et al., 2010; STOLS et al., 2002; TOSARINI et al., 2018). Resumidamente, os vetores pSUMO-LIC e pNIC-Zb foram linearizados pela digestão com a enzima de restrição *BsaI* (NEB), conforme as recomendações do fabricante. No caso do pNIC-CTH0, a digestão foi realizada com a enzima *BfuAI* (NEB). Tanto os insertos purificados quanto os vetores linearizados foram tratados com a enzima DNA polimerase T4, para gerar regiões complementares de fita simples por meio de sua atividade 3'-exonuclease. Para a clonagem com o pNIC-Zb, o inserto foi tratado com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dCTP 5 mM e o vetor com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dGTP 5 mM, de acordo com as recomendações do fabricante. Para a clonagem com pNIC-CTH0, o inserto foi tratado com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dGTP 5 mM e o vetor com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dCTP 5mM. Para a clonagem com pSUMO-LIC, o inserto foi tratado com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dATP 5 mM e o vetor com a DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dTTP 5 mM. Após esse tratamento, 4 µL dos insertos e 2 µL dos vetores foram incubados por 30 min à temperatura ambiente para permitir o anelamento entre eles.

Após a etapa de anelamento, as células quimicamente competentes Mach1 de *E. coli* (Thermo Fisher Scientific; Tabela 1) foram transformadas com os plasmídeos recombinantes por choque térmico. Na sequência, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo canamicina 50 µg/mL e sacarose 5% para promover a seleção dos transformantes. A clonagem foi confirmada por PCR de colônia e por sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

Ainda, as sequências *full-length* das duas isoformas da DHPS de *L. braziliensis* (LbDHPSA, gene ID: 5414861; LbDHPSB, gene ID: 12983250), *L. donovani* [LdDHPSA, ID da sequência: LR812654.1 (CDS:119250 a 121055); LdDHPSB, ID da sequência: CP022635.1 (CDS:89832 a 90971)]; *L. infantum* [LiDHPSA, ID da

sequência: LR812967.1 (CDS:120219 a 122024); LiDHPSB, gene ID: 5068572]; *L. major* (LmDHPSA, gene ID: 5654787; LmDHPSB, gene ID: 5651301) e *L. mexicana* (LmeDHPSA, gene ID: 13452225; LmeDHPSB, gene ID: 13448552) foram amplificados por PCR e clonados nos vetores de expressão de *E. coli* da série pAVA (Tabela 2). Informações detalhadas sobre sequências de oligonucleotídeos, DNA molde para a PCR e os vetores de expressão em *E. coli* usados durante o processo de clonagem estão disponíveis na Tabela 3.

A amplificação dos insertos foi realizada por PCR, exatamente como foi descrito no tópico 3.1. Os produtos de PCR purificados foram clonados nos vetores de expressão de *E. coli* pAVA0421, pAVA-MBP, pAVA-TRX e pAVA-SUMO (Tabela 2), empregando a metodologia LIC, conforme descrito anteriormente (CHOI et al., 2011). Resumidamente, esses vetores foram linearizados pela digestão com as enzimas de restrição *PmeI* e *NruI* (NEB), conforme as recomendações do fabricante. Tanto os produtos de PCR purificados quanto os vetores linearizados foram tratados com a enzima DNA polimerase T4 para gerar regiões complementares de fita simples por meio de sua atividade 3'-exonuclease. Os insertos foram tratados com DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dTTP 2,5 mM e os vetores com DNA polimerase T4 (NEB) na presença de dATP 2,5 mM, de acordo com as recomendações do fabricante. Após esse tratamento, 4 µL dos insertos e 2 µL dos vetores foram incubados por 30 min à temperatura ambiente. Após esse período, esse material foi submetido à transformação por choque térmico usando células quimiocompetentes GC5™ de *E. coli* (Sigma-Aldrich; Tabela 1). Na sequência, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com ampicilina 50 µg/mL e carbenicilina 50 µg/mL. Os clones positivos foram rastreados por PCR de colônia e confirmados por sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

3.4. PCR de colônia

Neste caso, as reações de PCR eram compostas pelo tampão da enzima *GoTaq DNA Polimerase* 1X (Promega), 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo que se anelam aos vetores (pLIC F: 5' TGTGAGCGGATAACAATT CC 3' e pLIC R: 5' AGCAGCCAACTCAGCTTCC 3' para os vetores pNIC28-Bsa4, pNIC-CTH0, pNIC-Zb e pSUMO-LIC; ou pAVA F: 5' CGAAATTAATACGACTCACTA

TAGGG 3' e pAVA R: 5' CTCAAGACCCGTTTAGAGGC 3' para os vetores da série pAVA), 0,5 U da *GoTaq DNA polimerase* (Promega), uma colônia derivada da transformação servindo como DNA molde, totalizando um volume de 25 µL. Após esse processo, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/V). As colônias testadas por PCR foram também inoculadas em meio LB suplementado com os antibióticos apropriados (dependendo do vetor escolhido; vide Tabela 2) e cultivados *overnight* a 37 °C sob agitação a 700 rpm. Após esse período, os plasmídeos recombinantes provenientes das colônias, cuja presença do inserto foi confirmada pela PCR, foram purificados utilizando-se o kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

3.5. Teste de expressão em *E. coli* em pequena escala (volume de cultura = 1 mL) com as DHPs dos patógenos eucariotos com indução por IPTG

Os plasmídeos (pNIC28-Bsa4, pNIC-CTH0, pNIC-Zb, pSUMO-LIC e pETDuet-1) carreando as construções das DHPs foram transformados nas células de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 (Tabela 1). As transformações foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos previamente (CHOI et al., 2011; TOSARINI et al., 2018), onde, resumidamente, 3 µL de plasmídeo recombinante foram adicionados em 50 µL de células competentes seguidas de uma incubação em gelo por 30 min e um choque térmico a 42 °C por 45 s. As células foram incubadas no gelo por mais 1 min e pipetadas para um bloco de 96 poços profundos (Costar) contendo 500 µL de meio LB pré-aquecido. Após esse processo, as células foram incubadas a 37 °C por 1 h em um agitador de microplacas (Lab-Line Instruments) sob agitação a 400 rpm. As células foram centrifugadas brevemente a 3000 *xg* e 500 µL do sobrenadante foram removidos antes que as células fossem suspensas no meio restante e plaqueadas em LB-ágar pré-aquecido suplementado com canamicina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL para as células transformadas com pNIC28-Bsa4, pNIC-CTH0, pNIC-Zb, pSUMO-LIC e com ampicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL para as células transformadas com pETDuet-1. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight* para permitir o crescimento das colônias das linhagens de expressão.

Os testes de expressão em pequena escala foram conduzidos como descrito previamente (BURGESS-BROWN et al., 2014; SAVITSKY et al., 2010; TOSARINI et

al., 2018). Colônias das linhagens de expressão recém-transformadas foram usadas para inocular 1 mL de meio LB suplementado com os antibióticos apropriados (vide Tabelas 1 e 2) em um bloco de 96 poços profundos (Costar) e as células foram cultivadas a 37 °C *overnight* em um agitador de microplacas (Titramax 101, Heidolph), com agitação constante a 700 rpm. No dia seguinte, uma alíquota de 20 µL das culturas *overnight* foi inoculada em 1 mL de meio *Terrific Broth* (TB; triptona 1,2%, extrato de levedura 2,4%, glicerol 0,5%, KH₂PO₄ 0,17 M e K₂HPO₄ 0,72 M) suplementado com os antibióticos apropriados (vide Tabelas 1 e 2) e incubados a 37 °C, sob agitação a 700 rpm, até uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 2 e 3. Cabe aqui destacar que foram feitas modificações no meio de cultura, assim como foi utilizada uma outra linhagem de *E. coli* (BL21 – pGKJE8) durante os ensaios com a LmDHPSA e a LmDHPSB, com o intuito de produzir essas proteínas na forma solúvel (descrito nos resultados).

A produção das DHPSS recombinantes foi induzida pela adição de IPTG 0,1 mM ao meio e as culturas foram incubadas a 18 °C *overnight*, sob agitação a 700 rpm. Na sequência, as culturas foram centrifugadas a 3000 ×g por 20 min e suspensas em 200 µL de tampão de lise [HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 10 mM; TCEP 1 mM; MgCl₂ 1 mM; DDM 0,1%; lisozima 0,5 mg/mL (Sigma); benzonase nuclease 50 U/mL (Sigma) e PMSF 1 mM (Thermo Fisher Scientific)]. As amostras foram então congeladas a -80 °C por 20 min e, em seguida, mantidas à temperatura ambiente até o descongelamento completo (aproximadamente 20 min). O lisado foi centrifugado a 3000 ×g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante clarificado foi pipetado para uma placa de filtração de 96 poços de 1,2 µm (Millipore) contendo 50 µL de resina *Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* (GE Healthcare) pré-equilibrada em tampão de lise. Essa placa foi incubada em um agitador de microplacas (Titramax 101, Heidolph) a 18 °C por 1 h, a 400 rpm. Após esse período, a resina foi lavada com 200 µL de tampão de lavagem (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 30 mM; TCEP 1 mM) e centrifugada a 300 ×g por 1 min a 4 °C sendo esse processo de lavagem realizado quatro vezes. Na sequência, 40 µL de tampão de eluição (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 300 mM; TCEP 1 mM) foram pipetados em cada poço, sendo essa placa centrifugada a 300 ×g por 3 min a 4 °C para proporcionar a eluição das proteínas.

Para avaliar a expressão das DHPs recombinantes, o lisado total e as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE utilizando géis *Criterion TGXTM precast 8–16%* com um pente de 26 poços (Bio-Rad). As corridas eletroforéticas foram executados a 200 V por 50 min. Após a conclusão da corrida, os géis foram lavados com dH₂O por duas vezes durante 10 min, sendo em seguida corados por *Gel/Code Blue protein stain* (Thermo Fisher Scientific) por no mínimo 2 h. Após esse processo, os géis foram descorados com dH₂O e fotografadas pelo Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad).

3.6. Teste de expressão em *E. coli* em pequena escala das *Leishmania sp.* DHPs produzidas por autoindução

Vetores pAVA carreando as *Leishmania sp.* DHPs *full-length* (pAVA0421, pAVA-MBP, pAVA-TRX e pAVA-SUMO) foram transformados nas células de *E. coli* BL21 (DE3)-R3-pRARE2 (Tabela 1) quimicamente competentes para gerar clones de expressão. A transformação foi realizada conforme descrito no tópico 3.5.

O teste de expressão em pequena escala foi conduzido como descrito anteriormente (CHOI et al., 2011): colônias de células de *E. coli* recém-transformadas foram usadas para inocular 820 µL de meio não indutor PA-0,5G [MgSO₄ 1 mM, mistura de metais 0,1X (estoque 1000X: FeCl₃·6H₂O 50 mM, CaCl₂ 20 mM, MnCl₂·4H₂O 10 mM, ZnSO₄·7H₂O 10 mM, CoCl₂·6H₂O 2 mM, CuCl₂·2H₂O 2 mM, NiCl₂·6H₂O 2 mM, Na₂MoO₄·2H₂O 2 mM, Na₂SeO₃·5H₂O 2 mM, H₃BO₃ 2 mM em 50 mM HCl), glicose 0,5%, NPS 1X (PO₄³⁻ 100 mM, SO₄²⁻ 25 mM, NH₄⁺ 50 mM, Na⁺ 100 mM, K⁺ 50 mM), L-metionina 100 mg/mL e mistura de 17 aminoácidos 100 mg/mL (1% de cada um dos seguintes L-aminoácidos: Na⁺Glu, Asp, Lys–HCl, Arg –HCl, His–HCl, Ala, Pro, Gly, Thr, Ser, Gln, Asn, Val, Leu, Ile, Phe e Trp)] suplementado com ampicilina 50 µg/mL, carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL em um bloco de 96 poços profundos (Costar). As culturas foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente em um agitador de microplacas sob agitação a 700 rpm.

No dia seguinte, as culturas foram incubadas por mais 3 h a 37 °C para garantir o crescimento adequado de todas as amostras. Uma alíquota de 20 µL das culturas foi transferida para um bloco de 96 poços profundos (Costar) contendo 600 µL de meio de autoindução ZYP-5052 [meio ZY (triptona 10 g/L e extrato de levedura 5 g/L),

MgSO₄ 1 mM, mix de metais 1X, 5052 1X (glicerol 0,5%, glicose 0,05%, α -lactose monohidratada 0,2%) e NPS 1X] suplementado com ampicilina 50 μ g/mL, carbenicilina 50 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL. O bloco foi coberto com um selo respirável *AirPore MicroPorous Tape Sheets* (Qiagen) e incubado em um agitador de microplacas a 20 °C por aproximadamente 27 h, até que OD_{600nm} de pelo menos 0,6 fossem atingidas. Após esse processo, as células foram centrifugadas a 4300 $\times g$ por 30 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o bloco com os pellets celulares foi armazenado a -80 °C.

Posteriormente, esses *pellets* celulares foram descongelados à temperatura ambiente por 20 min e 600 μ L de tampão de lise [HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 5%; CHAPS 0,5% (A.G. Scientific); imidazol 10 mM; MgCl₂ 10 mM; lisozima 400 μ g/mL (Sigma); benzonase nuclease 25 U/mL (Merck Millipore)] foram transferidos para cada poço. As células foram então ressuspensas por pipetagem e, após esse processo, 600 μ L de tampão de lise foram pipetados em cada poço e a amostra foi novamente homogeneizada por pipetagem. Esse bloco foi selado e incubado à temperatura ambiente por 1 h em um agitador de microplacas sob agitação a 400 rpm.

Após a lise celular, uma amostra de 5 μ L do lisado bruto foi preparada para análise por SDS-PAGE, misturando-a com um volume igual de tampão de amostra *Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer 5X* (Thermo Fisher Scientific) e desnaturada por 5 min a 95 °C. A amostra restante foi clarificada por centrifugação a 4300 $\times g$ por 30 min. 825 μ L do sobrenadante foram transferidos para um bloco de 96 poços profundos (Costar) contendo 200 μ L de resina *Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* (GE Healthcare) pré-equilibrada com o tampão de lise. A mistura amostra/resina foi incubada por 30 min a 4 °C sob agitação. Essa mistura foi então transferida para uma placa de filtro de 96 poços de 25 μ m (Seahorse Labware). A placa de filtro foi acoplada a uma bomba de vácuo e a resina foi lavada por três vezes com 1 mL de tampão de lavagem (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 30 mM). Após a lavagem, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 100 μ L de tampão de eluição (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 30 mM). 40 μ L da amostra eluída foram então misturados com 10 μ L de tampão de amostra *Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer 5X* (Thermo Fisher Scientific) e desnaturados para serem testados por SDS-PAGE.

Para avaliar a expressão das *Leishmania sp.* DHPSS recombinantes, o lisado total e as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE usando géis *Criterion TGXTM precast 8–16%* com um pente de 26 poços (Bio-Rad). As corridas eletroforéticas foram executados a 200 V por 50 min. Após a conclusão da corrida, os géis foram lavados com dH₂O por duas vezes durante 10 min, sendo em seguida corados por *GelCode Blue protein stain* (Thermo Fisher Scientific) por no mínimo 2 h. Após esse processo, os géis foram descorados com dH₂O e fotografadas pelo Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad).

3.7. Produção das DHPSS recombinantes em larga escala (volume ≥ 1,5 L)

As construções que obtiveram os melhores resultados relativos à solubilidade durante os testes expressão em *E. coli* em pequena escala, tiveram sua produção escalonada para maiores volumes de cultura (1,5; 3; 6; 12 ou 24 L), sendo que os volumes utilizados para cada construção estão descritos nos resultados.

As células BL21(DE3)-R3-pRARE2 transformadas com os plasmídeos carreando as melhores construções foram inoculadas em 50 mL de meio LB suplementado com os antibióticos apropriados para cada vetor (vide Tabela 2) e para a linhagem de expressão (vide Tabela 1), e cultivados a 37 °C *overnight*, agitando-se a 150 rpm. No dia seguinte, essas células foram inoculadas no meio de cultura que proporcionou o melhor desempenho no teste de expressão em pequena escala (descrito nos resultados) suplementado com os antibióticos apropriados (vide tabelas 1 e 2). Após esse processo, as células foram cultivadas a 37 °C, sob agitação, até alcançar uma DO_{600nm} de 1,5 a 2,0. Então, essas células foram resfriadas a 18 °C por 30 min e, após esse período foi adicionado IPTG 0,2 mM ao meio para promover a indução da produção das proteínas recombinantes e o crescimento foi retomado a 18 °C por 16 a 18 h sob agitação a 150 rpm.

No caso da HsDHPs, as células foram cultivadas a 37 °C *overnight* em meio LB suplementado com canamicina 50µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL, sob agitação a 150 rpm. 50mL dessa cultura inicial foram usados para inocular 3 L de meio TB contendo canamicina 50µg/mL e cloranfenicol 34µg/mL. As células foram cultivadas a 37 °C até atingirem uma OD_{600nm} entre 1,5 e 2,0. Posteriormente, IPTG 0,5 mM foi adicionado ao meio de cultura e o crescimento foi retomado a 37 °C por mais 4 h.

Após o período adequado de indução da produção das proteínas de interesse, as culturas foram centrifugadas a 4 °C por 15 min a 400 *xg* e as células foram suspensas em tampão de lise 2X (HEPES pH 8,0; 0,1 M; NaCl 1M; glicerol 20%; imidazol 20 mM; TCEP 2 mM) na proporção de 1 mL de tampão de lise por grama de *pellet* celular. Essa suspensão celular foi suplementada com PMSF 1 mM. Após esse processo, os *pellets* celulares foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

3.8. Produção das DHPs recombinantes em larga escala usando o biorreator LEX

As células BL21(DE3)-R3-pRARE2 transformadas com os plasmídeos pNIC-CTH0, pNIC-Zb e pSUMO-LIC carreando as construções das LmDHPs que produziram proteína solúvel no teste de expressão em pequena escala foram cultivadas a 37 °C *overnight* em meio LB suplementado com canamicina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL, sob agitação a 150 rpm. 50 mL dessa cultura inicial foram inoculados em 12 L de meio TB (seis frascos de 2 L) suplementado com canamicina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. As células foram cultivadas a 37 °C no biorreator LEX (Epiphyte3) (Figura 9) até atingirem OD_{600nm} entre 1,5 e 2,0. A cultura celular foi então resfriada a 18 °C por 30 min. Em seguida foi adicionado IPTG 0,2 mM ao meio e o crescimento foi retomado a 18 °C por 16 a 18 h no biorreator LEX.

Figura 9. O biorreator LEX cultiva até 24 culturas individuais de 2 L. Seu design geral apresenta um gabinete com linhas de aeração removíveis contendo controles personalizáveis, exaustor de ar acoplados à filtros HEPA, dois circuladores de água com regulação eficiente das condições de temperatura por banho-maria e componentes totalmente esterilizáveis.



Fonte: CHOI et al., 2011.

No caso da HsDHPS, as células BL21(DE3)-R3-pRARE2 transformadas com o plasmídeo carreando a HsDHPS (pVZ1142; Tabela 2) foram cultivadas a 37 °C *overnight* em meio LB suplementado com Canamicina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL, sob agitação a 700 rpm. 50 mL dessa cultura foram utilizados para inocular 2 L de meio TB suplementado com canamicina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. As células foram cultivadas a 37 °C no biorreator LEX até atingirem uma OD_{600nm} entre 1,5 e 2,0. Posteriormente, IPTG 0,5 mM foi adicionado ao meio e o crescimento foi retomado a 37 °C por 4 h adicionais.

As construções das DHPSs de *Leishmania sp. full-length* clonadas nos vetores pAVA e transformadas em BL21(DE3)-R3-pRARE2, que produziram proteína solúvel no teste de expressão em pequena escala também foram cultivados no biorreator LEX. No entanto, o cultivo celular foi modificado conforme descrito anteriormente (CHOI et al., 2011; STUDIER, 2005): culturas iniciais de 4 mL de meio não indutor PA-0,5G suplementado com ampicilina 50 µg/mL, carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL foram cultivadas *overnight* a 25 °C, sob agitação a 700 rpm. Três mL desta cultura inicial foram usados para inocular 2 L de meio de autoindução ZYP-5052

suplementado com 300 µL de *Antifoam 204* (Sigma), ampicilina 50 µg/mL, carbenicilina 50 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. Os frascos de 2 L foram selados com tampas aspersoras e colocados no biorreator LEX. O fluxo de ar foi ajustado uniformemente para cada frasco, e eles foram incubados a 18 °C por 48 h.

Após a incubação apropriada, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 *xg* por 20 min a 4 °C e, em seguida, suspensas em tampão de lise 2X, na proporção de 1 mL de tampão de lise por grama de *pellet* celular. Essa suspensão celular foi suplementada com PMSF 1 mM. Após esse processo, os *pellets* celulares foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

As várias tentativas de produção de proteínas em larga escala foram analisadas qualitativamente por meio da realização de uma triagem para determinar o nível de expressão e solubilidade das proteínas, antes de iniciar o processo de purificação em larga escala (CHOI et al., 2011). Esse processo de triagem se baseou em testar 1 mL da cultura final (após o processo de indução da produção das proteínas de interesse), de forma semelhante ao processo de purificação realizado no teste de expressão em pequena escala descrito no tópico 3.6.

3.9. Purificação em larga escala das DHPs de organismos patogênicos eucariotos

3.9.1. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

As amostras processadas nas etapas anteriores foram descongeladas e diluídas em mais dois volumes de tampão de lise 1X (2 mL de tampão por grama de *pellet* celular), sendo estas suplementadas com AEBSF 250 µg/mL, lisozima 0,05 µg/mL, benzonase 25 U/mL, MgCl₂ 10 mM; L-arginina 50 mM e L-glutamato 50 mM. As células foram sonicadas no gelo usando um sonicador Virtis Versonic 600 (SP Scientific) programado para funcionar por 12 min em intervalos de 15 s a 100 W separados por 15 s de descanso. Após esse processo, uma amostra representando a fração lisado total foi coletada para análise subsequente por SDS-PAGE. A clarificação do lisado total foi obtida por centrifugação a 10 °C por 60 min a 30000 *xg* e uma amostra representando a porção solúvel foi coletada para análise subsequente por SDS-PAGE. O lisado clarificado foi aplicado em uma coluna *HisTrap™ FF Crude* de 5 mL (GE Healthcare) equilibrada com tampão de lise (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500

mM; glicerol 10%; imidazol 10 mM; TCEP 1 mM) acoplada ao sistema de purificação de proteínas ÄKTA pure (GE Healthcare) programado para um fluxo de 2 mL por min. A fração *flow-through* foi coletada e uma amostra dessa fração foi analisada por SDS-PAGE. Em seguida, a coluna foi lavada com 75 mL (15 volumes de coluna) de tampão de lavagem (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 30 mM; TCEP 1 mM) para remover as proteínas ligadas inespecificamente à coluna. As proteínas contendo *tag* His₆ foram eluídas com 20 mL (quatro volumes de coluna) de tampão de eluição (HEPES 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 10%; imidazol 300 mM; TCEP 1 mM). O cromatograma de absorbância a 280 nM foi utilizado para determinar quais frações seriam coletadas e analisadas por SDS-PAGE. A remoção dos *tags* das proteínas de interesse foi realizada *overnight* a 4 °C empregando a protease apropriada (vide a Tabela 2) em uma proporção molar de 15:1 de DHPS em relação à protease, durante a diálise contra o excesso de tampão para cromatografia de exclusão molecular (SEC) (HEPES 20 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; TCEP 1 mM; glicerol 5%) na membrana de diálise *SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO* (Thermo Fisher Scientific). Após esse processo, a análise qualitativa da digestão com as proteases foi realizada por SDS-PAGE.

Uma segunda etapa de IMAC foi realizada com as amostras digeridas pelas proteases, com o intuito de remover as DHPSS não clivadas, os *tags* clivados, as proteases e quaisquer proteínas contaminantes de *E. coli* que se ligam à coluna. Para isso, a amostra foi carregada em uma coluna *HisTrap™ FF Crude* de 5 mL (GE Healthcare) equilibrada com tampão de lise e conectada ao ÄKTA pure (GE Healthcare) programado para um fluxo de 3 mL por min. A fração *flow-through* foi coletada e uma amostra foi analisada por SDS-PAGE. Em seguida, a coluna foi lavada com três volumes de coluna (15 mL) de tampão de lavagem (o mesmo da primeira IMAC) para remover da resina as proteínas não ligadas, sendo essa fração de lavagem também coletada para ser analisada por SDS-PAGE. As proteínas ligadas à coluna (idealmente, a protease, proteínas contaminantes e as DHPSS não clivadas) foram eluídas da coluna após passagem de quatro volumes de coluna (20 mL) de tampão de eluição (o mesmo da primeira IMAC). As frações geradas pela IMAC reversa foram analisadas por SDS-PAGE, sendo que as frações contendo as DHPSS de interesse foram reunidas e concentradas utilizando os concentradores 30 kDa MW *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 30K* (Merk Millipore) para um volume de 500

µL ou 5 mL, dependendo do tipo de coluna utilizada na etapa de purificação sequencial.

3.9.2. Cromatografia de troca iônica

Com o intuito de aumentar a pureza de algumas construções das *Leishmania sp.* DHPSSs, foi realizada uma cromatografia de troca iônica após a etapa do IMAC reverso para remover as proteínas contaminantes. Para isso, as amostras foram inicialmente dialisadas *overnight* a 4 °C, contra um excesso de tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 9,0; NaCl 30 mM; glicerol 5%; TCEP 1 mM) utilizando a membrana de diálise *SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO* (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as amostras foram injetadas em uma coluna de troca iônica RESOURCE™ Q de 6 mL (GE Healthcare) pré-equilibrada com tampão A e conectada ao sistema ÄKTA Pure (GE Healthcare) ajustado para um fluxo de 2 mL por min. A fração *flow-through* foi coletada e uma amostra foi analisada por SDS-PAGE. Após este processo, cinco volumes de coluna (30 mL) do tampão B (Tris-HCl 20 mM pH 9,0; NaCl 1 M; TCEP 2 mM) foram injetados na coluna. Uma amostra desta fração também foi coletada para análise por SDS-PAGE. Na sequência, as frações contendo as DHPSSs de interesse foram concentradas utilizando os concentradores *30 kDa MW Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 30K* (Merk Millipore) para um volume de aproximadamente 500 µL e em seguida purificadas por SEC.

3.9.3. Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

As amostras originadas no processo de purificação por IMAC reverso ou troca iônica foram centrifugadas a 4 °C por 10 min a 20000 *xg* e injetadas na coluna *Hiload 16/600 Superdex 200 pg* (Merck) pré-equilibrada com tampão de SEC e conectada ao ÄKTA pure (GE Healthcare) ajustado para um fluxo de 0,8 mL por min. O eluato foi coletado em frações de 0,5 mL. No caso das *Leishmania sp.* DHPSSs, as amostras foram injetadas na coluna *Superdex 200 10/300 GL* (Merck) pré-equilibrada com tampão de SEC conectada ao ÄKTA pure (GE Healthcare) ajustado para um fluxo de 0,3 mL por min. As frações obtidas com a SEC foram analisadas por SDS-PAGE para confirmar o sucesso da purificação e determinar quais frações seriam reunidas para serem submetidas ao processo de concentração final.

Depois de reunir as frações SEC apropriadas, as amostras foram concentradas utilizando os concentradores *30 kDa MW Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 30K* (Merk Millipore). A concentração de proteína nas amostras purificadas foi estimada por absorção de UV a 280 nm, através de um NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e a equação de $A = \epsilon \times c \times l$ (Lambert-Beer), onde ϵ é o coeficiente de extinção molar para cada DHPS, c é a concentração da proteína em mol/L e l é o comprimento do caminho óptico em cm. Após o processo de concentração, parte das amostras foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a outra parte foi suplementada com glicerol a uma concentração final de 50% e armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.10. Ensaio enzimático com a HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA

A atividade das DHPSs foi monitorada através da quantificação da fluorescência do NADH gerado pela redução do cofator NAD^+ catalizada pelas DHPSs (WOLFF; WOLFF; PARK, 2000), basenando-se em trabalhos anteriores (PARK et al., 2017; SILVA et al., 2020). Os ensaios foram realizados a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando placas pretas de 384 poços (Corning) em um volume final de $50\text{ }\mu\text{L}$. As DHPSs purificadas foram diluídas no meio reacional, que era composto por glicina/NaOH $0,2\text{ M}$ pH 9,2; glicerol 5%; DTT 1 mM . Cabe aqui ressaltar que esse pH de 9,2 foi utilizado pois foi o que proporcionou a maior atividade para as DHPSs estudadas (dados não mostrados) e, além disso, esse pH é amplamente utilizado em ensaios enzimáticos com DHPSs de outras espécies (CHAWLA et al., 2010; MITTAL et al., 2014; SILVA et al., 2020; WOLFF; LEE; PARK, 2011; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000).

As leituras foram registradas a cada 50 s após o início da reação (injeção de NAD^+ ou espermidina) por um período de 40 min (HcDHPS e BmDHPS) ou de 60 min (PbDHPS) através de um leitor de placas *CLARIOstar plate reader* (BMG Labtech) empregando o comprimento de onda de $355 \pm 15\text{ nm}$ e de $445 \pm 20\text{ nm}$ para a excitação e para a emissão, respectivamente.

Ainda, foram realizados ensaios para determinar as concentrações das enzimas e os tempos de reação necessários para produzir a cinética linear da reação (dados não mostrados). Considerando que as concentrações das DHPSs, do substrato espermidina, do cofator NAD^+ e do inibidor GC7 sofreram variações durante os ensaios enzimáticos, a Tabela 4 a seguir resume a concentração final desses

componentes em cada experimento realizado.

Tabela 4. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos com a HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA.

Enzima	Experimento	[NAD ⁺] μM	[Espermidina] μM	[GC7] μM	[DHPS] (tetramero) nM
HcDHPSA- cb001	Titulação do NAD ⁺	0,098 a 100	5	-	25
	Titulação da espermidina	30	0,032 a 500	-	25
	Inibição pelo GC7	30	5	0,00017 a 10	18,8
BmDHPSA- cb001	Titulação do NAD ⁺	0,195 a 400	0,56	-	25
	Titulação da espermidina	132	0,0005 a 1	-	25
	Inibição pelo GC7	132	0,56	0,00017 a 10	18,8
PbDHPSA- cb001	Titulação do NAD ⁺	0,39 a 800	50	-	100
	Titulação da espermidina	95	0,0006 a 100	-	100
	Inibição pelo GC7	95	4	0,0003 a 50	75

Fonte: autoria própria.

Cabe aqui destacar que foi preparada uma condição “branco”, que era constituída por todos os componentes da reação, com exceção da enzima, para cada um desses ensaios. A média dos valores de fluorescência obtidos para o branco foi subtraída das demais condições. Com exceção do experimento de titulação da espermidina, que era iniciado pela injeção de NAD⁺, as reações eram iniciadas pela injeção de espermidina, realizada pelo equipamento *CLARIOstar*. Ainda, no ensaio de inibição pelo GC7, os componentes da reação, com exceção da espermidina, eram incubados por 1 h à temperatura ambiente. Após esse período, a reação era iniciada pela injeção da espermidina.

As velocidades iniciais das reações empregando concentrações variáveis de NAD⁺ ou de espermidina foram estimadas a partir das curvas de progresso da reação pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da fase linear da reação. A dependência das velocidades iniciais pela concentração do substrato ou do cofator foi ajustada a uma hipérbole: $Y = V_{\max} \cdot X / (K_{\text{obs}} + X)$, em que $V_{\max}$ é a velocidade máxima da enzima, X é a concentração de substrato e K_{obs} é a concentração de substrato necessária para

atingir a metade da velocidade enzimática máxima.

As concentrações inibitórias médias (IC_{50}) foram calculadas ajustando os dados obtidos no ensaio de inibição à equação: $Y = Bottom + (Top - Bottom)/(1 + 10^{((\log IC_{50} - X) * HillSlope)})$, em que *Top* e *Bottom* correspondem aos platôs superiores e inferiores, respectivamente, nas unidades da taxa de reação; IC_{50} é a concentração do inibidor que gera uma resposta intermediária entre *Top* e *Bottom*, *X* é o logaritmo da concentração do inibidor; e *HillSlope* descreve a inclinação das curvas.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata experimental, sendo que todos os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. A análise dos dados empregou o programa *GraphPad PRISM* versão 8.0 para o sistema operacional Microsoft Windows e estes foram representados como a média $\pm$ o erro padrão.

3.11. Triagens de cristalização para PbDHPS, HcDHPS e BmDHPS

Na tentativa de obtenção de cristais para PbDHPS (278,8 μ M), HcDHPS (361,2 μ M) e BmDHPS (267,8 μ M), foram realizados os seguintes procedimentos adaptados de trabalhos anteriores (COUÑAGO et al., 2017; SILVA et al., 2020): uma solução contendo quantidades equimolares de NAD^+ e GC7, diluídos no tampão SEC, foi adicionada à construção *full-length* purificada de cada DHPS, a um excesso molar de 3 vezes e incubados em gelo por 1 h. Após esse processo, a concentração original das DHPSs foi restabelecida através de um concentrador *Amicon Ultra Centrifugal Filters 10k* (Merck Millipore) por centrifugação a 12000 $\times g$ por 10 min a 4 °C, seguido do preparo de gotas de 150 nL constituídas por três proporções diferentes (2:1, 1:1 ou 1:2) da mistura DHPS/ NAD^+ /GC7 e da solução reservatório proveniente dos seguintes kits comerciais de cristalização: JCSG7, LFS6, HIN3, HCS3 e Morpheus (Molecular Dimensions).

Os experimentos de cristalização foram realizados em placas de cristalização SWISSCI 3-well low-profile (Hampton research) a 20 °C para PbDHPS, HcDHPS e BmDHPS e também a 8 °C para PbDHPS. Os cristais obtidos foram crioprotetidos na solução reservatório suplementada com 30% de glicerol antes do congelamento em nitrogênio líquido. Os dados de difração foram coletados no *Diamond Light Source* (DLS, Didcot OX11 0DE, Reino Unido).

3.12. Resolução da estrutura da BmDHPSA e da HcDHPSA

Os dados de difração obtidos através dos cristais da BmDHPSA e da HcDHPS foram integrados através do programa XDS (KABSCH, 2010) e redimensionados utilizando o programa AIMLESS do pacote CCP4 (WINN et al., 2011). A substituição molecular foi realizada com o programa Phaser (MCCOY et al., 2007) utilizando a HsDHPS como modelo (PDB ID 1DHS) (LIAO et al., 1998). O refinamento foi realizado no programa REFMAC5 (MURSHUDOV et al., 2011). O programa Coot (EMSLEY et al., 2010) foi utilizado para construção e refinamento manual do modelo. Os átomos de NAD⁺ ligados à BmDHPS foram refinados com ocupação total (1,0). A validação da estrutura cristalográfica foi realizada no programa MolProbity (CHEN et al., 2010). Fatores estruturais e coordenadas da BmDHPS e da HsDHPS estão listados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

As interfaces das proteínas foram calculadas usando o servidor online *Protein interfaces, surface and assemblies* (PISA) (KRISSINEL; HENRICK, 2007). A estrutura cristalográfica da BmDHPSA foi alinhada com as coordenadas da estrutura da HsDHPS ligada a espermidina (PDB ID 6XXK) (WAȦTOR; WILK; GRUDNIK, 2020) através do programa *Pymol* (Schrödinger, Inc). A sobreposição estrutural foi utilizada para a comparação dos sítios de ligação à esperdimina entre a estrutura da HsDHPS e da BmDHPSA.

Tabela 5. Dados cristalográficos e estatística de refinamento para a estrutura da BmDHPSA.

Coleta de dados^a	
Cristal	Nativo
PDB ID	6W3Z
Linha de luz	I24 - <i>Diamond Light Source</i>
Comprimento de onda (Å)	0,9686
Grupo espacial	P 1 2 ₁ 1
Parâmetros da cela unitária	
a; b; c (Å)	69,753; 136,320; 75,883
α; β; γ (°)	90,00; 92,92; 90,00
Faixa de resolução (Å)	29,41-2,30 (2,36-2,30)
Número de reflexões únicas	62547 (4609)
R _{merge} (%)	11,2 (75,2)
Média I/σI	5,4 (1,1)
Média CC _{1/2}	0,99 (0,57)
Completeza (%)	99,6 (99,7)
Redundância	3,3 (3,4)
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	29,41-2,30 (2,36-2,30)
R _{work} / R _{free} (%)	18,8 (29,7) / 21,6 (30,6)
Número de átomos / Média fator B (Å)	
Átomos da proteína	10533 / 37,7
Átomos do solvente	397 / 37,4
Átomos de NAD ⁺	132 / 85,3
Desvio da idealidade	
Comprimento da ligação	0,0045 Å
Ângulo da ligação	1,26°
Análise de Ramachandran (%)	
Regiões favoráveis	98,5
Regiões permitidas	1,5
Regiões proibidas	0

^a: Os valores entre parênteses se referem à última faixa de resolução.

Fonte: autoria própria.

Tabela 6. Dados cristalográficos e estatística de refinamento para a estrutura da HcDHPSA.

Coleta de dados^a	
Cristal	Nativo
Linha de luz	I24 - <i>Diamond Light Source</i>
Comprimento de onda (Å)	0,9686
Grupo espacial	P 6 ₄ 2 2
Parâmetros da cela unitária	
a; b; c (Å)	85,77; 85,77; 199,45
α; β; γ (°)	90,00; 90,00; 120,00
Faixa de resolução (Å)	19,86-2,10 (2,16-2,10)
Número de reflexões únicas	26213 (2105)
R _{merge} (%)	16,7 (45,4)
Média I/σI	18,0 (1,3)
Média CC _{1/2}	0,99 (0,96)
Completeza (%)	99,9 (100,0)
Redundância	37,9 (39,0)
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	19,86-2,10 (2,16-2,10)
R _{work} / R _{free} (%)	21,1 / 24,3
Desvio da idealidade	
Comprimento da ligação	0,0024 Å
Ângulo da ligação	1,17°
Análise de Ramachandran (%)	
Regiões favoráveis	98,1
Regiões permitidas	1,9
Regiões proibidas	0

^a: Os valores entre parênteses se referem à última faixa de resolução.

Fonte: autoria própria.

3.13. Determinação do estado oligomérico da BmDHPSA

O estado oligomérico da BmDHPSA em solução foi determinado utilizando a coluna *Superdex 200 10/300 GL* (Merck) pré-equilibrada com tampão de SEC conectada ao ÄKTA pure (GE Healthcare). Foram realizadas três corridas diferentes para obter a curva padrão e o volume morto, na qual duas corridas foram realizadas com uma mistura de proteínas padrão e a outra continha azul dextrano 2000, provenientes dos kits *Gel Filtration Calibration Low Molecular Weight and High Molecular Weight* (GE Healthcare).

As proteínas foram solubilizadas em tampão SEC (HEPES 20 mM pH 7,5; NaCl 300 mM; glicerol 5%; TCEP 0,5 mM). O fluxo do ÄKTA pure (GE Healthcare) foi ajustado para 0,4 mL por min e 1 mg de cada proteína padrão foi carregado em uma injeção de 500 µL. Primeiramente, foi aplicado o azul dextran 2000, para obter o volume morto, seguido pela primeira mistura de proteínas composta pela catalase (232 kDa), conalbumina (75 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). A segunda mistura de proteínas era composta pela aldolase (158 kDa), ovoalbumina (44 kDa) e Ribonuclease A (13,7 kDa). Após esse processo, 900 µg da BmDHPSA purificada foram aplicados na coluna.

Os volumes de eluição foram utilizados para calcular os valores dos coeficientes de partição (K_{av}) de cada proteína, de acordo com a seguinte equação: $K_{av} = (V_E - V_0)/(V_C - V_0)$, onde V_E , V_0 e V_C são os volumes de eluição, volume morto e volume da coluna, respectivamente. Os valores de K_{av} foram plotados contra o logaritmo da massa molecular das proteínas para calcular a equação da curva e descobrir a massa da BmDHPSA em solução.

3.14. *High-throughput drug screening in vitro* com a LdDHPSA-cb002+ LdDHPSB-cb002

3.14.1. Coleções de compostos

Duas coleções de moléculas pequenas, MMV12K BF3 (12691 compostos) e MMV14K HGL (14080 compostos), foram generosamente fornecidas pela *Medicines for Malaria Venture* (MMV) como estoques a 10 mM em DMSO. Esses compostos foram testados na triagem inicial a uma concentração de 10 µM contra a LdDHPS

(LdDHPSAcb002+LdDHPSBcb002).

3.14.2. Ensaio enzimático baseado na fluorescência do NADH

A atividade das DHPSSs foi monitorada através da quantificação da fluorescência do NADH gerado pela redução do cofator NAD^+ catalizada pelas DHPSSs (WOLFF; WOLFF; PARK, 2000), basenando-se em trabalhos anteriores (PARK et al., 2017; SILVA et al., 2020). Durante a padronização do ensaio, as reações foram realizadas à temperatura ambiente em uma microplaca preta de 384 poços (Corning Low Volume) em um volume final de 25 μL . As DHPSSs recombinantes foram diluídas para 1 μM no meio reacional contendo glicina/NaOH 0,1 M pH 8,8; glicerol 5%; Tween 20 0,025%; DTT 1 mM. Este pH foi escolhido porque forneceu a maior atividade para as *Leishmania sp.* DHPSSs (dados não mostrados).

Além disso, foram realizados ensaios para determinar as concentrações de enzima e os tempos de reação necessários para produzir cinética linear da reação (dados não mostrados). As medições foram registradas a cada 50 s após o início da reação, por um período total de 50 min, utilizando o leitor de placas *Envision Plate Reader* (Perkin Elmer) configurado para os seguintes comprimentos de onda: excitação a 340 nm e emissão a 460 nm.

Considerando que as concentrações da espermidina e do NAD^+ variaram ao longo dos ensaios enzimáticos, a Tabela 7 abaixo resume a concentração final desses componentes em cada experimento realizado.

Depois de estabelecer os K_{obs} do NAD^+ e da espermidina para as DHPSSs de interesse (Tabela 7), da mesma forma como descrito em detalhes no tópico 3.10, foi realizado um *high-throughput drug screening in vitro* com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 contra a coleção de compostos MMV12K BF3. Neste caso, a composição final da reação foi: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 1 μM (tetrâmero) diluída no meio reacional [glicina/NaOH 0,1 M pH 8,8; glicerol 5%; Tween 20 0,025%; DTT 1 mM; NAD^+ ($1,5 \times K_{\text{obs}}$; Tabela 7)] e 10 μM do candidato a inibidor. Essa mistura foi incubada por 40 min a temperatura ambiente e a reação foi iniciada adicionando a espermidina ($1,5 \times K_{\text{obs}}$; Tabela 7), completando o volume final da reação para 25 μL .

Tabela 7. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos com a LdDHPSAB, LmDHPSAB e HsDHPS.

Enzima	Experimento	[NAD ⁺] (μ M)	[Espermidina] (μ M)	[DHPS] (tetramero) (μ M)
LdDHPSA-cb002 +	Titulação do NAD ⁺	2000 a 0,97	1000	1
	Titulação da espermidina	1000	2000 a 0,01	1
LdDHPSB-cb002	<i>Drug screening</i> (fluorescência)	91,8	5,1	1
LmDHPSA-cb018 +	Titulação do NAD ⁺	2000 a 0,01	1000	1
	Titulação da espermidina	1000	2000 a 0,01	1
LmDHPSB-cb10	<i>Drug screening</i> (fluorescência)	58,1	47,2	1
HsDHPS	Titulação do NAD ⁺	2000 a 0,04	1000	1
	Titulação da espermidina	45	1000 a 0,006	1
	<i>Drug screening</i> (fluorescência)	23	2	1

Fonte: autoria própria.

O sinal de fluorescência foi monitorado em um comprimento de onda de excitação de 340 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm, no leitor de microplacas EnVision (PerkinElmer). Como controle de 0% de atividade enzimática, o inibidor GC7 a 10 μ M foi adicionado no lugar dos candidatos a inibidor em 16 poços na placa de ensaio (linha 23); e, como controle do efeito do solvente (100% de atividade enzimática), foi adicionado DMSO no lugar dos candidatos a inibidor em 16 poços na placa de ensaio (linha 24). Os valores de fluorescência para os controles não inibidos (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 suplementada com DMSO) e totalmente inibidos (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 tratada com GC7 10 μ M) foram determinados e o Z-score foi calculado de acordo com a literatura (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999). Considerando que a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 tratada com o GC7 representava uma inibição de 100%, os compostos que causaram uma inibição maior do que 60% sobre a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 foram considerados como compostos “hit”.

3.14.3. Ensaio enzimático baseado em luminescência utilizando a reação acoplada NAD⁺/NADH-Glo™

O ensaio foi realizado empregando o kit NAD⁺/NADH-Glo™ (Promega) seguindo as recomendações do fabricante adaptadas de acordo com estudos anteriores empregando a HsDHPS (LIU et al., 2021a; PARK et al., 2017). Depois de estabelecer o K_{obs} para o NAD⁺ e para a espermidina para cada enzima de interesse (Tabela 7) pelo ensaio baseado na fluorescência do NADH descrito anteriormente, foi realizado um ensaio HTS com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 em uma microplaca branca de 384 poços (Corning Low Volume) contra as coleções de moléculas pequenas MMV12K BF3 e MMV14K HGL.

A composição da reação para o *screening* primário foi: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 65 nM (tetrâmero) diluída no tampão de ensaio [glicina/NaOH 0,1 M pH 8,8; glicerol 5%; Tween 20 0,025%; DTT 1 mM; NAD⁺ (1,5 x K_{obs} ; Tabela 7)] e 10 µM do candidato a inibidor. Essa mistura foi incubada por 40 min a temperatura ambiente e a reação foi iniciada pela adição de espermidina (1,5x K_{obs} ; Tabela 7), completando o volume final da reação para 10 µL.

A placa foi coberta e a mistura foi incubada a 37 °C por 2 h, sob agitação. As placas foram removidas da incubadora e equilibradas à temperatura ambiente por 10 min. Após esse processo, 7 µL do reagente NAD⁺/NADH-Glo™ foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 10 min. O sinal de luminescência foi medido em um leitor de microplacas EnVision (PerkinElmer). Como controle de 0% de atividade, a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 foi desnaturada a 95 °C por 5 min e adicionada no lugar da enzima intacta em 16 poços na placa do ensaio (linha 23); e, como controle do efeito do solvente, foi adicionado DMSO no lugar do inibidor em 16 poços na placa do ensaio (linha 24). Os valores de fluorescência para os controles não inibidos (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 suplementada com DMSO) e totalmente inibidos (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 fervida) foram determinados e o Z-score foi calculado de acordo com a literatura (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999). Considerando que a LdDHPS fervida representava uma inibição de 100%, os compostos que proporcionaram uma inibição maior do que 60% sobre a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 foram considerados como compostos “hit”.

Além disso, foi realizado um contra ensaio com os compostos que promoveram a diminuição do sinal de luminescência, com o intuito de identificar falsos-positivos, ou seja, compostos que promoveram a inibição da atividade das enzimas do kit NAD⁺/NADH-Glo™. Os compostos que inibiram o sinal de luminescência em mais de 15% na reação contendo NADH 1 µM diluído no tampão de ensaio foram considerados como falsos-positivos ou insuficientemente seletivos para estudos posteriores (CRAIG et al., 2016). Após esta etapa, todos os *hits* restantes foram testados novamente e analisados posteriormente por ensaios de concentração-resposta.

Análises de regressão não linear foram realizadas para calcular os IC₅₀, ajustando os dados à equação: $Y=100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X)*\text{HillSlope}))})$, onde IC₅₀ é a concentração do inibidor que gera uma resposta intermediária entre os platôs *Top* e *Bottom*, X é o logaritmo da concentração do inibidor e *HillSlope* descreve a inclinação das curvas. Os experimentos foram conduzidos em duplicata experimental, sendo que todos os experimentos foram repetidos duas vezes. A análise dos dados empregou o programa *GraphPad PRISM* versão 8.0 para o sistema operacional Microsoft Windows e estes foram representados como a média ± erro padrão.

3.15. Ensaio enzimático com a LmDHPSA-cb018+ LmDHPSB-cb010 e HsDHPS

A atividade das DHPSSs foi monitorada através da quantificação da fluorescência do NADH gerado pela redução do cofator NAD⁺ catalizada pelas DHPSSs (WOLFF; WOLFF; PARK, 2000), basenando-se em trabalhos anteriores (PARK et al., 2017; SILVA et al., 2020). Os ensaios foram realizados a 25 °C, utilizando placas pretas de 384 poços (Corning Low Volume). Todas as reações foram realizadas em tampão contendo glicina/NaOH 0,2 M pH 8,8; glicerol 5%; e DTT 1 mM em um volume final de 15 µL. Cabe aqui ressaltar que esse pH de 8,8 foi utilizado pois foi o que proporcionou a maior atividade para as DHPSSs estudadas. Ainda, foram realizados ensaios para determinar as concentrações das enzimas e os tempos de reação necessários para produzir a cinética linear da reação (dados não mostrados).

As leituras foram registradas a cada 45 s após o início da reação (adição de NAD⁺ ou espermidina) por um período de 50 min através de um leitor de placas *CLARIOstar plate reader* (BMG Labtech) empregando o comprimento de onda de 355 ± 15 nm e de 445 ± 20 nm para a excitação e para a emissão, respectivamente.

Considerando que as concentrações do substrato espermidina e do cofator NAD^+ sofreram variações durante os diferentes ensaios enzimáticos realizados, a Tabela 8 a seguir resume a concentração final desses componentes em cada experimento.

Tabela 8. Concentração dos reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos com a LmDHPSAB e a HsDHPS.

Enzima	Experimento	[NAD^+] μM	[Espermidina] μM	[Inibidores] μM	[DHPS] nM (tetrâmero)
LmDHPSA-cb018 +	Titulação do NAD^+	0,97 a 1000	100	-	500
	Titulação da espermidina	300	0,06 a 10000	-	500
LmDHPSB-cb010	IC_{50} dos inibidores	108	21,5	0,49 a 1000	500
	Titulação do NAD^+	0,06 a 2000	50	-	500
HsDHPS	Titulação da espermidina	60	0,01 a 2000	-	500
	IC_{50} dos inibidores	25,5	3,1	0,49 a 1000	500

Fonte: autoria própria.

Cabe aqui destacar que foi preparada uma condição “branco”, que era constituída por todos os componentes da reação, com exceção da enzima, para cada um desses ensaios. A média dos valores de fluorescência obtidos para o branco foi subtraída das demais condições.

Ainda, no ensaio para a determinação dos IC_{50} dos compostos MMV1674024 e MMV1732934, os componentes da reação, com exceção da espermidina, foram incubados por 40 min à temperatura ambiente. Após esse período, a reação foi iniciada pela adição da espermidina.

As velocidades iniciais das reações empregando concentrações variáveis de NAD^+ ou de espermidina foram estimadas a partir das curvas de progresso da reação pelo ajuste não linear por mínimos quadrados da fase linear da reação. A dependência das velocidades iniciais pela concentração do substrato ou do cofator foi ajustada a uma hipérbole: $Y = V_{\text{max}} \cdot X / (K_{\text{obs}} + X)$, em que V_{max} é a velocidade máxima da enzima, X é a concentração de substrato e K_{obs} é a concentração de substrato necessária para atingir a metade da velocidade enzimática máxima.

Os IC_{50} foram calculados ajustando os dados obtidos no ensaio de inibição à equação: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \cdot \text{HillSlope})})$, em que *Top* e *Bottom* correspondem aos platôs superiores e inferiores, respectivamente, nas

unidades da taxa de reação; IC_{50} é a concentração do inibidor que gera uma resposta intermediária entre *Top* e *Bottom*; X é o logaritmo da concentração dos compostos e HillSlope descreve a inclinação das curvas.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata experimental, sendo que todos os experimentos foram repetidos duas vezes. A análise dos dados empregou o programa *GraphPad PRISM* versão 8.0 para o Windows e estes foram representados como a média $\pm$ o erro padrão.

3.16. Análise do perfil de inibição do composto MMV1674024 sobre a LmDHPSAB

Para avaliar se o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 seria capaz de demonstrar um perfil de inibição conhecido, foi realizada a titulação da espermidina na presença de concentrações crescentes do GC7 (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 Mm), que corresponde a um inibidor competitivo pelo sítio de ligação à espermidina nas DHPSs de mamíferos (JAKUS et al., 1993). A titulação da espermidina foi realizada nas condições descritas no tópico 3.15 e na Tabela 8. Os dados foram analisados como descrito no tópico 3.15.

Para avaliar o tipo de inibição que o composto MMV1674024 causa sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010, foi realizada uma titulação do cofator NAD^+ e do substrato espermidina na presença de concentrações crescentes do composto MMV1674024 (0, 10, 15, 20 e 30 μM). Essas titulações foram realizadas nas condições descritas no tópico 3.15 e na Tabela 8. Os dados foram analisados como descrito no tópico 3.15.

3.17. Triagens de cristalização com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010

Na tentativa de obtenção de cocristais para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (338 μM do monômero ou 84,5 μM do tetrâmero) e o composto MMV1674024, foram realizados os seguintes procedimentos (COUÑAGO et al., 2017; SILVA et al., 2020): soluções contendo quantidades equimolares de NAD^+ e do composto MMV1674024 diluídos no tampão SEC, ou apenas o composto MMV1674024 diluído no tampão SEC, foram misturadas com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010

purificada, a um excesso molar de 10 vezes e incubados em gelo por 3 h. Após esse processo, a concentração original da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 foi restabelecida através de um concentrador *Amicon Ultra Centrifugal Filters 10k* (Merck Millipore) por centrifugação a 12000 $\times g$ por 10 min a 4 °C, seguido do preparo de gotas de 150 nL constituídas por três proporções diferentes (2:1, 1:1 ou 1:2) da mistura LmDHPS/NAD⁺/MMV1674024 ou da mistura LmDHPS/MMV1674024 em relação à solução reservatório proveniente dos seguintes kits comerciais de cristalização: HCS3, HIN3, JCSG7, LFS6, BCS5, SaltRx2 e Morpheus (Molecular Dimensions).

Os experimentos de cristalização foram realizados em placas de cristalização SWISSCI 3-well *low-profile* (Hampton research) a 20 °C. Os cristais obtidos foram crioprottegidos na solução reservatório suplementada com etilenoglicol 20% antes do congelamento em nitrogênio líquido. Os dados de difração foram coletados no *Advanced Photon Source* (APS; Lemont, Illinois-EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clonagem das DHPs dos patógenos eucariotos no vetor de expressão em *E. coli*

Foram desenhados conjuntos de oligonucleotídeos que amplificavam as sequências *full-length* e sequências parciais de cada DHPs de interesse (Tabela 3). Essas sequências parciais geram proteínas truncadas, com trechos possivelmente não estruturados removidos, o que pode favorecer a produção das DHPs solúveis em *E. coli* e a aquisição de estruturas compactas durante os ensaios de cristalização (GILEADI et al., 2008; SAVITSKY et al., 2010).

Para o desenho dessas construções, foi realizada uma busca pela melhor correspondência no PDB para as DHPs, através da ferramenta BLAST (MADDEN; TATUSOV; ZHANG, 1996). Esta pesquisa identificou a HsDHPs (PDB ID: 1RLZ) (UMLAND et al., 2004) como o homólogo mais próximo presente nesse banco de dados.

O alinhamento múltiplo das sequências das DHPs de interesse com a sequência da HsDHPs, através do software de predição de estrutura secundária GenomeThreader (GREMME et al., 2005), foi empregado para determinar os limites de domínio nessas proteínas, permitindo assim, a princípio, o desenho de 31 construções para os quatro patógenos alvo desse estudo: três construções para a PbDHPs; 16 construções para a HcDHPs; quatro construções para a BmDHPs; e oito construções para a LmDHPs (quatro para cada isoforma) (Tabela 9). A Figura Suplementar 3 compreende a representação das principais construções utilizadas neste trabalho.

Foram obtidos amplicons para todas as construções planejadas. Estes foram posteriormente clonadas no vetor de expressão em *E. coli* pNIC28-Bsa4 (Tabela 2) via LIC. Ainda, as clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e sequenciamento de DNA (dados não mostrados).

Tabela 9. Informações detalhadas sobre as construções das DHPSs alvo deste estudo.

Construção	Combinação de oligonucleotídeos		Vetor de expressão	Tamanho do amplicon (pb)	Massa molecular (Da)	
	<i>Forward</i> ^a	<i>Reverse</i> ^b			com tag	sem tag
PbDHPSA-cb001	PbDHPSA F1 (1)	PbDHPSA R1 (358)	pNIC28-Bsa4	1104	41922,0	39456,3
PbDHPSA-cb002	PbDHPSA F2 (3)	PbDHPSA R1 (358)	pNIC28-Bsa4	1101	41807,9	39342,2
PbDHPSA-cb003	PbDHPSA F3 (7)	PbDHPSA R1 (358)	pNIC28-Bsa4	1089	41377,4	38911,8
HcDHPSA-cb001	HcDHPSA F1 (1)	HcDHPSA R1 (381)	pNIC28-Bsa4	1173	43993,5	41527,9
HcDHPSA-cb002	HcDHPSA F1 (1)	HcDHPSA R4 (364)	pNIC28-Bsa4	1122	42165,5	39699,9
HcDHPSA-cb003	HcDHPSA F1 (1)	HcDHPSA R3 (371)	pNIC28-Bsa4	1143	43019,4	40553,8
HcDHPSA-cb004	HcDHPSA F1 (1)	HcDHPSA R2 (376)	pNIC28-Bsa4	1158	43460,9	40995,3
HcDHPSA-cb005	HcDHPSA F2 (5)	HcDHPSA R1 (381)	pNIC28-Bsa4	1164	43751,3	41285,6
HcDHPSA-cb006	HcDHPSA F2 (5)	HcDHPSA R4 (364)	pNIC28-Bsa4	1113	41923,2	39457,6
HcDHPSA-cb007	HcDHPSA F2 (5)	HcDHPSA R3 (371)	pNIC28-Bsa4	1134	42777,2	40311,6
HcDHPSA-cb008	HcDHPSA F2 (5)	HcDHPSA R2 (376)	pNIC28-Bsa4	1149	43218,7	40753,1
HcDHPSA-cb009	HcDHPSA F3 (10)	HcDHPSA R1 (381)	pNIC28-Bsa4	1149	43321,8	40856,2
HcDHPSA-cb010	HcDHPSA F3 (10)	HcDHPSA R4 (364)	pNIC28-Bsa4	1098	41493,8	39028,2
HcDHPSA-cb011	HcDHPSA F3 (10)	HcDHPSA R3 (371)	pNIC28-Bsa4	1119	42347,8	39882,2
HcDHPSA-cb012	HcDHPSA F4 (10)	HcDHPSA R2 (376)	pNIC28-Bsa4	1134	42789,3	40323,6
HcDHPSA-cb013	HcDHPSA F4 (13)	HcDHPSA R1 (381)	pNIC28-Bsa4	1140	43064,5	40598,9
HcDHPSA-cb014	HcDHPSA F4 (13)	HcDHPSA R4 (364)	pNIC28-Bsa4	1089	41236,5	38770,9
HcDHPSA-cb015	HcDHPSA F4 (13)	HcDHPSA R3 (371)	pNIC28-Bsa4	1110	42090,5	39624,9
HcDHPSA-cb016	HcDHPSA F4 (13)	HcDHPSA R2 (376)	pNIC28-Bsa4	1125	42532,0	40066,4
BmDHPSA-cb001	BmDHPSA F1 (1)	BmDHPSA R1 (366)	pNIC28-Bsa4	1128	43548,6	41083,0
BmDHPSA-cb002	BmDHPSA F2 (4)	BmDHPSA R1 (366)	pNIC28-Bsa4	1122	43319,4	40853,8
BmDHPSA-cb003	BmDHPSA F3 (7)	BmDHPSA R1 (366)	pNIC28-Bsa4	1113	43045,1	40579,5
BmDHPSA-cb004	BmDHPSA F4 (9)	BmDHPSA R1 (366)	pNIC28-Bsa4	1107	42769,7	40304,1

LmDHPSA-cb001	LmDHPSA F1 (1)	LmDHPSA R1 (601)	pNIC28-Bsa4	1833	66890,7	64425,1
LmDHPSA-cb002	LmDHPSA F1 (1)	LmDHPSA R4 (576)	pNIC28-Bsa4	1758	64062,6	61597,0
LmDHPSA-cb003	LmDHPSA F1 (1)	LmDHPSA R3 (582)	pNIC28-Bsa4	1776	64833,4	62367,8
LmDHPSA-cb004	LmDHPSA F1 (1)	LmDHPSA R2 (592)	pNIC28-Bsa4	1806	65913,6	63448,0
LmDHPSA-cb005 ^c	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R7 (601)	pNIC28-Bsa4	1833	66890,7	64425,1
LmDHPSA-cb006 ^c	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R15 (576)	pNIC28-Bsa4	1758	64062,6	61597,0
LmDHPSA-cb007 ^c	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R13 (582)	pNIC28-Bsa4	1776	64833,4	62367,8
LmDHPSA-cb008 ^c	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R10 (592)	pNIC28-Bsa4	1806	65913,6	63448,0
LmDHPSB-cb001	LmDHPSB F1 (1)	LmDHPSB R1 (379)	pNIC28-Bsa4	1167	43377,7	40912,0
LmDHPSB-cb002	LmDHPSB F2 (10)	LmDHPSB R1 (379)	pNIC28-Bsa4	1143	42613,8	40148,2
LmDHPSB-cb003	LmDHPSB F3 (15)	LmDHPSB R1 (379)	pNIC28-Bsa4	1128	42074,2	39608,5
LmDHPSB-cb004	LmDHPSB F4 (32)	LmDHPSB R1 (379)	pNIC28-Bsa4	1077	40457,4	37991,8
LmDHPSB-cb005 ^c	LmDHPSB F6 (1)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC28-Bsa4	1167	43377,7	40912,0
LmDHPSB-cb006 ^c	LmDHPSB F10 (10)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC28-Bsa4	1143	42613,8	40148,2
LmDHPSB-cb007 ^c	LmDHPSB F11 (15)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC28-Bsa4	1128	42074,2	39608,5
LmDHPSB-cb008 ^c	LmDHPSB F15 (32)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC28-Bsa4	1077	40457,4	37991,8

^{a, b}: Os números entre parênteses representam o primeiro (^a) e o último (^b) aminoácido da ORF (*open reading frame*) predita;

^c: Construções de LmDHPS obtidas a partir dos genes sintéticos com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli*.

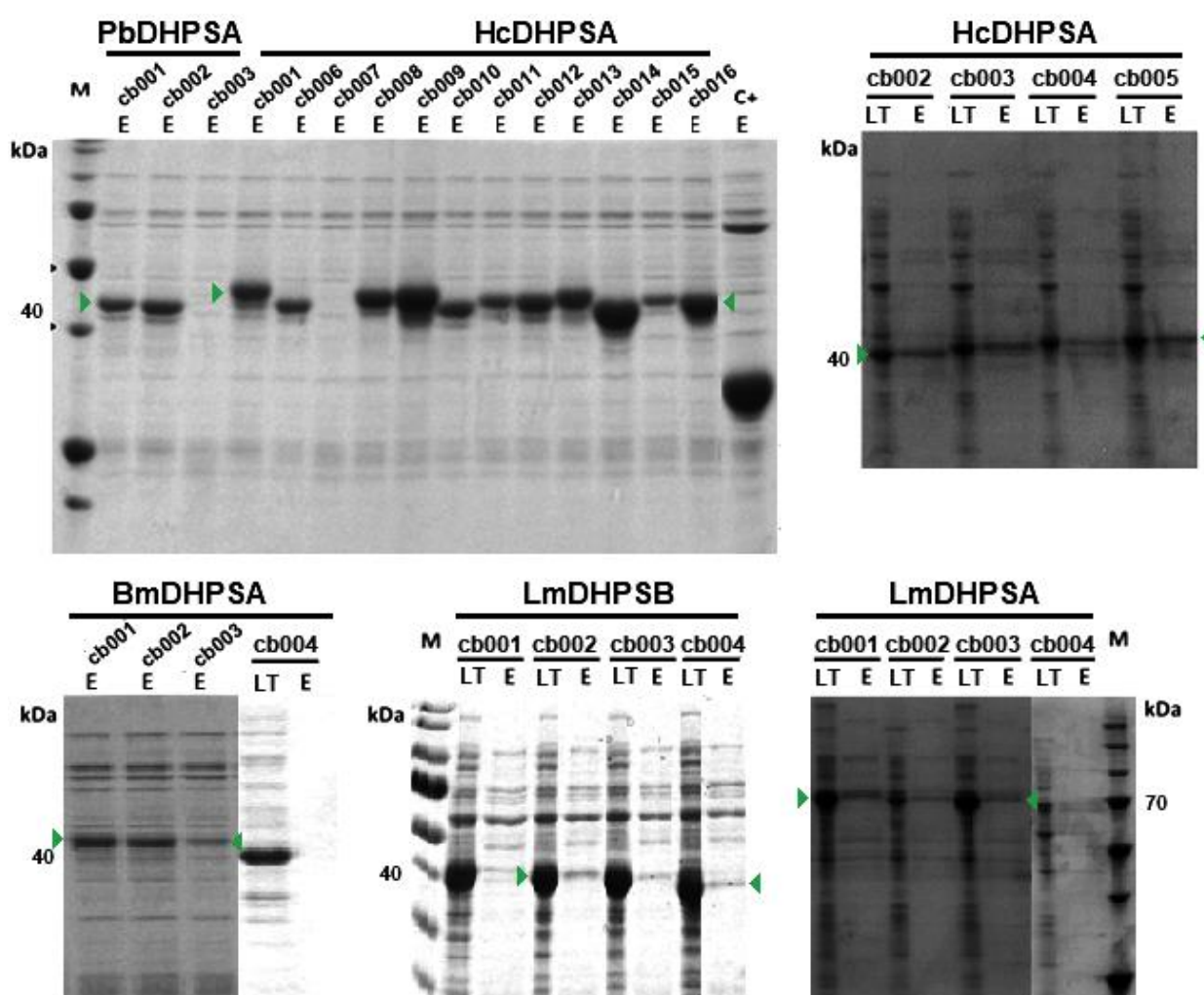
Fonte: autoria própria.

4.2. Teste de expressão em *E. coli* das DHPs dos patógenos eucariotos em pequena escala (volume cultura = 1 mL)

Com o intuito de determinar as melhores construções e as condições para a produção das DHPs de interesse, os clones confirmados foram submetidos ao teste de expressão em pequena escala, utilizando a linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli* (Tabela 1), seguida pela purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (BURGESS-BROWN et al., 2014; SAVITSKY et al., 2010).

Os resultados do teste de expressão em pequena escala realizados com as 31 construções planejadas inicialmente nesse estudo indicaram que algumas dessas construções foram produzidas de forma solúvel nestas células (Figura 10): duas construções da PbDHPSA (cb001 e cb002; tamanho aproximado de 40 kDa), 15 construções da HcDHPSA (apenas a cb007 não foi solúvel; tamanho aproximado de 40 kDa); três construções da BmDHPSA (cb001 a cb003; tamanho aproximado de 40 kDa), três construções da LmDHPSA (cb001 a cb003; tamanho aproximado de 70 kDa; apresentaram-se pouco solúveis) e três construções da LmDHPSB (cb002 a cb004; tamanho aproximado de 40 kDa; apresentaram-se pouco solúveis). Não foram detectadas proteínas solúveis para as demais construções.

Figura 10. SDS-PAGE das frações purificadas obtidas no teste de expressão em pequena escala. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). O tamanho aproximado das construções de PbDHPSA, HcDHPSA, BmDHPSA e LmDHPSB é de 40 kDa; e das construções de LmDHPSA é de 70 kDa. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). LT: lisado total. E: amostras eluídas. C+: controle positivo de expressão de proteínas em *E. coli* utilizado pelo CQMED (resíduos M1 a T248 do gene NANPA clonado em pNIC28-Bsa4; 30,4 kDa). O tamanho aproximado em kDa das construções está indicado na figura. As setas indicam a localização das bandas das DHPSSs.



Fonte: autoria própria.

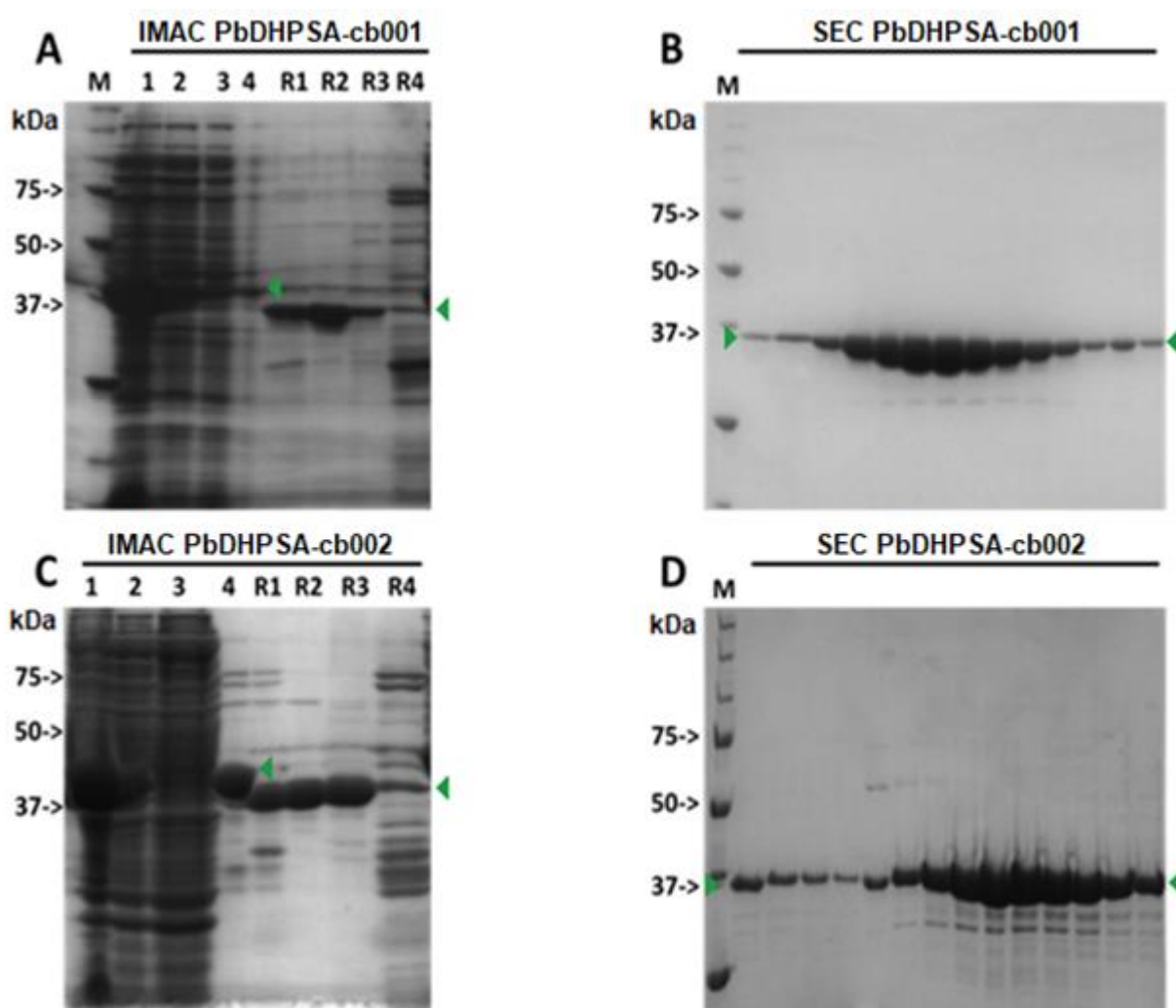
4.3. Produção e purificação em larga escala (volume cultura = 1,5 L) das DHPSS de patógenos eucariotos a partir de *E. coli*

Foi realizado um aumento da escala de produção para seis construções de três organismos: *P. brasiliensis* (PbDHPSA-cb001 e cb002), *H. capsulatum* (HcDHPSA-cb001 e cb002), *B. malayi* (BmDHPSA-cb001 e cb002), que correspondem à proteína *full-length* e uma forma truncada da DHPS para cada organismo. A produção em larga escala dessas DHPSS foi realizada em BL21(DE3)-R3-pRARE2 cultivadas em 1,5 L de meio TB.

Assim como nos ensaios de produção e purificação de proteínas realizados em pequena escala, a IMAC foi empregada como o primeiro método de purificação de proteínas. A análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC revelou que a maioria das DHPSS recombinantes estavam presentes na fração insolúvel. Apesar disso, a IMAC foi capaz de enriquecer as DHPSS oriundas dos lisados celulares clarificados (Figuras 11 a 13).

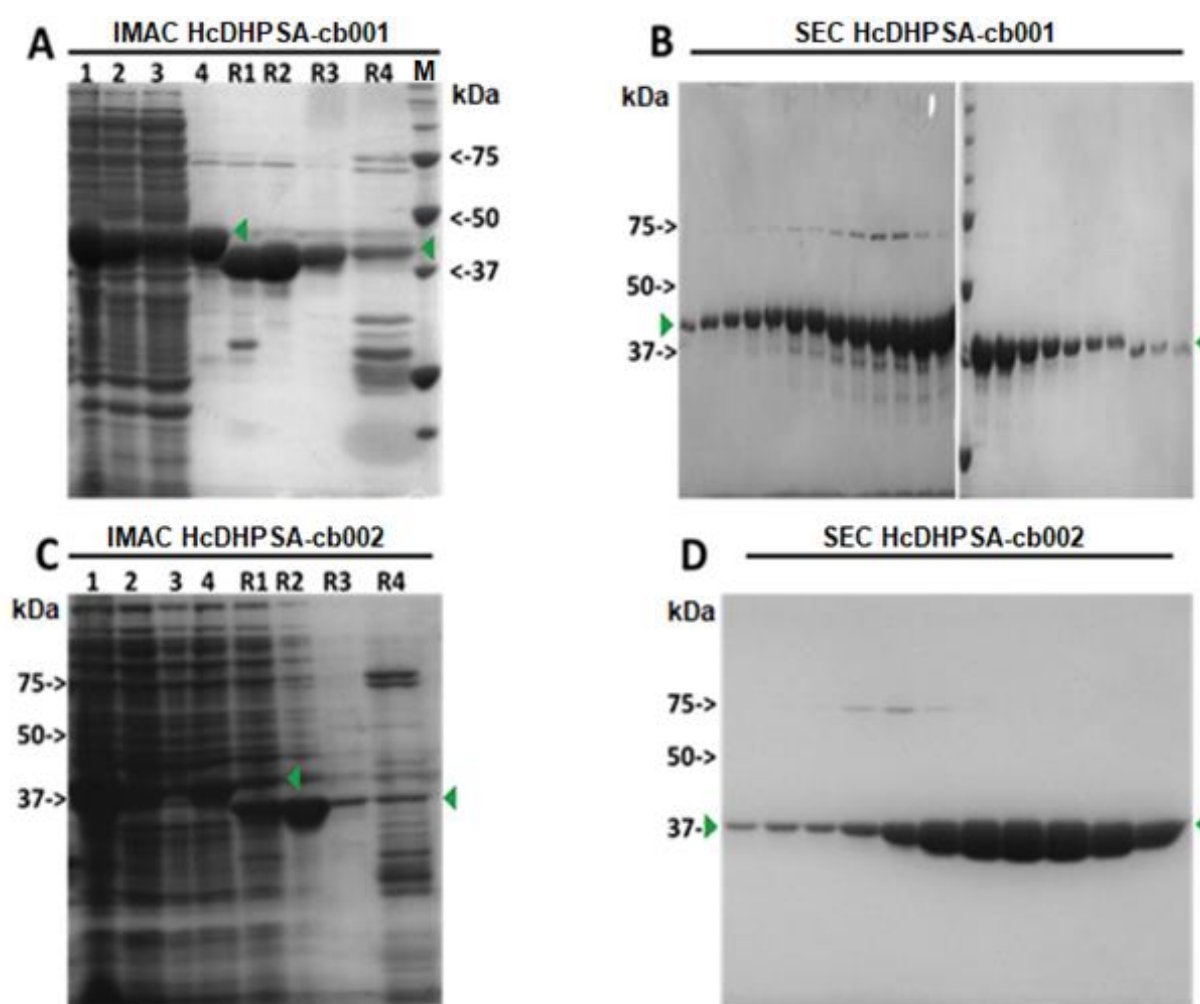
As amostras provenientes da primeira etapa de IMAC foram tratadas com protease TEV, sendo que esse tratamento foi capaz de clivar a *tag* His₆ N-terminal de todas as construções, já que uma mudança visível no tamanho dos DHPSS pode ser observada no gel (Figuras 11-13 A e C). As amostras digeridas com a protease TEV foram submetidas a um segundo processo de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC reversa), com o intuito de remover os contaminantes provenientes da primeira etapa de purificação. Com isso, uma maior proporção das DHPSS foram obtidas a partir da porção *flow-through* (R2) (Figuras 11-13 A e C), enquanto uma boa parcela dos contaminantes, incluindo as DHPSS com *tag* His₆ N-terminal e a protease TEV foram recuperados durante o processo de eluição (R4) (Figuras 11-13 A e C). Uma quantidade substancial de DHPS também foi encontrada na fração de lavagem com 30 mM de imidazol (R3) (Figuras 11-13 A e C) e estas foram reunidas com as respectivas frações *flow-through* (R2) para a etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC) (Figuras 11-13 B e D).

Figura 11. Purificação das construções PbDHPSA-cb001 e PbDHPSA-cb002 em larga escala. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A e C)** Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC: lisado total (1), fração solúvel (2), *flow-through* (3), eluição com imidazol 300 mM (4). Análise por SDS-PAGE da amostra tratada com protease TEV (R1). A fração R1 gerou os seguintes estratos após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (R2), lavagem com imidazol 30 mM (R3) e eluição com imidazol 300 mM (R4). **(B e D)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanhos aproximados das proteínas em kDa, com *tag* = PbDHPSA-cb001: 42; PbDHPSA-cb002: 41,8; sem *tag* = PbDHPSA-cb001: 39,5; PbDHPSA-cb002: 39,3. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas das PbDHPSs.



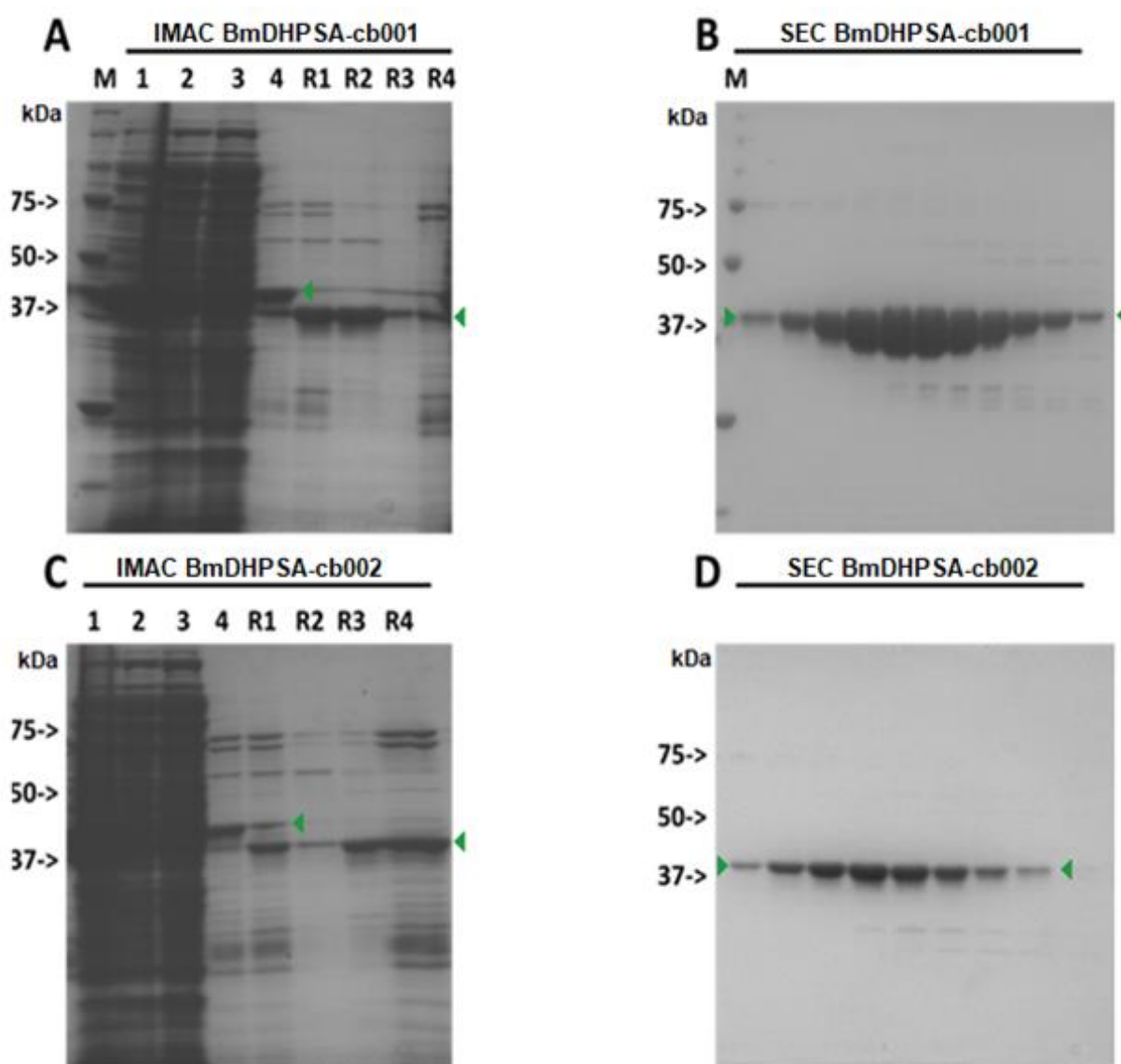
Fonte: autoria própria.

Figura 12. Purificação das construções HcDHPSA-cb001 e HcDHPSA-cb002 em larga escala. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A e C)** Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC: lisado total (1), fração solúvel (2), *flow-through* (3), eluição com imidazol 300 mM (4). Análise por SDS-PAGE da amostra tratada com protease TEV (R1). A fração R1 gerou os seguintes estratos após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (R2), lavagem com imidazol 30 mM (R3) e eluição em imidazol 300 mM (R4). **(B e D)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanhos aproximados das proteínas em kDa, com *tag* = HcDHPSA-cb001: 44; HcDHPSA-cb002: 42; sem *tag* = HcDHPSA-cb001: 41,5; HcDHPSA-cb002: 39,7. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas das HcDHPSs.



Fonte: autoria própria.

Figura 13. Purificação em larga escala das construções BmDHPSA-cb001 e BmDHPSA-cb002 em larga escala. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). (A e C) Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC: lisado total (1), fração solúvel (2), *flow-through* (3), eluição com imidazol 300 mM (4). Análise por SDS-PAGE da amostra tratada com protease TEV (R1). A fração R1 gerou os seguintes estratos após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (R2), lavagem com imidazol 30 mM (R3) e eluição em imidazol 300 mM (R4). (B e D) Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanhos aproximados das proteínas em kDa, com *tag* = BmDHPSA-cb001: 43,5; BmDHPSA-cb002: 43,3; sem *tag* = BmDHPSA-cb001: 41; BmDHPSA-cb002: 40,8. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas das BmDHPSs.

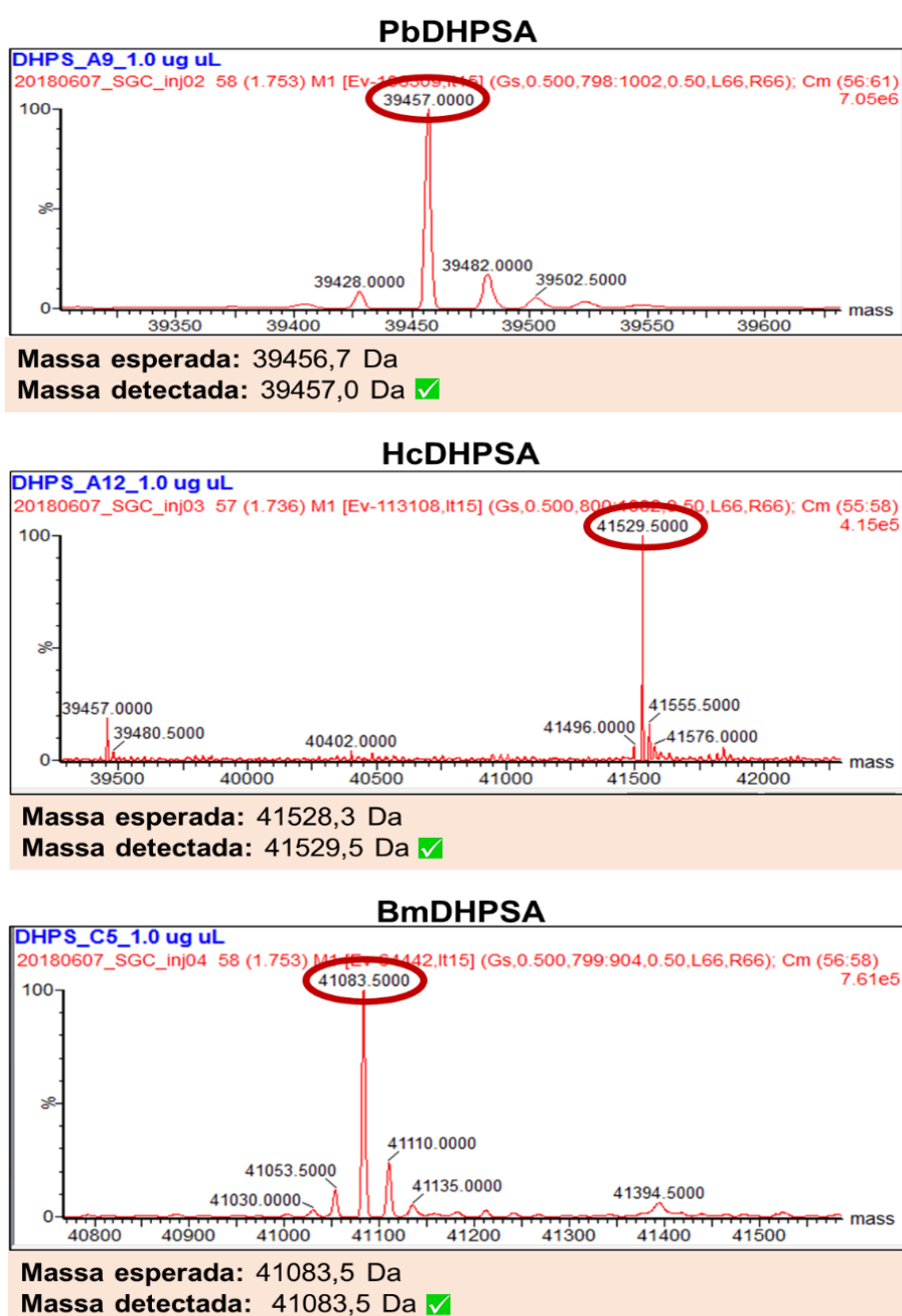


Fonte: autoria própria.

Após essas etapas de purificação, o rendimento proteico obtido foi de 14,7 mg da PbDHPSA-cb001 por L de cultura; 5,4 mg da PbDHPSA-cb002 por L de cultura;

10,9 mg da HcDHPSA-cb001 por L de cultura; 3,4 mg da HcDHPSA-cb002 por L de cultura; 2,8 mg da BmDHPSA-cb001 por L de cultura; 0,6 mg da BmDHPSA-cb002 por L de cultura. Além disso, as versões *full-length* das DHPSS purificadas apresentaram a massa molecular esperada, conforme determinado por espectrometria de massa intacta (Figura 14).

Figura 14. Análise por espectrometria de massa intacta das DHPSS purificadas a partir de culturas em larga escala. Os espectros de massa/carga são mostrados para a PbDHPSA-cb001; a HcDHPSA-cb001 e a BmDHPSA-cb001. Os valores de massa esperados e observados estão indicados na figura.



Fonte: autoria própria.

4.4. Estabelecimento de um ensaio bioquímico simples e aplicável para o rastreamento em larga escala de inibidores para HcDHPSA-cb001, BmDHPSA-cb001 e PbDHPSA-cb001

Um ensaio *in vitro* robusto e sensível corresponde a um componente crítico de uma plataforma de descoberta de fármacos baseados em alvos. Idealmente, os ensaios bioquímicos para rastreamento de inibidores devem ser de baixo custo e passíveis de automação, o que permite a realização de rastreamentos utilizando várias coleções de compostos (SILVA et al., 2020).

Vários ensaios *in vitro* foram descritos previamente para a quantificação da atividade bioquímica das DHPSs (KALTENEGGER et al., 2021; PARK et al., 2017; WOLFF; LEE; PARK, 2011; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). O ensaio convencional utilizado para medir a atividade dessas enzimas baseia-se na incorporação da radioatividade proveniente da ^3H -espermidina em eIF5A (WOLFF; LEE; PARK, 2011). Este ensaio mostrou-se robusto e confiável, mas não pode ser facilmente adaptado para a triagem em larga escala (*high-throughput screening*; HTS) de coleções de compostos (WOLFF; LEE; PARK, 2011). Ainda, uma grande desvantagem desses ensaios é o acúmulo de resíduos radioativos (KALTENEGGER et al., 2021).

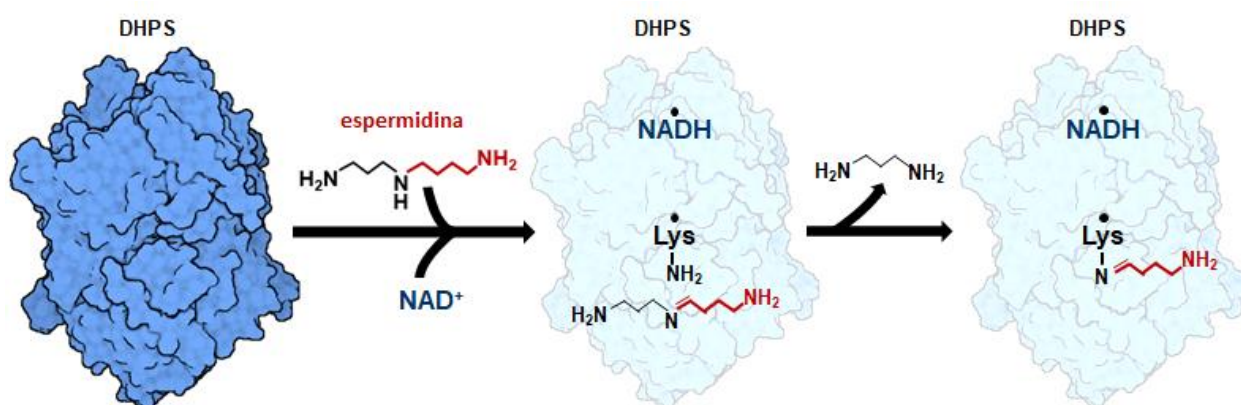
Recentemente, Park e colaboradores desenvolveram um ensaio não radioativo que mede o NADH gerado pela reação parcial das DHPSs através do acoplamento desta reação com o ensaio $\text{NAD}^+/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ (PARK et al., 2017). Este ensaio acoplado baseado na detecção de luminescência pode ser facilmente utilizado para ensaios HTS, mas é suscetível a artefatos que interferem na reação acoplada à luciferase (AULD; INGLESE, 2004; THORNE; AULD; INGLESE, 2010).

Considerando essas informações, o ensaio bioquímico descrito no presente trabalho se baseia na capacidade da DHPS em catalisar uma reação parcial na presença de NAD^+ e espermidina, resultando na formação do intermediário enzima-butilimina e NADH ligado a enzima, na ausência do precursor de eIF5A (WOLFF; FOLK; PARK, 1997) (Figura 15). Assim, neste ensaio, a fluorescência do NADH (pico de emissão de aproximadamente 440 nm) gerado pela reação parcial das DHPSs é mensurada (WOLFF; FOLK; PARK, 1997; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000) (Figura 15). Algumas das vantagens deste ensaio incluem o acoplamento direto do sinal de fluorescência à reação parcial da DHPS, a facilidade de miniaturização para se ajustar

ao formato HTS e os custos reduzidos comparados aos da alternativa NAD⁺/NADH-Glo™ (SILVA et al., 2020).

Ensaio baseado em fluorescência correspondem a um dos métodos de detecção dominantes em ensaios HTS devido à sua alta sensibilidade, rápida velocidade de medição do sinal, alta versatilidade, simplicidade e a forma não destrutiva de rastrear ou analisar alvos (FANG et al., 2019; KOLANOWSKI; LIU; NEW, 2018). Por outro lado, é provável que o uso desse ensaio em rastreamentos HTS exija a utilização de controles, como ocorre no ensaio com NAD⁺/NADH-Glo™, para descartar artefatos que possam fluorescer em comprimentos de onda semelhantes ao NADH (NAPPER; SIVENDRAN, 2011).

Figura 15. Reação parcial catalisada pelas DHPSSs. Mecanismo de reação proposto para as DHPSSs na presença de NAD⁺ e espermidina. A manutenção do aduto covalente entre a lisina catalítica e o grupo butilimina da espermidina mantém a enzima na forma inativa.



Fonte: Adaptada de SILVA et al., 2020.

Para garantir que esse ensaio fosse realmente robusto e sensível, a fluorescência produzida pelo NADH foi mensurada em concentrações crescentes das DHPSSs recombinantes purificadas (HcDHPSSA-cb001, BmDHPSSA-cb001 e PbDHPSS-cb001) na presença de excesso de cofator NAD⁺ e do substrato espermidina (concentrações descritas na Tabela 4 e nas legendas das Figuras 16 a 18). As curvas de progresso da reação permitiram determinar uma concentração de enzima que produziu uma razão entre o sinal/ruído robusta na faixa linear da reação (Figura 16A para HcDHPSSA; Figura 17A para BmDHPSSA e Figura 18A para PbDHPSS). Com base nesses resultados, a concentração de trabalho escolhida para as DHPSSs (tetrâmero) foi de 25 nM.

Com o intuito de definir uma concentração de NAD^+ apropriada para o ensaio, as curvas de progresso da reação foram determinadas na presença de concentrações crescentes desse cofator (0,098 a 100 μM para HcDHPSA; 0,195 a 400 μM para BmDHPSA; 0,39 a 800 μM para PbDHPSA) e uma concentração fixa e excessiva do substrato espermidina (5 μM para HcDHPSA; 0,56 μM para BmDHPSA; 4 μM para PbDHPSA). Essas curvas foram utilizadas para calcular a taxa linear de formação do NADH em várias concentrações de NAD^+ (V_{NAD^+}). Um gráfico dos valores de V_{NAD^+} versus as concentrações de NAD^+ foi utilizado para estabelecer a relação hiperbólica da reação parcial das DHPSS com a concentração do cofator (K_{obs} do NAD^+ para HcDHPSA: $3,08 \pm 0,20 \mu\text{M}$, Figura 16B; K_{obs} do NAD^+ para BmDHPSA: $44,0 \pm 3,2 \mu\text{M}$, Figura 17B; K_{obs} do NAD^+ para PbDHPSA: $9,42 \pm 0,42 \mu\text{M}$, Figura 18B). A partir desses dados, a concentração fixa de NAD^+ escolhida para a realização dos ensaios de inibição enzimática foi de 30, 132 e 95 μM para HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA, respectivamente.

Experimentos equivalentes foram realizados para estabelecer as concentrações apropriadas do substrato espermidina para o ensaio. Nesses experimentos, a concentração do NAD^+ foi mantida fixa (valores mencionados anteriormente) e a taxa linear de formação de NADH foi calculada na presença de concentrações crescentes da espermidina (0,032 a 500 μM para HcDHPSA; 0,0005 a 1 μM para BmDHPSA; 0,0006 a 100 μM para PbDHPSA) (V_{esp}). Um gráfico dos valores de V_{esp} versus as concentrações de espermidina foi utilizado para estabelecer a relação hiperbólica da reação parcial das DHPSS com a concentração de substrato (K_{obs} da espermidina para HcDHPSA: $0,49 \pm 0,03 \mu\text{M}$, Figura 16C; K_{obs} da espermidina para BmDHPSA: $0,056 \pm 0,002 \mu\text{M}$, Figura 17C; K_{obs} da espermidina para PbDHPSA: $0,41 \pm 0,03 \mu\text{M}$, Figura 18C). A partir desses dados, a concentração fixa de espermidina escolhida para a realização dos ensaios de inibição enzimática foi de 5; 0,56 e 4 μM para HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA, respectivamente.

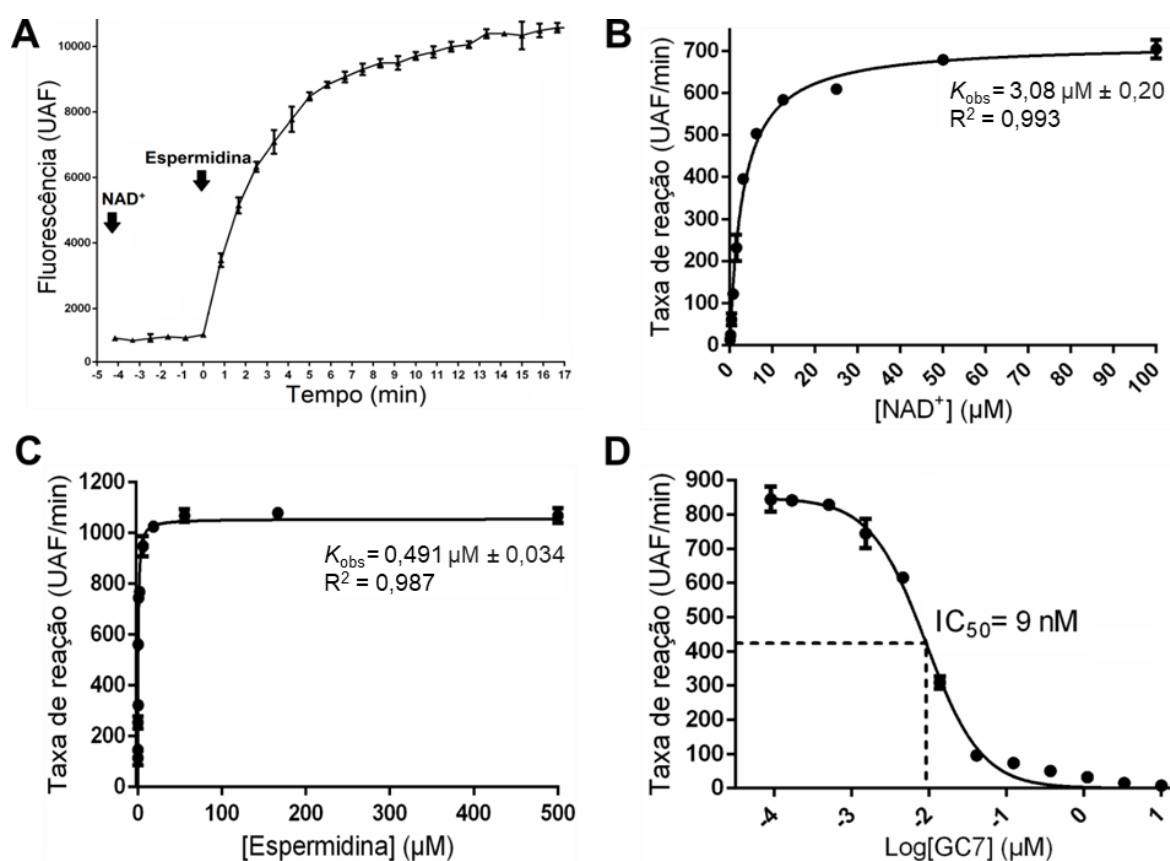
No seguimento desses estudos preliminares, foi realizada a tentativa de mostrar que esse ensaio poderia ser utilizado para estimar valores de IC_{50} para inibidores das DHPSS. Nesses ensaios, foi empregado o GC7, um potente inibidor da DHPS de mamíferos (JAKUS et al., 1993; PARK et al., 1994). As curvas de progresso da reação foram utilizadas para estimar a taxa linear de formação de NADH pelas DHPSS em concentrações crescentes de GC7 (0,00019 a 10 μM para HcDHPSA e BmDHPSA; 0,0003 a 50 μM para PbDHPSA), mantendo concentrações fixas de NAD^+ , de

espermidina e de enzima (18,75 nM do tetrâmero). A curva de concentração-resposta resultante foi utilizada para estimar o valor de IC_{50} do GC7, que foi de 9, 28 e 61 nM para HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA, respectivamente (Figura 16D para HcDHPSA; Figura 17D para BmDHPSA e Figura 18D para PbDHPSA).

Os valores de IC_{50} obtidos para o GC7 com este ensaio estão em excelente concordância com os valores de IC_{50} descritos na literatura para DHPSs de mamíferos (17 a 50 nM), sendo estes IC_{50} provenientes de ensaios que utilizaram o cofator NAD^+ e ambos os substratos necessários para a reação completa da DHPS (espermidina e eIF5A) (JAKUS et al., 1993; LEE; PARK; FOLK, 1995; TANAKA et al., 2020a). O fato dos valores de IC_{50} tanto para as reações completas quanto para reações parciais serem semelhantes era esperado, uma vez que o GC7 compete com a espermidina, o substrato da primeira etapa da reação catalisada pelas DHPSs.

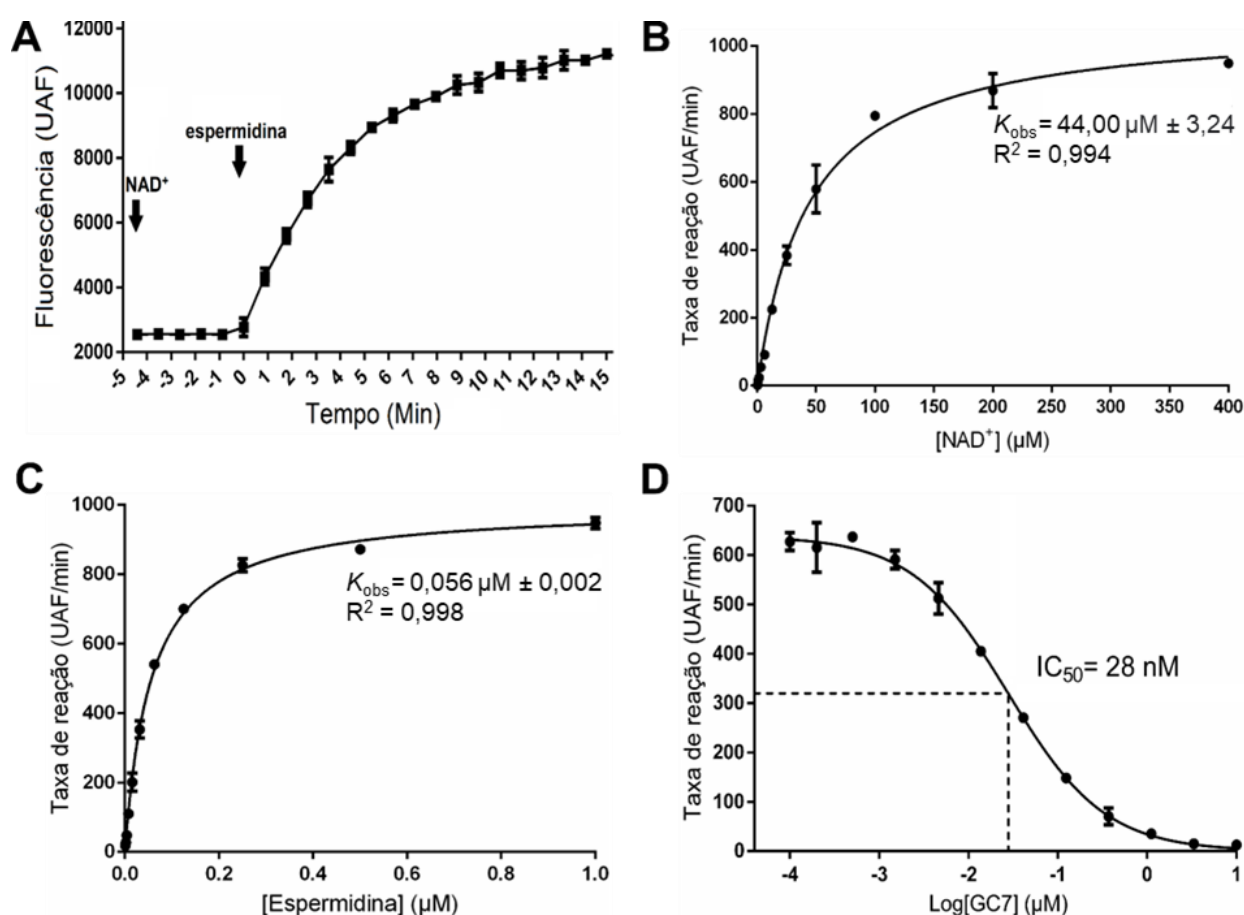
O ensaio enzimático empregado aqui foi robusto e sensível na faixa de concentração de μM a pM do inibidor, empregando uma pequena quantidade de enzima. Entretanto, é importante destacar que este ensaio enzimático só seria capaz de identificar inibidores da reação parcial da DHPS (Figura 15).

Figura 16. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da HcDHPSA-cb001 e determinação do IC_{50} para o GC7. (A) Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela HcDHPSA-cb001. Intensidade de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm. O componente final da reação (espermidina) foi adicionado à placa no tempo 0 e o sinal da fluorescência do NADH foi medido a cada 50s por 40 min. A reação (50 μ L) era composta por 25 nM de HcDHPSA-cb001 (concentração calculada para o tetrâmero), 30 μ M de NAD^+ e 5 μ M de espermidina. **(B)** Titulação do NAD^+ . Concentrações variáveis de NAD^+ (0,098 a 100 μ M) e concentrações fixas de HcDHPSA-cb001 (25 nM do tetrâmero) e de espermidina (5 μ M) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD^+ é mostrado na figura. **(C)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,032 a 500 μ M) e concentrações fixas da HcDHPSA-cb001 (25 nM do tetrâmero) e de NAD^+ (30 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. **(D)** Determinação do IC_{50} para o GC7. Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (0,00019 a 10 μ M) e concentrações fixas da HcDHPSA-cb001 (18,75 nM do tetrâmero), de espermidina (5 μ M) e de NAD^+ (30 μ M) para a realização do experimento. O valor estimado para o IC_{50} é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



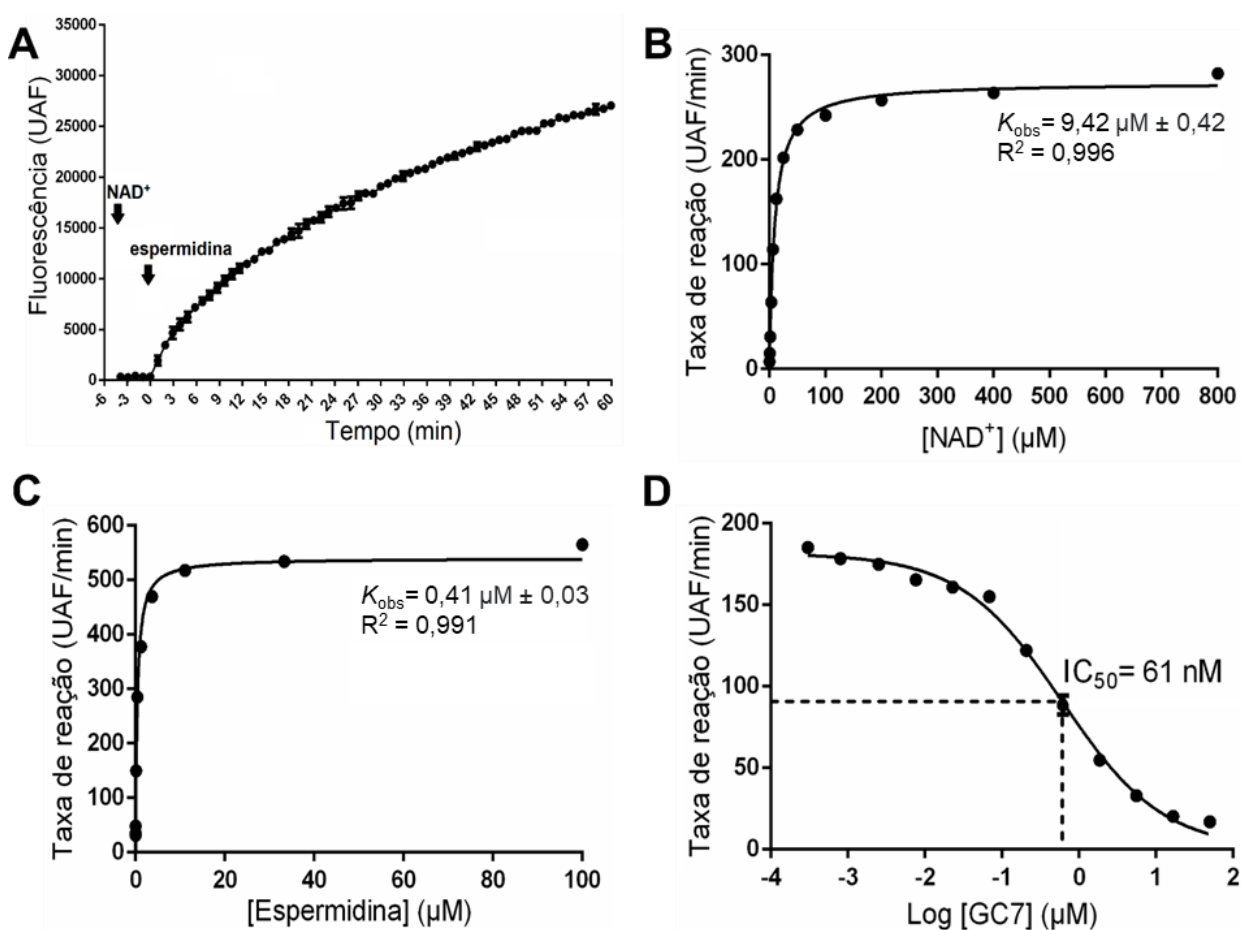
Fonte: autoria própria.

Figura 17. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da BmDHPSA-cb001 e determinação do IC_{50} para o GC7. (A) Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela BmDHPSA-cb001. Intensidade de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm. O componente final da reação (espermidina) foi adicionado à placa no tempo 0 e o sinal da fluorescência do NADH foi medido a cada 50s por 40 min. A reação (50 μ L) era composta por 25 nM da BmDHPSA-cb001 (tetrâmero), 132 μ M de NAD^+ e 0,6 μ M de espermidina. **(B)** Titulação do NAD^+ . Concentrações variáveis de NAD^+ (0,195 a 400 μ M) e concentrações fixas da BmDHPSA-cb001 (25 nM do tetrâmero) e de espermidina (0,56 μ M) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD^+ é mostrado na figura. **(C)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,0005 a 1 μ M) e concentrações fixas da BmDHPSA-cb001 (25 nM do tetrâmero) e de NAD^+ (132 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. **(D)** Determinação do IC_{50} para o GC7. Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (0,00019 a 10 μ M) e concentrações fixas da BmDHPSA-cb001 (18,75 nM do tetrâmero), de espermidina (0,56 μ M) e de NAD^+ (132 μ M) para a realização do experimento. O valor estimado para o IC_{50} é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Fonte: Adaptada de SILVA et al., 2020.

Figura 18. Estabelecimento de um ensaio enzimático empregando a reação parcial da PbDHPSA-cb001 e determinação do IC_{50} para o GC7. (A) Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela PbDHPSA-cb001. Intensidade de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm. O componente final da reação (espermidina) foi adicionado à placa no tempo 0 e o sinal da fluorescência do NADH foi medido a cada 50s por 60 min. A reação (50 μ L) era composta por 25 nM da PbDHPSA-cb001 (tetrâmero), 95 μ M de NAD^+ e 4 μ M de espermidina. **(B)** Titulação de NAD^+ . Concentrações variáveis de NAD^+ (0,39 a 800 μ M) e concentrações fixas da PbDHPSA-cb001 (25 nM do tetrâmero) e de espermidina (50 μ M) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD^+ é mostrado na figura. **(C)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,0006 a 100 μ M) e concentrações fixas da PbDHPSA-cb001 (25 nM do tetrâmero) e de NAD^+ (95 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. **(D)** Determinação do IC_{50} para o GC7. Foram utilizadas concentrações variáveis de GC7 (0,0003 a 50 μ M) e concentrações fixas da PbDHPSA-cb001 (18,75 nM do tetrâmero), de espermidina (4 μ M) e de NAD^+ (95 μ M) para a realização do experimento. O valor estimado para o IC_{50} é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

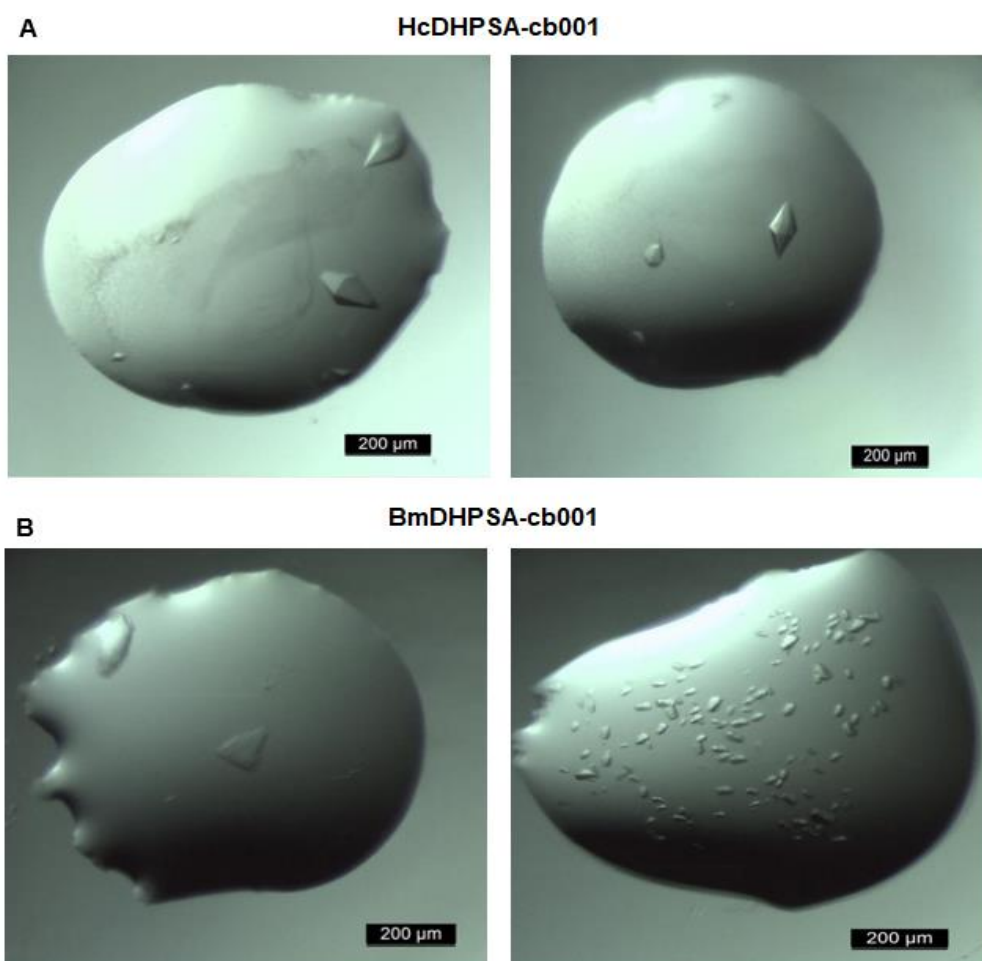


Fonte: autoria própria.

4.5. Cristalização da HcDHPSA-cb001 e da BmDHPSA-cb001

Após a realização das triagens de cristalização (item 3.11 de Materiais e Métodos), foram obtidos cristais para a HcDHPSA-cb001 e a BmDHPSA-cb001 (Figura 19). Para a obtenção dos mesmos, foi feita uma mistura contendo quantidades equimolares de NAD^+ e GC7 a um excesso molar de 3 vezes em relação às proteínas mencionadas anteriormente. Além disso, a melhor condição para a obtenção dos cristais da HcDHPSA-cb001 foi a seguinte: cloreto de sódio 0,2 M, BIS-TRIS 0,1 M pH 6,5, polietilenoglicol 3350 25%, a 20 °C. Já para a BmDHPSA-cb001, os melhores cristais se formaram na seguinte condição: citrato de diamônio 0,2 M pH 5,0, polietilenoglicol 3350 20%, a 20°C.

Figura 19. Cristais obtidos a partir das DHPSs *full-length* de *H. Capsulatum* e *B. malayi* na presença de NAD^+ e GC7. (A) Os melhores cristais para a HcDHPS-cb001 foram obtidos na seguinte condição: cloreto de sódio 0,2 M, BIS-TRIS 0,1 M pH 6,5, polietilenoglicol 3350 25%, a 20 °C; (B) Os melhores cristais para a BmDHPS-cb001 foram obtidos na seguinte condição: citrato de diamônio 0,2 M pH 5,0, polietilenoglicol 3350 20%, a 20 °C.



Fonte: autoria própria.

Os dados de difração desses cristais foram coletados no *Diamond Light Source* (DLS), sendo que as estruturas da BmDHPSA-cb001 e da HcDHPSB-cb001 foram resolvidas a uma resolução de 2,3 Å e 2,1 Å, respectivamente.

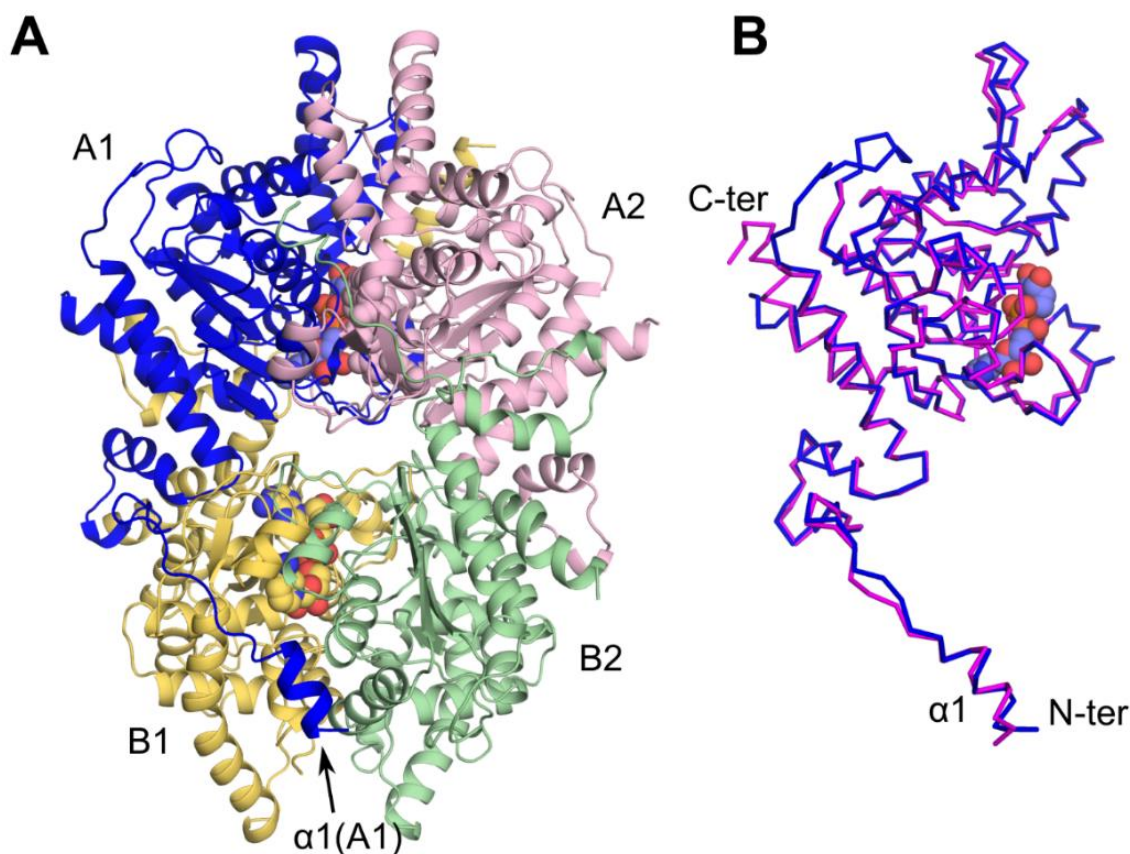
4.6. Determinação da estrutura cristalográfica da BmDHPSA ligada ao NAD⁺

Para verificar a possibilidade da BmDHPSA-cb001 se tornar um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos baseados na sua estrutura, o gene que codifica essa enzima foi clonado e a produzido de forma recombinante em *E. coli*. Em seguida, a escala de produção da BmDHPSA-cb001 (*full-length*) recombinante foi aumentada, sendo que esta foi purificada pela combinação das técnicas de IMAC e cromatografia de exclusão molecular (Figura 13). O rendimento final foi de 2,8 mg de BmDHPSA purificada por L de cultura bacteriana. Ainda, a BmDHPSA-cb001 purificada apresentou a massa molecular esperada (41083,5 Da), como determinado pela espectrometria de massa intacta (Figura 14).

A estrutura cristalográfica da BmDHPSA *full-length* (resíduos 1-366) ligada ao cofator NAD⁺ foi determinada a uma resolução de 2,3 Å. A enzima humana (PDB ID 1DHS) (LIAO et al., 1998) foi utilizada como modelo de busca na substituição molecular para solucionar o problema da fase cristalográfica (Tabela 5). A estrutura da BmDHPSA-cb001 apresenta uma organização quaternária semelhante à sua homóloga humana, como esperado, devido aos altos níveis de identidade entre essas duas proteínas (61,5%) (SILVA et al., 2020).

Dentro da unidade assimétrica do cristal, quatro cadeias polipeptídicas da BmDHPSA (A1, A2, B1 e B2; Figura 20) se organizam em um tetrâmero (SILVA et al., 2020). Os protômeros individuais apresentam estruturas muito semelhantes (raiz quadrada do desvio quadrático médio - r.m.s.d. < 0,30 Å). As diferenças estruturais mais notáveis entre os protômeros da BmDHPSA-cb001 estão localizadas na região N-terminal da proteína, que é conhecida por ser altamente flexível (LIAO et al., 1998; UMLAND et al., 2004). Como exemplo desse fato, nenhuma densidade eletrônica foi observada para os primeiros 28 resíduos do protômero A2. Da mesma forma, as diferenças estruturais mais notáveis entre os protômeros da HsDHPS e da BmDHPSA-cb001 estão localizadas na região N-terminal (r.m.s.d = 0,50 Å; Figura 20) (SILVA et al., 2020).

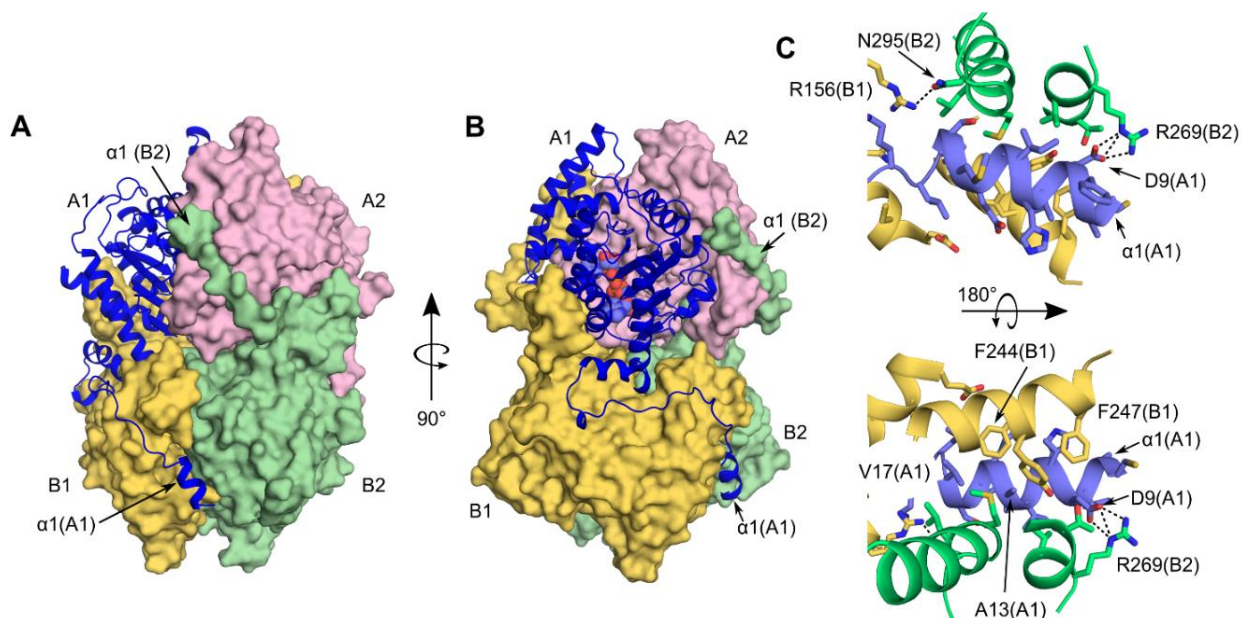
Figura 20. Estrutura da BmDHPSA-cb001 ligada ao cofator NAD^+ . (A) Configuração tetramérica da BmDHPSA. Os protômeros individuais do tetrâmero estão representados em cores diferentes (A1 - azul, A2 - rosa, B1 - amarelo e B2 - verde). As moléculas de NAD^+ estão representadas como esferas. (B) Sobreposição de um protômero da BmDHPSA (A1 em azul; na mesma orientação do painel A) com um da HsDHPS (magenta).



Fonte: SILVA et al., 2020.

Como observado para a HsDHPS, o tetrâmero da BmDHPSA-cb001 possui quatro sítios ativos, sendo que dois são formados pela combinação dos resíduos dos protômeros A1 e A2 e dois pela combinação dos resíduos dos protômeros B1 e B2 (SILVA et al., 2020). A área de interface entre protômeros que contribuem com resíduos para formar o mesmo sítio ativo é bastante extensa, totalizando aproximadamente $2500 \text{ \AA}^2$ (Figura 21A e B). As moléculas de NAD^+ ocuparam três dos quatro sítios ativos do tetrâmero (SILVA et al., 2020).

Figura 21. Contatos interprotoméricos do homotetrâmero da BmDHPsa-cb001. (A e B) As superfícies moleculares dos protômeros A2, B1 e B2 são mostradas nas mesmas cores da Figura 20A. O protômero A1 é representado como um *cartoon* em azul. A posição da hélice $\alpha 1$ da porção N-terminal é indicada pela seta. **(C)** Interações entre a hélice $\alpha 1$ da porção N-terminal do protômero A1 e resíduos próximos (corte de 4 Å) dos protômeros B1 e B2. As ligações de hidrogênio são representadas como linhas pretas tracejadas.



Fonte: SILVA et al., 2020.

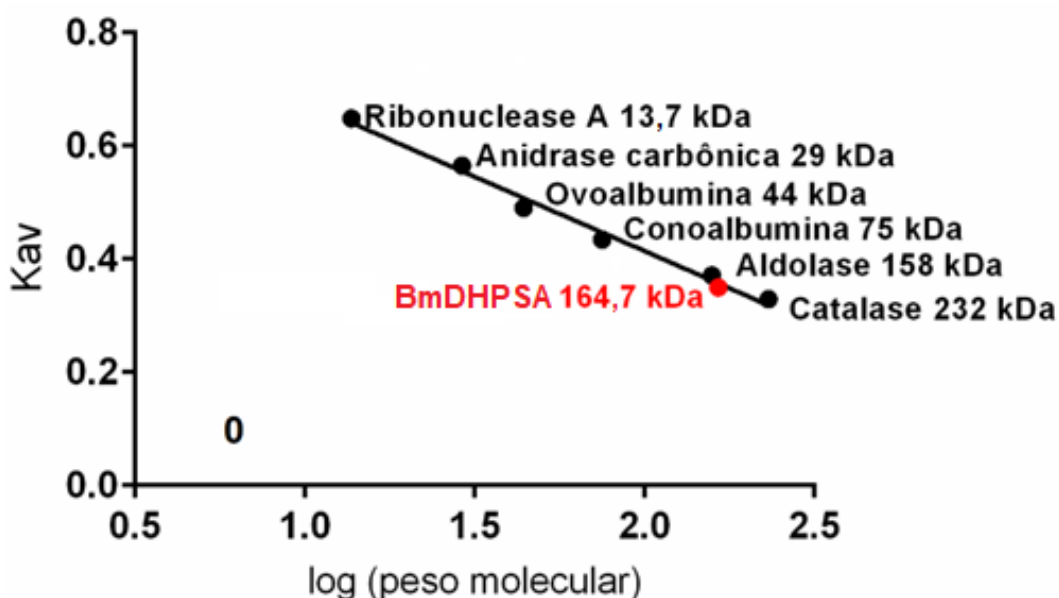
A resolução da estrutura da HsDHPs revelou que o acesso ao seu sítio ativo é controlado por um mecanismo de "*ball-and-chain*" (LIAO et al., 1998; UMLAND et al., 2004). Da mesma forma, na estrutura do BmDHPsa-cb001, a entrada para os dois sítios ativos formados pelos protômeros A1 e A2 encontra-se bloqueada pelas hélices da região N-terminal (hélice $\alpha 1$, "*the ball*") dos protômeros B1 e B2. Devido à baixa densidade de elétrons, a região N-terminal equivalente do protômero A2 foi omitida no modelo final da proteína. Assim, um dos sítios ativos formados pelos protômeros B1 e B2 aparece exposto ao solvente. O outro sítio ativo formado pelos protômeros B1 e B2 aparece bloqueado pela hélice $\alpha 1$ do protômero A1. Os contatos entre protômeros facilitados pela hélice $\alpha 1$ são principalmente de natureza hidrofóbica (Figura 21C). Os únicos contatos polares observados foram os dos átomos da cadeia lateral da Asp9 na hélice $\alpha 1$ com a Arg269 de outro protômero (SILVA et al., 2020).

Além dos contatos descritos acima para a hélice $\alpha 1$, a área de interface observada entre os protômeros que contribuem com resíduos para a formação de sítios ativos diferentes é bastante extensa. Por exemplo, a área de interface entre os protômeros A1 e B1 totaliza aproximadamente 3500 Å² e a área entre os protômeros

A1 e B2 aproximadamente $650 \text{ \AA}^2$. No total, os contatos entre protômeros englobam aproximadamente $12600 \text{ \AA}^2$ da área de superfície da proteína (Figura 21A e B) (SILVA et al., 2020). Uma área de interface tão extensa fortalece a hipótese de que, como demonstrado anteriormente para a DHPS de outros organismos (TAO; CHEN, 1995; WOLFF et al., 1995), a configuração biologicamente relevante para a BmDHPSA-cb001 corresponde a um homotetrâmero (SILVA et al., 2020).

Para confirmar essa hipótese, uma cromatografia de exclusão molecular analítica foi utilizada para investigar se a BmDHPSA-cb001 produzida neste trabalho também possui uma estrutura quaternária em solução semelhante às enzimas de mamífero. Nesse experimento, a BmDHPSA-cb001 recombinante purificada apresentou um coeficiente de partição aparente equivalente ao de uma proteína de aproximadamente 165 kDa. Este valor está em excelente concordância com o tamanho esperado para um tetrâmero da BmDHPSA-cb001, que seria de aproximadamente 164 kDa (Figura 22) (SILVA et al., 2020).

Figura 22. Determinação do estado oligomérico da BmDHPSA-cb001 em solução. Representação dos coeficientes de partição aparentes para as proteínas padrão e para BmDHPSA-cb001 (em vermelho) após cromatografia de exclusão molecular analítica.



Fonte: adaptado de SILVA et al., 2020.

4.7. Sítio ativo da BmDHPSA

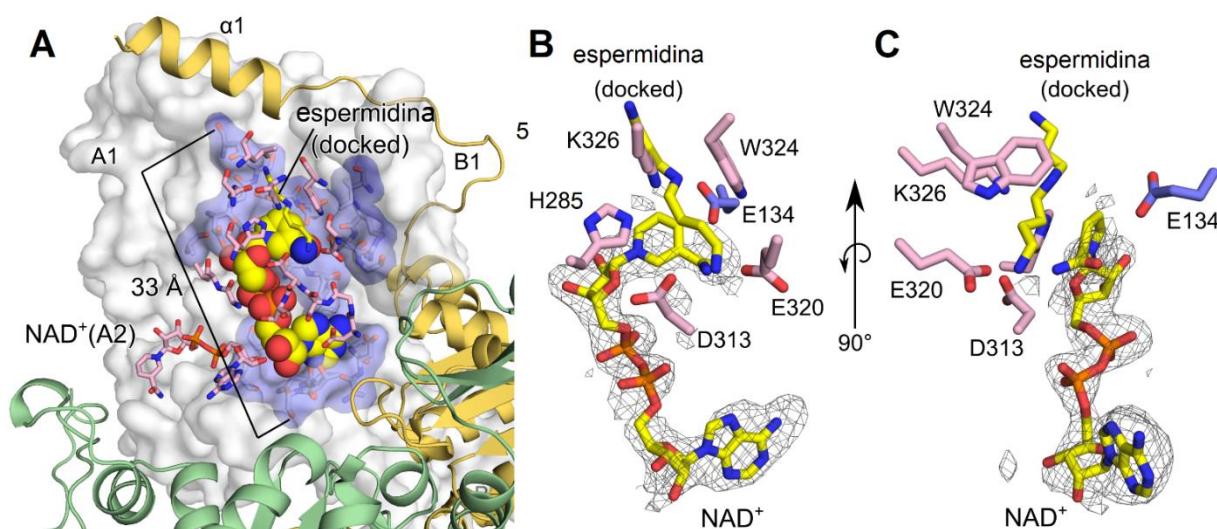
A análise da estrutura da BmDHPSA-cb001 possibilitou a definição do sítio ativo dessa enzima. Dentro do tetrâmero da BmDHPSA-cb001, todos os quatro sítios ativos apresentam arquiteturas semelhantes. A seguir, o sítio ativo formado pelos protômeros A1 e A2 e, cuja entrada foi bloqueada pela hélice $\alpha 1$ do protômero B1 será descrito em detalhes. Dada a conservação estrutural entre os protômeros individuais, conclusões semelhantes podem ser tiradas para todos os quatro sítios ativos dessa enzima (SILVA et al., 2020).

Como observado para a HsDHPS, o sítio ativo da BmDHPSA-cb001 apresenta um formato de funil. A extremidade mais larga do sítio ativo encontra-se mais próxima da superfície da proteína, estando bloqueada pela hélice $\alpha 1$ do protômero B1. A extremidade mais estreita do sítio ativo está localizada profundamente no interior da proteína (aproximadamente 30 Å, considerando o anel fenila da cadeia lateral da Phe244 na entrada do sítio ativo em relação ao átomo C α da Asn304 no seu interior) (SILVA et al., 2020).

No sítio ativo da BmDHPSA-cb001, a molécula do NAD⁺ está orientada de tal maneira que seu anel adenina é acomodado por resíduos da proteína na parte inferior do funil, enquanto o anel nicotinamida desse cofator está direcionado para a entrada do sítio ativo (aproximadamente 15 Å do anel fenila da Phe244). Ainda, o grupo difosfato e as duas porções ribose da molécula de NAD⁺ ligada ao segundo sítio ativo formado pelos protômeros A1 e A2 ajudam a delimitar uma das extremidades do sítio ativo em análise (Figura 23) (SILVA et al., 2020).

Embora presente no coquetel de cristalização, a densidade eletrônica para o GC7 não foi observada nos cristais da BmDHPSA-cb001. Na estrutura da BmDHPSA-cb001, a entrada para o sítio ativo possivelmente foi bloqueada pela hélice N-terminal ($\alpha 1$, “*the ball*”) e isso pode ter impedido a ligação do GC7 à essa enzima (SILVA et al., 2020). Da mesma forma, o GC7 não pôde ser localizado nos mapas de densidade eletrônica nos cristais da HsDHPS que apresentavam os sítios ativos da enzima bloqueados (LIAO et al., 1998).

Figura 23. Detalhes do sítio ativo da BmDHPSA-cb001. (A) O protômero A1 é mostrado como uma superfície branca, com os resíduos dentro de um raio de 4 Å do cofator NAD⁺ (esferas) mostrados como bastões azuis realçados pela superfície azul clara. Os resíduos no protômero A2 dentro de um raio de 4 Å do cofator NAD⁺ ligado ao protômero A1 são mostrados como bastões rosas. O cofator NAD⁺ ligado ao protômero A2 também é mostrado como bastões rosas. Os protômeros B1 (amarelo) e B2 (verde) são mostrados como *cartoons*. (B, C) Resíduos cataliticamente importantes no sítio ativo da BmDHPSA-cb001. A espermidina (bastão amarelo) foi acoplada na estrutura da BmDHPSA-cb001 após a sobreposição dessa estrutura com a estrutura da HsDHPS ligada à espermidina (PDB ID 6XXK) (WAȦTOR; WILK; GRUDNIK, 2020) através do *software* Pymol (Schrödinger, Inc).



Fonte: SILVA et al., 2020.

Infelizmente, as tentativas de obtenção de cristais da BmDHPSA-cb001 com o sítio ativo exposto, através do emprego de coquetéis de cristalização com diferentes pHs, como relatado anteriormente para HsDHPS (UMLAND et al., 2004), não foram bem-sucedidas. Uma estratégia alternativa para obter co-cristais da BmDHPSA-cb001 ligados a inibidores seria o uso de versões truncadas dessa proteína sem a hélice $\alpha 1$ conservada (resíduos 1-16) (SILVA et al., 2020). No entanto, possíveis co-estruturas da BmDHPSA-cb001 truncada deveriam ser interpretadas com cuidado, pois a HsDHPS sem os primeiros 52 resíduos do N-terminal, que incluem todo o motivo “*ball-and-chain*”, se comporta como um dímero em solução e é cataliticamente inativa (WAȦTOR; WILK; GRUDNIK, 2020).

Os primeiros inibidores descritos para a HsDHPS foram os análogos da espermidina, o substrato natural dessa enzima (JAKUS et al., 1993). Esses compostos são adequados para explorar vários pontos de contato ao longo dos sítios de ligação à espermidina presentes nessa enzima. No entanto, deve-se tomar cuidado ao

desenvolver inibidores para as DHPs dos parasitas baseados na espermidina, pois é provável que os mesmos interfiram na biossíntese e metabolismo da espermidina e causem efeitos indesejados no hospedeiro humano (MARTON; PEGG, 1995).

Recentemente, Tanaka e colaboradores identificaram e desenvolveram inibidores alostéricos da HsDHPS não relacionados à espermidina (TANAKA et al., 2020a). O composto mais promissor desta série (YT-11g) causou o desdobramento e a realocação da hélice $\alpha 13$ dessa enzima, criando assim um novo sítio alostérico e, no processo, impediu a ligação do cofator NAD^+ à enzima. Essas observações reforçam o fato de que as DHPs são alvos promissores para o desenvolvimento de novos inibidores. Além disso, a procura por sítios alostéricos corresponde a uma estratégia validada para alcançar a seletividade de homólogos (WU; CLAUSEN; NIELSEN, 2015). Entretanto, considerando que a BmDHPSA-cb001 apresenta um alto nível de conservação estrutural com a HsDHPS, o desenvolvimento de inibidores seletivos para a BmDHPSA-cb001 corresponde a uma tarefa difícil (SILVA et al., 2020).

4.8. Mecanismo de reação proposto para a BmDHPSA

Para confirmar o mecanismo da reação catalisada pela BmDHPSA-cb001 e para melhor delinear o sítio de ligação ao substrato, foi realizado um *docking* rígido da espermidina no sítio ativo da BmDHPSA-cb001, como apresentado na estrutura do co-cristal da HsDHPS com a espermidina (PDB ID 6XXK) (WATOR; WILK; GRUDNIK, 2020). Essas análises sugeriram que o substrato pode ser acomodado no sítio ativo da BmDHPSA-cb001 sem a necessidade de grandes rearranjos estruturais (Figura 23) (SILVA et al., 2020). Sendo assim, em conjunto, os resíduos próximos ao NAD^+ e à espermidina definem o sítio ativo da BmDHPSA-cb001 (Figura 23) (SILVA et al., 2020).

A estrutura da BmDHPSA-cb001 e o *docking* da espermidina nessa estrutura (Figura 23) sugerem que o mecanismo da reação catalizada por essa enzima é semelhante ao sugerido para as enzimas de mamífero (WOLFF; FOLK; PARK, 1997; WOLFF; PARK; FOLK, 1990). Na primeira etapa da reação catalisada pela DHPS, a espermidina é oxidada em desidroespermidina, de maneira dependente de NAD^+ (WOLFF; PARK; FOLK, 1990; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). Na estrutura da BmDHPSA-cb001, o anel nicotinamida do cofator NAD^+ encontra-se próximo da

espermidina (Figura 23). Esse fato sugere que o NAD^+ seria capaz de abstrair um próton da amina secundária central da espermidina. Na segunda etapa da reação, um resíduo de lisina conservado (Lys326 para BmDHPSA e Lys329 para HsDHPS) ataca a espermidina oxidada, formando um aduto covalente enzima-butilimina e liberando 1,3-diaminopropano (DAP) (WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). Na estrutura da BmDHPSA-cb001, a Lys326 está próxima da molécula de espermidina e em boa posição para atacar o grupo amino central da desidroespermidina. Outros resíduos considerados importantes para a catálise da DHPS de mamíferos, como Glu137, His288, Asp316, Glu323 e Trp327 (Glu134, His285, Asp313, Glu320 e Trp324 para a BmDHPSA, respectivamente) são conservados entre as DHPSs de *B. malayi* e de humano, ocupando posições estruturalmente equivalentes no sítio ativo dessas duas enzimas (LEE; UM; PARK, 2001; SILVA et al., 2020) (Figura 23).

Nas próximas etapas da reação, o grupo butilamina proveniente da espermidina é transferido para um resíduo de lisina conservado em eIF5A e o NAD^+ é regenerado no sítio ativo da DHPS. No caso de eIF5A humano (HseIF5A), o alvo da hipusinação é o resíduo Lys50, localizado na extremidade de uma alça longa (TONG et al., 2009). É provável que a ancoragem adequada de eIF5A na DHPS exija contatos extensos entre as duas proteínas, pois quase todo o domínio N-terminal do HseIF5A (resíduos 20-80) deve estar intacto para que o mesmo seja modificado pela HsDHPS (TONG et al., 2009).

Assim sendo, essas análises sugerem que a BmDHPSA-cb001 possui uma estrutura e mecanismo de reação semelhantes aos estabelecidos para a HsDHPS.

4.9. Determinação da estrutura cristalográfica da HcDHPSA-cb001

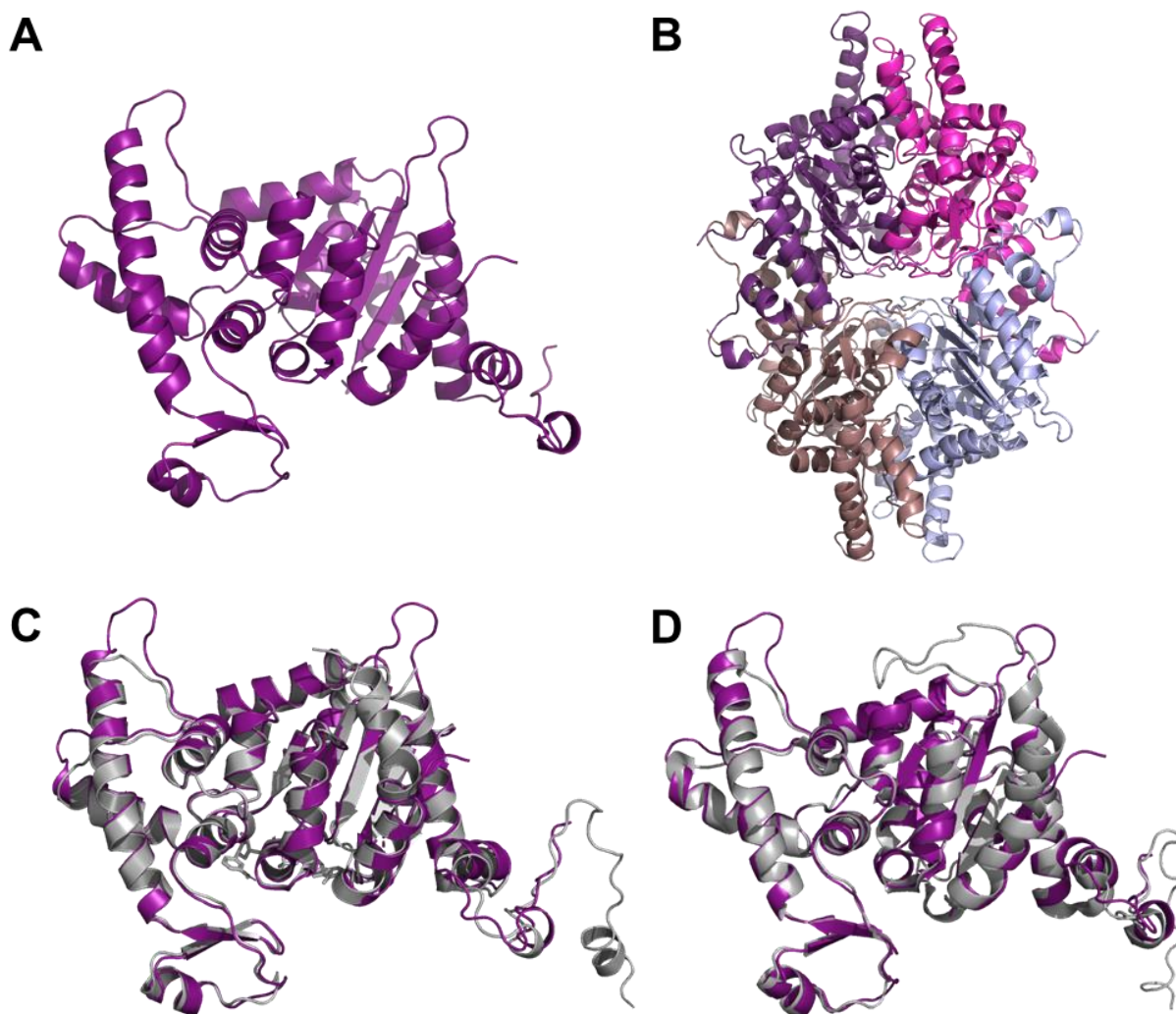
Para estudar a HcDHPSA como um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos baseados na sua estrutura, o gene que codifica essa enzima foi inicialmente clonado e produzido de forma recombinante em *E. coli*. Em seguida, a escala de produção da HcDHPSA-cb001 (*full-length*) recombinante foi aumentada, sendo que esta foi purificada pela combinação das técnicas de IMAC e cromatografia de exclusão molecular (Figura 12). O rendimento final foi de 14,7 mg de HcDHPSA purificada por L de cultura bacteriana. Ainda, a HcDHPSA purificada apresentou a massa molecular muito próxima à esperada (41529,5 Da), como determinado pela espectrometria de massa intacta (Figura 14).

A estrutura cristalográfica da HcDHPSA-cb001 (resíduos 1-381) foi determinada a uma resolução de 2,1 Å. A HsDHPS (PDB ID 1DHS) (LIAO et al., 1998) foi utilizada como modelo de busca na substituição molecular para solucionar o problema da fase cristalográfica (Tabela 6). A estrutura da HcDHPSA-cb001 apresenta uma organização quaternária semelhante à sua homóloga humana, como esperado, devido aos altos níveis de identidade entre essas duas proteínas (56,1%).

Dentro da unidade assimétrica do cristal, assim como a HsDHPS, a HcDHPSA assumiu uma configuração monomérica (Figura 24A). Entretanto, uma análise pelo servidor online *Protein interfaces, surface and assemblies* (PISA) (KRISSINEL; HENRICK, 2007) demonstrou que a configuração tetramérica corresponde a forma mais estável para essa proteína em solução (Figura 24B), assim como observado para as demais DHPSs (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; SILVA et al., 2020; UMLAND et al., 2004).

Adicionalmente, foi realizada a sobreposição do protômero da HcDHPSA-cb001 com um dos protômeros da HsDHPS e da BmDHPS-cb001 e, novamente foi observada uma grande similaridade estrutural entre essas proteínas (r.m.s.d = 0,58 Å para a HcDHPSA-cb001 e a HsDHPS e r.m.s.d = 0,49 Å para a HcDHPSA-cb001 e a BmDHPS-cb001; Figura 24C e D, respectivamente). Assim sendo, as discussões anteriores sobre os sítios ativos e mecanismo da reação da BmDHPSA também se aplicam para a HcDHPSA.

Figura 24. Estrutura da HcDHPSA-cb001. (A) Configuração monomérica da HcDHPSA-cb001 na unidade assimétrica do cristal (B) Configuração tetramérica da HcDHPSA-cb001 prevista pelo PISA como a forma mais estável para essa enzima em solução. Os protômeros individuais do tetrâmero da HcDHPSA-cb001 estão representados em cores diferentes (A1 - roxo, A2 - rosa, B1 – rosa claro e B2 - azul). (C) Sobreposição do protômero da HcDHPSA-cb001 (roxo) com o da HsDHPS (cinza). (D) Sobreposição do protômero da HcDHPSA-cb001 (roxo) com o da BmDHPSA-cb001 (cinza).



Fonte: autoria própria.

4.10. Expressão em pequena escala das isoformas da LmDHPS em condições modificadas

Um dos objetivos originais deste projeto correspondia ao aumento de escala do ensaio enzimático *in vitro* para as DHPSs de *L. major*, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *B. malayi*, para permitir o rastreamento de inibidores *in vitro* em larga escala com essas enzimas. No entanto, foi constatado que a BmDHPSA e a HcDHPSA correspondem a enzimas homotetraméricas que compartilham muitas características

com seu homólogo humano, o que pode dificultar o desenvolvimento de inibidores da DHPS seletivos para esses patógenos (SILVA et al., 2020). Em contraste, os parálogos de *Leishmania sp.* provavelmente formam um complexo heterotetramérico e têm um mecanismo regulador distinto em comparação com a enzima humana (SILVA et al., 2020). Ainda, o modelo por homologia sugere que os resíduos da primeira camada que reveste os sítios de ligação à espermidina na DHPS de *Leishmania sp.* e de *H. sapiens* são diferentes (SILVA et al., 2020). Assim, o desenvolvimento de inibidores seletivos para as DHPSs de *Leishmania sp.* pode ser uma tarefa factível (SILVA et al., 2020).

Atualmente, existe uma carência na literatura de informações sobre a estrutura das DHPSs de *Leishmania sp.* Para tornar a DHPS de *Leishmania sp.* um alvo potencial para programas de desenvolvimento de fármacos baseados em estrutura, buscamos clonar os dois genes que codificam essa enzima e produzi-los de forma recombinante em células de *E. coli*.

Conforme descrito anteriormente, foram realizadas tentativas para produzir as isoformas da LmDHPS de forma recombinante usando células de *E. coli* e o vetor de expressão pNIC28-Bsa4 (STOLS et al., 2002), adotando uma estratégia semelhante à utilizada pelo *Structural Genomics Consortium* (SAVITSKY et al., 2010). Foram projetados conjuntos de oligonucleotídeos para gerar quatro amplicons de PCR diferentes para cada isoforma da LmDHPS, cada um codificando construções com diferentes limites N e C-terminais. No entanto, essas construções se mostraram recalcitrantes para serem produzidas de forma solúvel em *E. coli* (vide Figura 10). Diante dessa situação, optou-se por concentrar todos os esforços na produção das *Leishmania sp.* DHPSs recombinantes solúveis em *E. coli* e na busca por inibidores seletivos para estas enzimas. Para tanto, inicialmente, foram realizadas várias modificações nas condições de expressão em pequena escala, com o intuito de obter a LmDHPSA e a LmDHPSB na forma solúvel. A Tabela 10 a seguir resume as novas condições testadas.

Tabela 10. Condições empregadas no teste de expressão em pequena escala para as duas isoformas da LmDHPS.

Construções	<i>E. coli</i>	Plasmídeo	Meio de cultura	Indução			Proteína
				Tempo	Temperatura	[IPTG]	
LmDHPSA cb001 a cb004	BL21(DE3)-R3-pRARE2	pNIC28-Bsa4	<i>Terrific broth</i> (TB)	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
	BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	pNIC28-Bsa4	TB + tetraciclina 3 ng/mL ^a	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
	BL21(DE3)-R3-pRARE2	pNIC28-Bsa4	Luria-Bertani (LB) com NaCl 400 mM e betaína 5 mM ^b	16 h	18 °C	0,1 mM	Pouco solúvel
	BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	pNIC28-Bsa4	LB com NaCl 400 mM + betaína 5 mM ^b + tetraciclina 3 ng/mL ^a	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
LmDHPSB cb001 a cb004	BL21(DE3)-R3-pRARE2	pNIC28-Bsa4	TB	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
	BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	pNIC28-Bsa4	TB + tetraciclina 3 ng/mL ^a	16 h	18 °C	0,1 mM	Pouco solúvel
	BL21(DE3)-R3-pRARE2	pNIC28-Bsa4	LB com NaCl 400 mM e betaína 5 mM ^b	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
	BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	pNIC28-Bsa4	LB com NaCl 400 mM + betaína 5 mM ^b + tetraciclina 3 ng/mL ^a	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
LmDHPSA-cb001 + LmDHPSB-cb001 (co-expressão) ^c	BL21(DE3)-R3-pRARE2	pETDuet-1	TB	16 h	18 °C	0,1 mM	Insolúvel
	BL21 – pGKJE8 (groES-groEL)	pETDuet-1	TB + tetraciclina 3 ng/mL ^a	16 h	18 °C	0,1 mM	Pouco solúvel

^a: Utilizada para induzir a expressão das chaperonas da linhagem BL21 – pGKJE8; ^b: Utilizada para tentar melhorar a solubilidade da proteína recombinante; ^c: Descrito a seguir no item 4.11.

Fonte: autoria própria.

Como mostrado na Tabela 10, para a LmDHPSA, as proteínas apresentaram-se levemente mais solúveis quando o meio de cultura era suplementado com NaCl e betaína (LB + NaCl 400 mM e betaína 5 mM). Cabe aqui destacar que a utilização de betaína como estratégia para aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes já foi empregado com sucesso anteriormente (LEIBLY et al., 2012; PALEG; STEWART; BRADBEER, 1984; SINGH et al., 2009). Nessa condição, três construções foram consideradas como pouco solúveis para essa isoforma (LmDHPSA-cb001, LmDHPSA-cb002 e LmDHPSA-cb003), sendo que a LmDHPSA-cb001 apresentou-se como a mais solúvel em comparação com as demais (dados não mostrados).

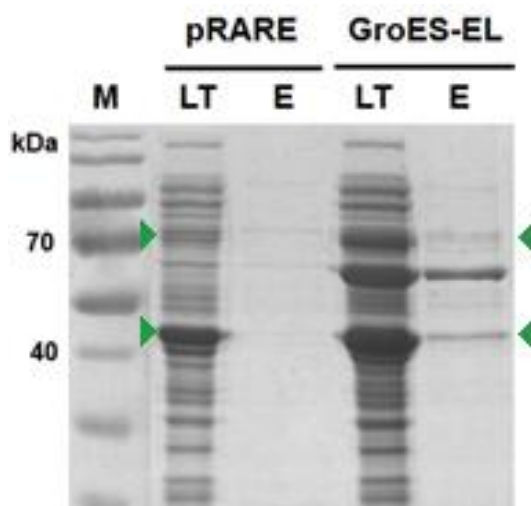
No caso da LmDHPSB, as construções só foram levemente solúveis quando expressas em meio TB empregando a linhagem de *E. coli* BL21, que co-expressa o complexo de chaperonas GroES-GroEl (pG-KJE8 – Taraka Bio; Tabela 1). Nessas condições, três construções da LmDHPSB foram produzidas de forma pouco solúvel (LmDHPSB-cb002, LmDHPSB-cb003 e LmDHPSB-cb004), sendo a LmDHPSB-cb002 a que apresentou o melhor nível de solubilidade (dados não mostrados).

Como essas modificações nas linhagens de *E. coli* e nos meios de cultura utilizados não foram suficientes para aumentar a solubilidade das LmDHPSs de forma satisfatória, foi realizada a co-expressão das duas isoformas *full-length* da LmDHPS utilizando o plasmídeo pETDuet-1.

4.11. Co-expressão das duas isoformas da LmDHPS

Considerando a possibilidade da LmDHPSA e da LmDHPSB atuarem como um heterocomplexo, conforme descrito previamente para a DHPS de *T. brucei* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; NGUYEN et al., 2013) e, que a DHPS de *T. brucei* foi obtida por co-expressão em *E. coli* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018; NGUYEN et al., 2013), as sequências completas das duas isoformas da LmDHPS (LmDHPSA-cb001 e LmDHPSB-cb001) foram subclonadas no plasmídeo pETDuet-1. Em seguida, foi conduzido um teste de expressão em pequena escala com esse plasmídeo transformado nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 e BL21-pGKJE8 (GroES-EL). No entanto, não houve melhora na solubilidade dessas proteínas produzidas pela co-expressão em *E. coli* (Figura 25).

Figura 25. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de co-expressão em pequena escala da LmDHPSA-cb001 e LmDHPSB-cb001 nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 e BL21-pGKJE8 (GroES-EL). O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Tamanho aproximado das construções LmDHPSA-cb001: 67 kDa e LmDHPSB-cb001: 43 kDa. M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10 kDa, ThermoFisher Scientific). LT: lisado total. E: frações eluídas em 300 mM de imidazol. O tamanho aproximado (em kDa) das LmDHPSs encontra-se indicado na figura. As setas indicam a localização das bandas das LmDHPSs.



Fonte: autoria própria.

4.12. Expressão em pequena escala das isoformas da LmDHPS com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli*

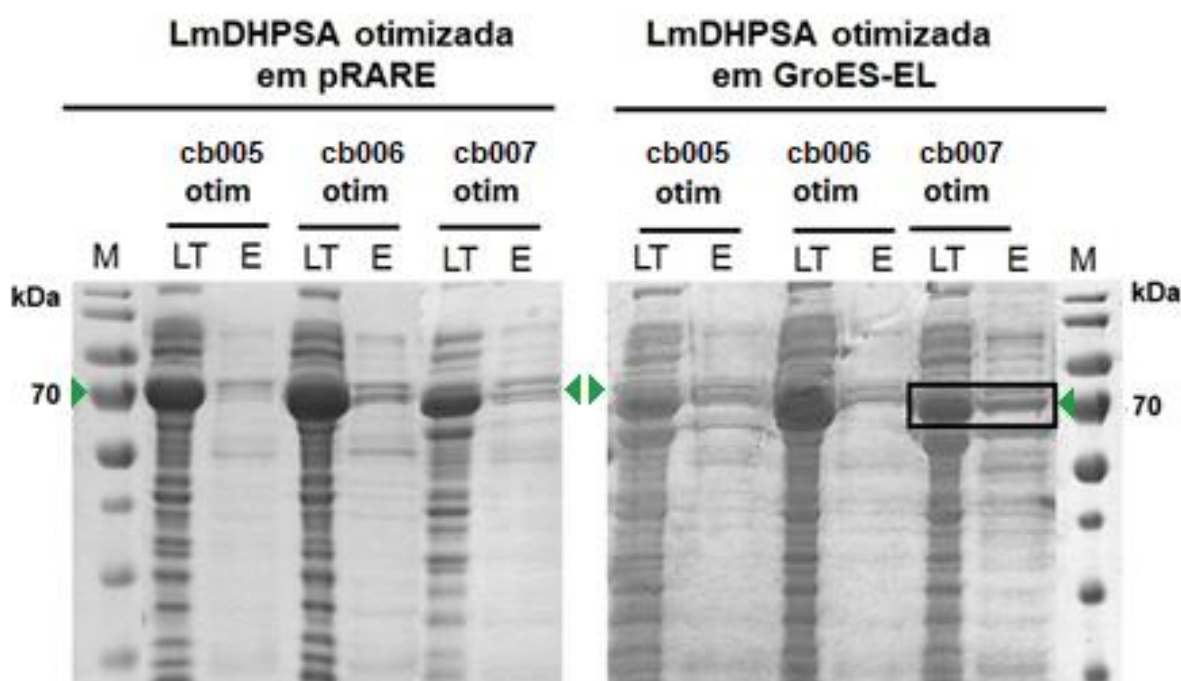
Ainda com o intuito de aumentar a solubilidade das duas isoformas da LmDHPS, foi realizada a otimização de códons para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, sendo que foram mantidos os mesmos limites (aminoácido inicial e final) das construções projetadas no início deste trabalho (Tabela 9).

Foram obtidos amplicons para todas as construções planejadas. Estes foram posteriormente clonados no vetor de expressão em *E. coli* pNIC28-Bsa4 (Tabela 2) via LIC. Ainda, as clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e sequenciamento de DNA (dados não mostrados). Apenas a construção LmDHPSA-cb008 não gerou clones positivos.

Para encontrar as melhores condições de expressão para a produção das LmDHPSs, as construções projetadas para as duas isoformas dessa enzima foram transformadas nas linhagens de expressão de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 e BL21

– pGKJE8 (groES-groEL), sendo posteriormente avaliadas por ensaios de expressão em pequena escala em meio TB e purificados via IMAC (Figuras 26 e 27).

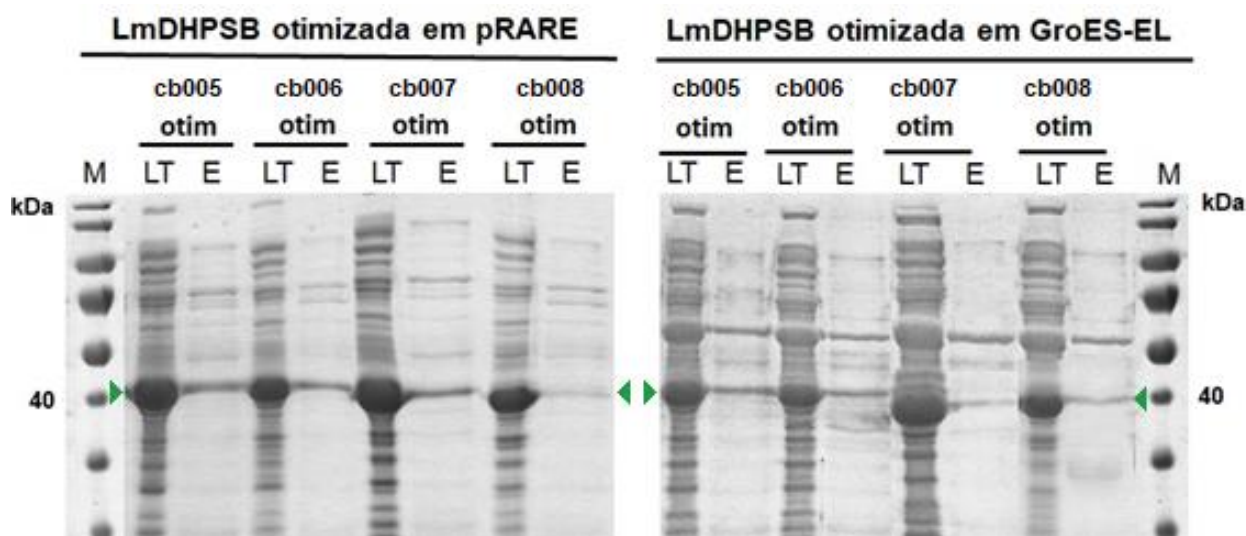
Figura 26. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão com a LmDHPSA com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli* em pequena escala. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). As linhagens utilizadas encontram-se descritas na imagem; tamanhos esperados para as construções em kDa: LmDHPSA-cb005: 67; LmDHPSA-cb006: 64; LmDHPSA-cb007: 64,8. M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10 kDa, ThermoFisher Scientific). LT: lisado total. E: frações eluídas em tampão contendo 300 mM de imidazol. As setas indicam a localização das bandas das LmDHPSAs. A construção destacada com o retângulo foi selecionada para a produção em larga escala.



Fonte: autoria própria.

Como demonstrado na Figura 26, a maioria das construções, com exceção da construção LmDHPSA-cb007 clonada na linhagem BL21 – pGKJE8 (groES-groEL) (Tabela 1), apresentaram-se pouco solúveis nas duas linhagens de expressão. Sendo assim, essa construção que apresentou uma maior solubilidade em comparação com as demais foi selecionada para a produção em larga escala.

Figura 27. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão com a LmDHPSB com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli* em pequena escala. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). As linhagens utilizadas encontram-se descritas na imagem; tamanhos esperados para as construções em kDa: LmDHPSB-cb005: 43; LmDHPSB-cb006: 42,6; LmDHPSB-cb007: 42; LmDHPSB-cb008: 40. M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10 kDa, ThermoFisher Scientific). LT: lisado total. E: frações eluídas em tampão contendo 300 mM de imidazol. As setas indicam a localização das bandas das LmDHPSBs.

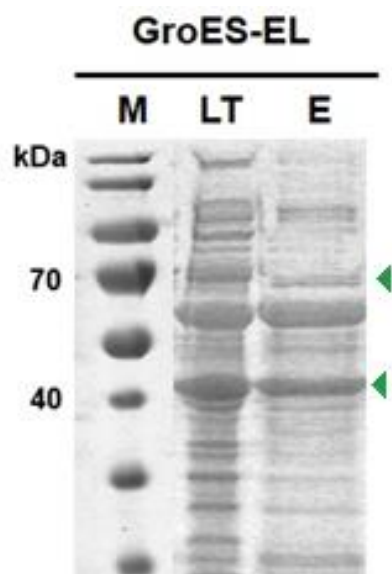


Fonte: autoria própria.

Para a isoforma B, como observado na Figura 27, as construções transformadas nas duas linhagens de expressão também foram pouco solúveis, sendo que a construção LmDHPSB-cb005 clonada em BL21(DE3)-R3-pRARE2) foi considerada levemente mais solúvel do que as demais.

Portanto, uma nova tentativa de co-expressão das duas isoformas da LmDHPS foi realizada, sendo que desta vez foram utilizadas no processo de clonagem as sequências dos genes sintéticos com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli*. Para isso, as duas construções que apresentaram o maior nível de solubilidade nos testes iniciais (LmDHPSA-cb007 e LmDHPSB-cb005) foram subclonadas no plasmídeo pETDuet-1. Em seguida, foi realizado um teste de expressão em pequena escala com esse plasmídeo transformado nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 e BL21 – pGKJE8 (GroES-EL). A Figura 28 a seguir mostra o resultado obtido no teste de expressão em pequena escala com a linhagem BL21 – pGKJE8 (GroES-EL), pois não foram obtidos resultados satisfatórios com a linhagem BL21(DE3)-R3-pRARE2.

Figura 28. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de co-expressão da LmDHPSA-cb007 e da LmDHPSB-cb005 com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli* na linhagem BL21 – pGKJE8 (GroES-EL) em pequena escala. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Tamanhos esperados para as proteínas: LmDHPSA-cb007: 64,8 kDa e LmDHPSB-cb005: 43 kDa. M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10 kDa, ThermoFisher Scientific). LT: lisado total. E: frações eluídas em tampão contendo 300 mM de imidazol. As setas indicam a localização das bandas das LmDHPSs.



Fonte: autoria própria.

A co-expressão das duas isoformas na linhagem BL21 – pGKJE8 (GroES-EL) melhorou a solubilidade da LmDHPSB-cb005, porém, o mesmo efeito não foi observado para a LmDHPSA-cb007 (Figura 28). Neste sentido, essa construção foi selecionada para a produção em larga escala da LmDHPSB.

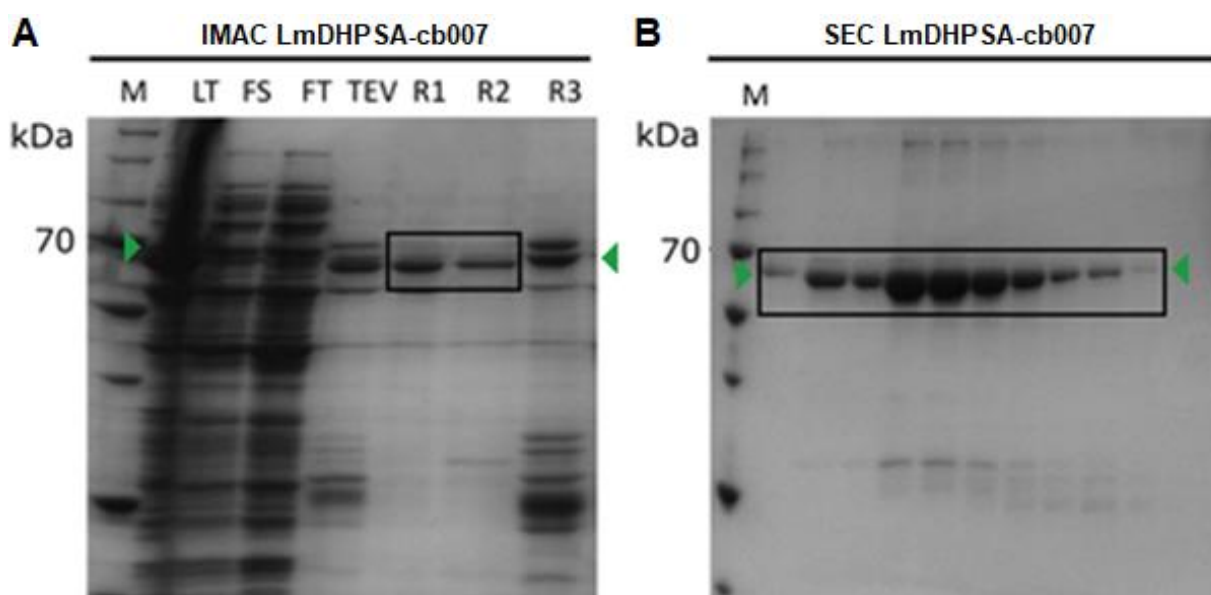
4.13. Expressão em larga escala das isoformas da LmDHPS com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli*

Em seguida, foi realizado o aumento da escala de produção utilizando as linhagens cuja produção de proteína na forma solúvel foi melhor no teste de expressão em pequena escala: construção LmDHPSA-cb007 (clonada em pNIC28-Bsa4) e LmDHPSB-cb005 (clonada em pETDuet-1), transformadas na linhagem BL21 – pGKJE8 (groES-groEL).

A produção da LmDHPSA-cb007 foi realizada em 12 L de TB suplementado com tetraciclina 3 ng/mL. A produção da LmDHPSB-cb005 foi realizada em 3 L desse

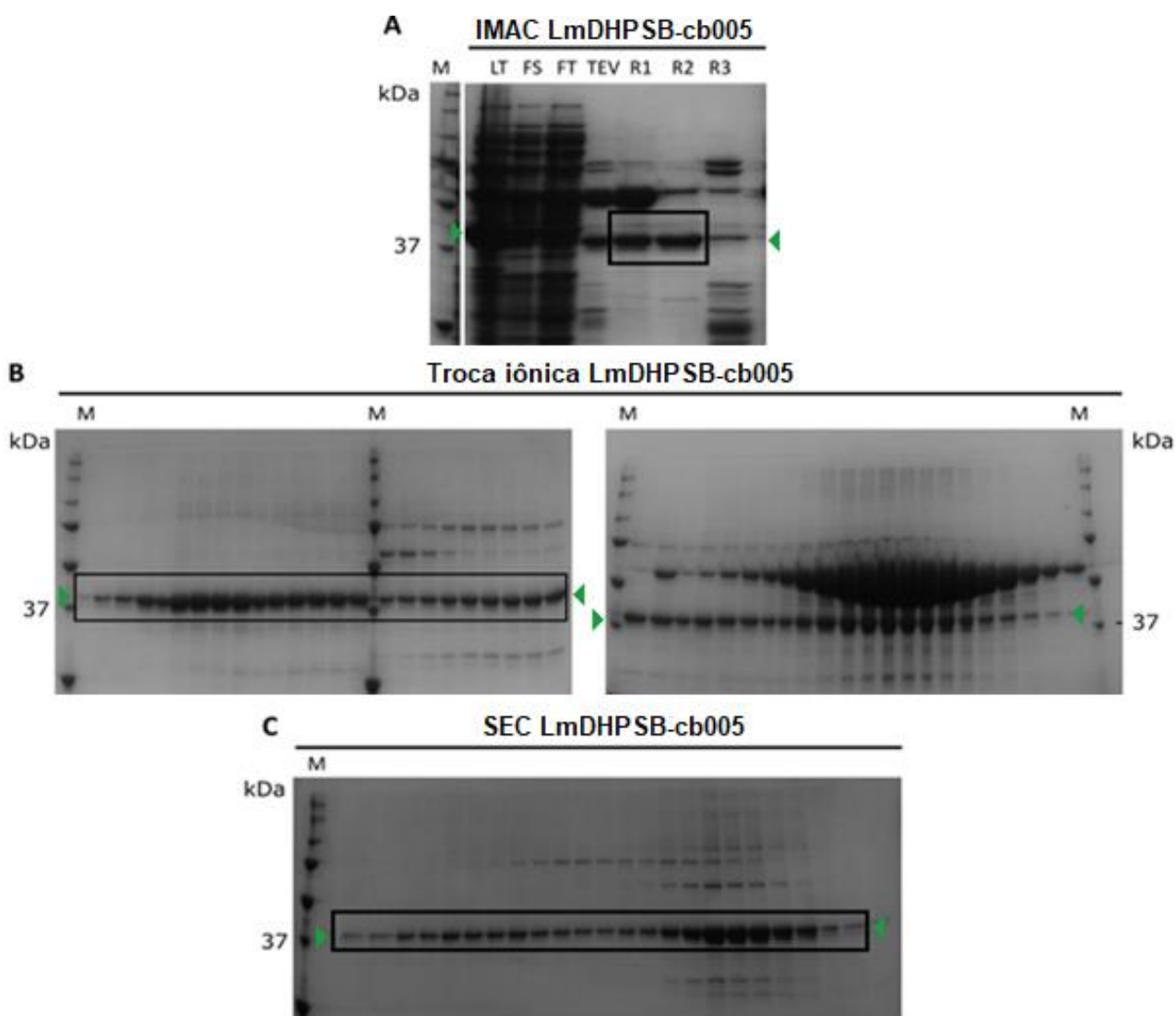
mesmo meio. As Figuras 29 e 30 a seguir mostram os resultados obtidos com esse experimento.

Figura 29. Purificação da LmDHPSA-cb007 com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli* em larga escala. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (FS), *flow-through* (FT). Análise por SDS-PAGE das amostras tratadas com protease TEV (TEV). A fração TEV gerou os seguintes estratos após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (R1), lavagem com 30 mM de imidazol (R2) e eluição em 300 mM de imidazol (R3). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanho esperado para a proteína com *tag*: 64,8 kDa e sem *tag*: 62,4 kDa. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da LmDHPSA-cb007. As frações proteicas destacadas com retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou coletadas para concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Figura 30. Purificação da LmDHPSB-cb005 com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli* em larga escala. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (FS), *flow-through* (FT). Análise por SDS-PAGE das amostras tratadas com protease TEV (TEV). A fração TEV gerou os seguintes estratos após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (R1), lavagem com 30 mM de imidazol (R2) e eluição em 300 mM de imidazol (R3). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após cromatografia de troca iônica. **(C)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanho esperado para a LmDHPSB-cb005 com *tag*: 43,4 kDa e sem *tag*: 41 kDa. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da LmDHPSB-cb005. As frações proteicas destacadas com retângulos passaram para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Assim como nos ensaios de produção e purificação de proteínas realizados em pequena escala, a IMAC foi empregada como o primeiro método de purificação de proteínas. A análise por SDS-PAGE das frações obtidas por IMAC revelou que a maioria das DHPSs recombinantes estavam presentes na fração insolúvel. Apesar disso, a IMAC foi capaz de enriquecer a LmDHPSA-cb007 e a LmDHPSB-cb005 a partir dos lisados celulares clarificados (Figuras 29A e 30A).

As amostras provenientes da primeira etapa de IMAC foram tratadas com protease TEV, sendo que esse tratamento foi capaz de clivar a *tag* His₆ N-terminal da LmDHPSA-cb007 e da LmDHPSB-cb005, já que uma mudança visível no tamanho dessas proteínas pode ser observada no gel (comparar as frações FS e TEV nas Figuras 29A e 30A).

As amostras tratadas com a protease TEV foram submetidas a uma segunda etapa de purificação por IMAC, com o intuito de remover os contaminantes provenientes da primeira etapa de purificação. Com isso, uma maior proporção das DHPSs foram obtidas a partir da porção *flow-through* (R2) (Figuras 29A e 30A), enquanto uma boa parcela dos contaminantes, incluindo as DHPSs com *tag* His₆ N-terminal e a protease TEV foram recuperados durante o processo de eluição (R4) (Figuras 29A e 30A). Uma quantidade substancial de DHPS foi encontrada na fração de lavagem com 30 mM de imidazol (R3) (Figuras 29A e 30A) e estas foram reunidas com as respectivas frações *flow-through* (R2) e submetidas às etapas seguintes de purificação.

A produção da LmDHPSB-cb005 utilizando a linhagem BL21 co-expressando o complexo de chaperonas GroES/GroEL, resultou na contaminação da LmDHPSB-cb005 com essas chaperonas, evidenciada pelas bandas fartas na altura de aproximadamente 60 kDa (frações TEV e R1 da Figura 30A). Portanto, na tentativa de remover esses contaminantes e obter a LmDHPSB-cb005 mais pura, foi realizada uma etapa extra de purificação por cromatografia de troca iônica (Figura 30B).

Após os processos de purificação, o rendimento final foi de 0,33 mg da LmDHPSA-cb007 purificada por L de cultura e de 0,35 mg da LmDHPSB-cb005 purificada por L de cultura, o que ainda é considerado um rendimento muito baixo, considerando os interesses futuros de realização de ensaios de cristalização e rastreamento de inibidores em larga escala com essas proteínas.

4.14. Clonagem das *Leishmania* sp. DHPs em vetores de expressão de *E. coli* alternativos

Como uma nova estratégia para melhorar o rendimento das isoformas da LmDHPS, as mesmas construções projetadas inicialmente para a clonagem no plasmídeo pNIC28-Bsa4 (Tabela 9) também foram clonadas em pNIC-CTH0, pSUMO-LIC e pNIC-Zb (Tabela 11), utilizando os genes sintéticos com otimização de códons para a produção de proteínas em *E. coli* como DNA molde para a PCR.

Foram obtidos amplicons para todas as construções planejadas. Estes foram posteriormente clonadas no vetor de expressão em *E. coli* via LIC. Ainda, as clonagens foram confirmadas por PCR de colônia e sequenciamento de DNA (dados não mostrados). Apenas as construções LmDHPSA-cb009, LmDHPSA-cb014, LmDHPSA-cb015, LmDHPSA-cb017 e LmDHPSB-cb017 não geraram clones positivos (Tabela 11).

Tabela 11. Informações detalhadas sobre as construções das LmDHPSs clonadas em pNIC-CTH0, pSUMO-LIC e pNIC-Zb.

Construção	Combinação de oligonucleotídeos		Vetor de expressão	Tamanho do amplicom (pb)	Massa molecular (Da)		Clonado
	Forward ^a	Reverse ^b			Com tag	Sem tag	
LmDHPSA-cb009	LmDHPSA F2 (1)	LmDHPSA R5 (601)	pNIC-CTH0	1844	66113,8	65203,9	Não
LmDHPSA-cb010	LmDHPSA F2 (1)	LmDHPSA R16 (576)	pNIC-CTH0	1769	63285,7	62375,8	Sim
LmDHPSA-cb011	LmDHPSA F2(1)	LmDHPSA R12 (582)	pNIC-CTH0	1787	64056,6	63146,7	Sim
LmDHPSA-cb012	LmDHPSA F2 (1)	LMDHPSA R8 (592)	pNIC-CTH0	1817	65136,8	64226,9	Sim
LmDHPSA-cb013	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R7 (601)	pNIC-Zb	1833	73383,0	64425,1	Sim
LmDHPSA-cb014	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R15 (576)	pNIC-Zb	1758	70554,9	61597,0	Não
LmDHPSA-cb015	LmDHPSA F4(1)	LmDHPSA R13 (582)	pNIC-Zb	1776	71325,7	62367,8	Não
LmDHPSA-cb016	LmDHPSA F4 (1)	LmDHPSA R10 (592)	pNIC-Zb	1806	72405,9	63448,0	Sim
LmDHPSA-cb017	LmDHPSA F3 (1)	LmDHPSA R6 (601)	pSUMO-LIC	1841	76897,9	64338,0	Não
LmDHPSA-cb018	LmDHPSA F3 (1)	LmDHPSA R14 (576)	pSUMO-LIC	1766	74069,7	61509,9	Sim
LmDHPSA-cb019	LmDHPSA F3 (1)	LmDHPSA R11 (582)	pSUMO-LIC	1784	74840,6	62280,7	Sim
LmDHPSA-cb020	LmDHPSA F3 (1)	LmDHPSA R9 (592)	pSUMO-LIC	1814	75920,8	63360,9	Sim
LmDHPSB-cb009	LmDHPSB F5 (1)	LmDHPSB R4 (379)	pNIC-CTH0	1178	42600,8	41690,9	Sim
LmDHPSB-cb010	LmDHPSB F9 (10)	LmDHPSB R4 (379)	pNIC-CTH0	1154	41836,9	40927,0	Sim
LmDHPSB-cb011	LmDHPSB F13 (15)	LmDHPSB R4 (379)	pNIC-CTH0	1139	41297,3	40387,4	Sim
LmDHPSB-cb012	LmDHPSB F16 (32)	LmDHPSB R4 (379)	pNIC-CTH0	1088	39680,5	38770,6	Sim
LmDHPSB-cb013	LmDHPSB F6 (1)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC-Zb	1167	49869,9	40912,0	Sim

LmDHPSB-cb014	LmDHPSB F10 (10)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC-Zb	1143	49106,1	40148,2	Sim
LmDHPSB-cb015	LmDHPSB F11 (15)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC-Zb	1128	48566,4	39608,5	Sim
LmDHPSB-cb016	LmDHPSB F15 (32)	LmDHPSB R3 (379)	pNIC-Zb	1077	46949,6	37991,8	Sim
LmDHPSB-cb017	LmDHPSB F7 (1)	LmDHPSB R2 (379)	pSUMO-LIC	1175	53384,8	40825,0	Não
LmDHPSB-cb018	LmDHPSB F8 (10)	LmDHPSB R2 (379)	pSUMO-LIC	1148	52489,7	39929,9	Sim
LmDHPSB-cb019	LmDHPSB F12 (15)	LmDHPSB R2 (379)	pSUMO-LIC	1133	51950,1	39390,3	Sim
LmDHPSB-cb020	LmDHPSB F14 (32)	LmDHPSB R2 (379)	pSUMO-LIC	1082	50333,3	37773,5	Sim

^{a, b}: Os números entre parênteses representam o primeiro (^a) e o último (^b) aminoácido de acordo com a ORF predita.

Fonte: autoria própria.

Devido à grande semelhança de sequência primária entre as diferentes espécies de *Leishmania*, também foi adotada uma abordagem de clonagem multiespécie com as DHPSSs, combinada com a fusão dessas proteínas a uma *tag* de afinidade, como SUMO, tiorredoxina (TRX) ou proteína de ligação à maltose (MBP) (BUTT et al., 2005; HEWITT et al., 2011; KAPUST; WAUGH, 1999; LAVALLIE et al., 2000). Para tanto, as sequências *full-length* das duas isoformas da DHPS de *L. braziliensis* (LbDHPSA e LbDHPSB), *L. donovani* (LdDHPSA e LdDHPSB), *L. infantum* (LiDHPSA e LiDHPSB), *L. major* (LmDHPSA e LmDHPSB) e *L. mexicana* (LmeDHPSA e LmeDHPSB) foram amplificadas por PCR e clonadas nos vetores de expressão de *E. coli* pAVA0421, pAVAMBP, pAVATRX e pAVASUMO (Tabela 2) por LIC.

Os vetores pAVAMBP, pAVATRX e pAVASUMO incluem a *tag* desejada (MBP, TRX e SUMO, respectivamente) entre a *tag* His₆ e o sítio de reconhecimento de clivagem da protease 3C, permitindo a remoção de ambas *tags* do N-terminal durante o processo de purificação das proteínas. Nesses plasmídeos, o sítio de clivagem da protease 3C está localizado quatro aminoácidos à montante do sítio de início da tradução da proteína alvo, o que permite empregar a mesma sequência de inserção para a clonagem LIC em todos os vetores da série AVA. Essa estratégia permite a utilização do mesmo produto de PCR tratado com polimerase T4 durante o processo de clonagem em qualquer um dos vetores citados (HEWITT et al., 2011).

Como resultado, 35 das 40 construções projetadas foram clonadas nos diferentes vetores de expressão (Tabela 12). Apenas a LbDHPSA-cb001 (isoforma A da *L. braziliensis* em pAVA0421), LmeDHPSA-cb001 (isoforma A da *L. mexicana* em pAVA0421), LmeDHPSA-cb002 (isoforma A da *L. mexicana* em pAVA-MBP), LdDHPSB-cb003 (isoforma B da *L. donovani* em pAVA-TRX) e LmDHPSB-cb002 (isoforma B da *L. major* em pAVA-MBP) não geraram clones positivos (Tabela 12).

Tabela 12. Informações detalhadas sobre as construções das Leishmania sp. DHPSs clonadas em vetores AVA.

Construção	Combinação de oligonucleotídeos		Vetor de expressão	Tamanho do amplicom (pb)	Massa molecular (Da)		Clonado
	Forward ^a	Reverse ^b			Com tag	Sem tag	
LbDHPSA-cb001	LbDHPSA F(1)	LbDHPSA R(600)	pAVA0421	1866	67351,4	65348,2	Não
LbDHPSA-cb002	LbDHPSA F(1)	LbDHPSA R(600)	pAVA-MBP	3021	110013,5		Sim
LbDHPSA-cb003	LbDHPSA F(1)	LbDHPSA R(600)	pAVA-TRX	2181	79137,0		Sim
LbDHPSA-cb004	LbDHPSA F(1)	LbDHPSA R(600)	pAVA-SUMO	2145	78535,0		Sim
LdDHPSA-cb001	LdDHPSA F(1)	LdDHPSA R(601)	pAVA0421	1869	66573,4	64570,2	Sim
LdDHPSA-cb002	LdDHPSA F(1)	LdDHPSA R(601)	pAVA-MBP	3024	109235,5		Sim
LdDHPSA-cb003	LdDHPSA F(1)	LdDHPSA R(601)	pAVA-TRX	2184	78359,0		Sim
LdDHPSA-cb004	LdDHPSA F(1)	LdDHPSA R(601)	pAVA-SUMO	2148	77757,0		Sim
LiDHPSA-cb001	LiDHPSA F(1)	LiDHPSA R(601)	pAVA0421	1869	66625,4	64622,2	Sim
LiDHPSA-cb002	LiDHPSA F(1)	LiDHPSA R(601)	pAVA-MBP	3024	109287,5		Sim
LiDHPSA-cb003	LiDHPSA F(1)	LiDHPSA R(601)	pAVA-TRX	2184	78411,0		Sim
LiDHPSA-cb004	LiDHPSA F(1)	LiDHPSA R(601)	pAVA-SUMO	2148	77809,0		Sim
LmDHPSA-cb001	LmDHPSA F(1)	LmDHPSA R(601)	pAVA0421	1869	66622,2	64619,0	Sim
LmDHPSA-cb002	LmDHPSA F(1)	LmDHPSA R(601)	pAVA-MBP	3024	109284,3		Sim
LmDHPSA-cb003	LmDHPSA F(1)	LmDHPSA R(601)	pAVA-TRX	2184	78407,8		Sim
LmDHPSA-cb004	LmDHPSA F(1)	LmDHPSA R(601)	pAVA-SUMO	2148	77805,8		Sim

LmeDHPSA-cb001	LmeDHPSA F(1)	LmeDHPSA R(601)	pAVA0421	1869	66744,3	64741,1	Não
LmeDHPSA-cb002	LmeDHPSA F(1)	LmeDHPSA R(601)	pAVA-MBP	3024	109406,4		Não
LmeDHPSA-cb003	LmeDHPSA F(1)	LmeDHPSA R(601)	pAVA-TRX	2184	78529,9		Sim
LmeDHPSA-cb004	LmeDHPSA F(1)	LmeDHPSA R(601)	pAVA-SUMO	2148	77927,9		Sim
LbDHPSB-cb001	LbDHPSB F(1)	LbDHPSB R(379)	pAVA0421	1203	43093,8	41090,6	Sim
LbDHPSB-cb002	LbDHPSB F(1)	LbDHPSB R(379)	pAVA-MBP	2358	85755,9		Sim
LbDHPSB-cb003	LbDHPSB F(1)	LbDHPSB R(379)	pAVA-TRX	1518	54879,4		Sim
LbDHPSB-cb004	LbDHPSB F(1)	LbDHPSB R(379)	pAVA-SUMO	1482	54277,4		Sim
LdDHPSB-cb001	LdDHPSB F(1)	LdDHPSB R(379)	pAVA0421	1203	43055,9	41052,7	Sim
LdDHPSB-cb002	LdDHPSB F(1)	LdDHPSB R(379)	pAVA-MBP	2358	85718,0		Sim
LdDHPSB-cb003	LdDHPSB F(1)	LdDHPSB R(379)	pAVA-TRX	1518	54841,5		Não
LdDHPSB-cb004	LdDHPSB F(1)	LdDHPSB R(379)	pAVA-SUMO	1482	54239,5		Sim
LiDHPSB-cb001	LiDHPSB F(1)	LiDHPSB R(379)	pAVA0421	1203	43083,0	41079,8	Sim
LiDHPSB-cb002	LiDHPSB F(1)	LiDHPSB R(379)	pAVA-MBP	2358	85745,1		Sim
LiDHPSB-cb003	LiDHPSB F(1)	LiDHPSB R(379)	pAVA-TRX	1518	54868,6		Sim
LiDHPSB-cb004	LiDHPSB F(1)	LiDHPSB R(379)	pAVA-SUMO	1482	54266,6		Sim
LmDHPSB-cb001	LmDHPSB F(1)	LmDHPSB R(379)	pAVA0421	1203	43108,9	41105,7	Sim
LmDHPSB-cb002	LmDHPSB F(1)	LmDHPSB R(379)	pAVA-MBP	2358	85771,0		Não
LmDHPSB-cb003	LmDHPSB F(1)	LmDHPSB R(379)	pAVA-TRX	1518	54894,5		Sim
LmDHPSB-cb004	LmDHPSB F(1)	LmDHPSB R(379)	pAVA-SUMO	1482	54292,5		Sim

LmeDHPSB-cb001	LmeDHPSB F(1)	LmeDHPSB R(379)	pAVA0421	1203	43054,9	41051,7	Sim
LmeDHPSB-cb002	LmeDHPSB F(1)	LmeDHPSB R(379)	pAVA-MBP	2358	85717,0		Sim
LmeDHPSB-cb003	LmeDHPSB F(1)	LmeDHPSB R(379)	pAVA-TRX	1518	54840,5		Sim
LmeDHPSB-cb004	LmeDHPSB F(1)	LmeDHPSB R(379)	pAVA-SUMO	1482	54238,5		Sim

^{a, b}: Os números entre parênteses representam o primeiro (^a) e o último (^b) aminoácido de acordo com a ORF predita.

Fonte: autoria própria.

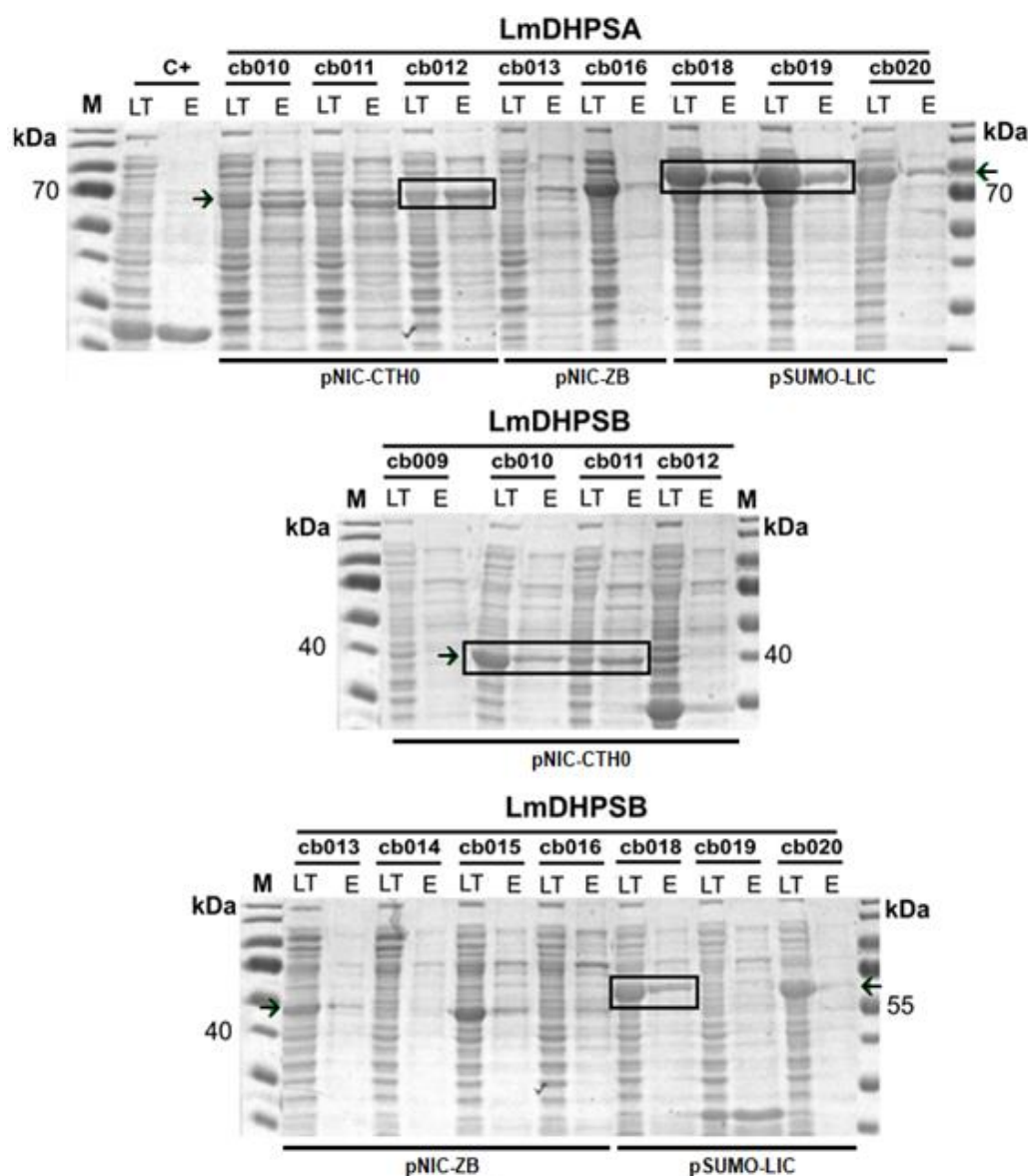
4.15. Expressão em pequena escala (volume = 1 mL) das isoformas da LmDHPS clonadas em pNIC-CTH0, pNIC-ZB e pSUMO-LIC

Para encontrar as melhores construções e condições para a produção das LmDHPSs, todos os clones positivos (Tabela 11) foram submetidos ao teste de expressão em pequena escala utilizando a linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli*, seguido da purificação por IMAC a partir de lisados celulares clarificados (BURGESS-BROWN et al., 2014; SAVITSKY et al., 2010).

Conforme observado na Figura 31 a seguir, o teste de expressão em pequena escala revelou que todas as oito construções da LmDHPSA clonadas nos vetores pNIC-CTH0, pNIC-ZB e pSUMO-LIC (LmDHPSA-cb010, LmDHPSA-cb011, LmDHPSA-cb012, LmDHPSA-cb013, LmDHPSA-cb016, LmDHPSA-cb018, LmDHPSA-cb019 e LmDHPSA-cb020) foram produzidas na forma solúvel ou parcialmente solúvel na linhagem bacteriana utilizada. Destas, as construções LmDHPSA-cb012, LmDHPSA-cb018 e LmDHPSA-cb019 foram selecionadas como candidatas para a produção de proteínas em larga escala, pois apresentaram os melhores resultados de solubilidade durante o teste de expressão em pequena escala (Figura 31).

Além disso, seis das 11 construções da LmDHPSB clonadas nos vetores pNIC-CTH0, pNIC-ZB e pSUMO-LIC (LmDHPSB-cb010, LmDHPSB-cb011, LmDHPSB-cb013, LmDHPSB-cb015, LmDHPSB-cb018 e LmDHPSB-cb020) foram produzidas na forma solúvel ou parcialmente solúvel na linhagem bacteriana utilizada. Destas, as construções LmDHPSB-cb010, LmDHPSB-cb011 e LmDHPSB-cb018 foram selecionadas como candidatas para serem produzidas em larga escala, pois demonstraram os melhores resultados de solubilidade durante o teste de expressão em pequena escala (Figura 31).

Figura 31. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão em pequena escala com as LmDHPSs clonadas em pNIC-CTH0, pNIC-ZB e pSUMO-LIC. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). LT: lisado total. E: frações eluídas em tampão contendo 300 mM de imidazol. C+: controle positivo de expressão de proteínas em *E. coli* utilizado pelo CQMED (resíduos M1 a T248 do gene NANPA clonado em pNIC28-Bsa4; 30,4 kDa). Tamanhos aproximados das proteínas em kDa: LmDHPSA-cb010: 63,3; LmDHPSA-cb011: 64; LmDHPSA-cb012: 65; LmDHPSA-cb013: 73,4; LmDHPSA-cb016: 72,4; LmDHPSA-cb018: 74; LmDHPSA-cb019: 74,8; LmDHPSA-cb020: 76; LmDHPSB-cb009: 42,6; LmDHPSB-cb010: 42; LmDHPSB-cb011: 41,3; LmDHPSB-cb012: 39,7; LmDHPSB-cb013: 50; LmDHPSB-cb014: 49; LmDHPSB-cb015: 48,6; LmDHPSB-cb016: 47; LmDHPSB-cb018: 52,5; LmDHPSB-cb019: 52; LmDHPSB-cb020: 50,3. M: marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10 kDa, ThermoFisher Scientific). As setas indicam a localização das bandas das LmDHPSs. As construções destacadas com os retângulos apresentaram a melhor solubilidade foram selecionadas como candidatas para serem produzidas em larga escala.



Fonte: autoria própria.

4.16. Expressão em pequena escala das *Leishmania sp.* DHPSs full-length clonadas em vetores AVA

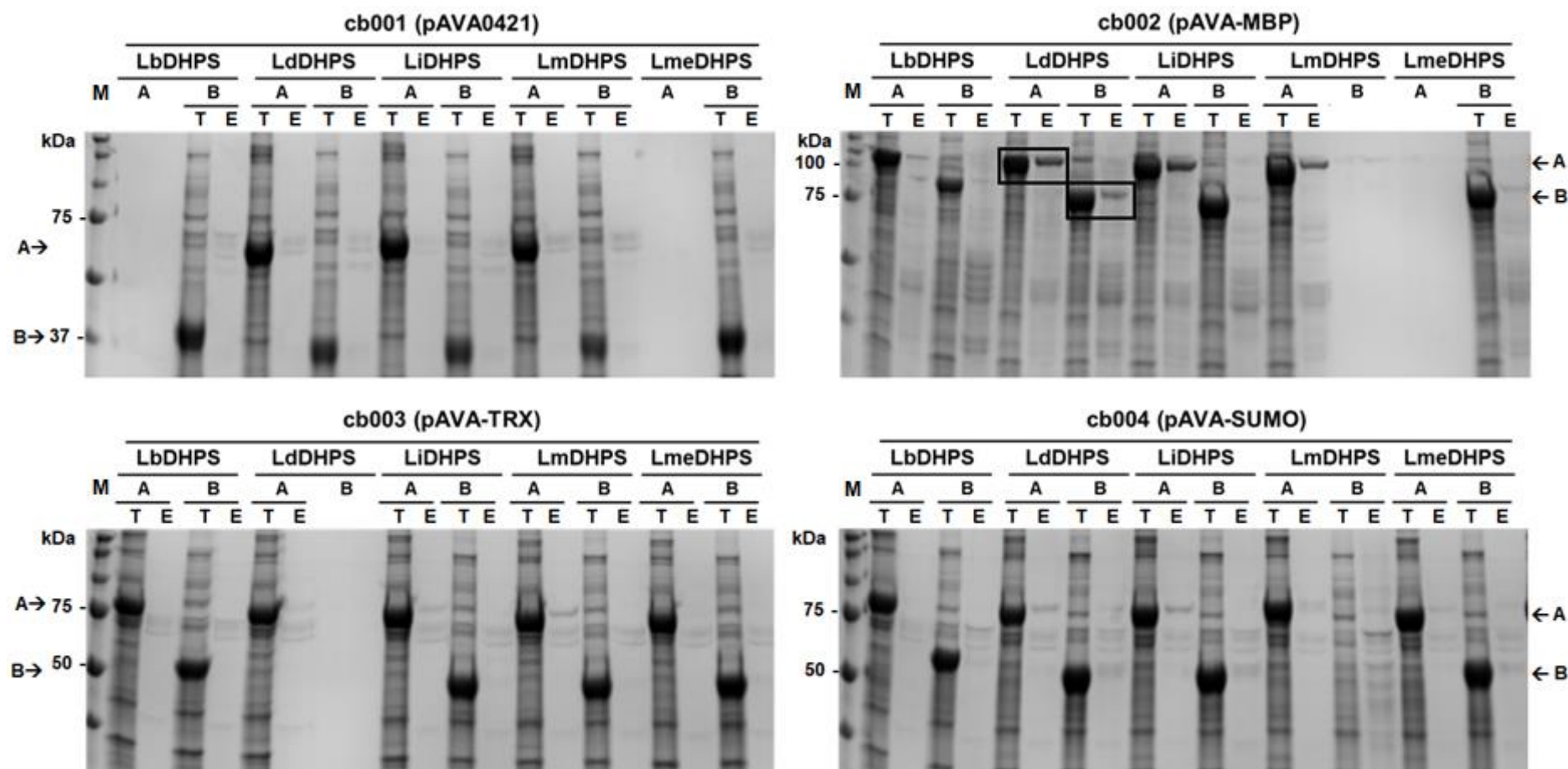
O grupo de purificação de proteínas do *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Diseases* (SSGCID) do Dr. Wesley C. Van Voorhis, na Universidade de Washington, Seattle-EUA, onde o projeto BEPE (BEPE FAPESP 2019/24812-0) foi desenvolvido, vem utilizando um *pipeline* para produção de proteínas que emprega vetores de expressão de proteínas em *E. coli*, incluindo a série AVA (BRYAN et al., 2011; CHOI et al., 2011), que são compatíveis com o protocolo de produção de proteínas por autoindução (BRYAN et al., 2011, 2011; STUDIER, 2005).

A produção de proteínas por autoindução é geralmente mais conveniente do que a indução por IPTG, uma vez que a linhagem de expressão é simplesmente inoculada em meio autoindutor e cultivada até a saturação sem a necessidade de acompanhar o crescimento da cultura e adicionar o indutor no momento adequado. Além disso, a densidade da cultura e a concentração da proteína alvo por volume de cultura são tipicamente maiores do que as obtidas pela indução convencional com IPTG (STUDIER, 2005).

Sendo assim, para encontrar as melhores construções e condições para a produção das *Leishmania sp.* DHPSs full-length por autoindução, todos os clones positivos foram submetidos ao teste de expressão em pequena escala utilizando a linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli*, seguido da purificação por IMAC a partir de lisados celulares clarificados (BRYAN et al., 2011; CHOI et al., 2021).

O teste de expressão em pequena escala revelou que, de todas as construções clonadas com sucesso, apenas a DHPS de *L. donovani* clonada no vetor pAVA-MBP produziu ambas isoformas na forma solúvel (Figura 32).

Figura 32. SDS-PAGE das frações obtidas com o teste de expressão em pequena escala com as *Leishmania sp.* DHPSS *full-length* clonadas nos vetores AVA. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). A: isoforma A. B: isoforma B. T: lisado total. E: fração eluída em imidazol 300 mM. As setas indicam a localização esperada das bandas das *Leishmania sp.* DHPSS *full-length*. As construções destacadas com os retângulos foram selecionadas para produção de proteína em larga escala.



Fonte: autoria própria.

A insolubilidade pode ser uma propriedade intrínseca de uma proteína particular ou pode ser uma consequência de propriedades de dobramento inadequadas do hospedeiro de expressão. Uma estratégia bem estabelecida para aumentar a expressão e a solubilidade de uma proteína é fundir a proteína alvo a um *tag* de afinidade relativamente grande, como a MBP (40,3 kDa) (HEWITT et al., 2011; KAPUST; WAUGH, 1999). Neste caso, a MBP altamente solúvel poderia atuar como uma chaperona sequestrando a proteína nascente propensa à agregação, mas de maneira reversível fraca, permitindo o dobramento correto da mesma (HEWITT et al., 2011; KAPUST; WAUGH, 1999).

4.17. Produção das *Leishmania* sp. DHPs utilizando o biorreator LEX e purificação dessas proteínas em larga escala

A produção de proteínas por autoindução é mais conveniente do que a produção de proteínas por indução pelo IPTG e a concentração da proteína alvo por volume de cultura é geralmente maior do que a obtida pela indução convencional (STUDIER, 2005). Por esse motivo, o processo de aumento de escala da produção das novas *Leishmania* sp. DHPs foi realizado inicialmente com as construções LdDHPSA-cb002 e LdDHPSB-cb002 (isoformas da DHPS de *L. donovani* clonadas no vetor pAVA-MBP).

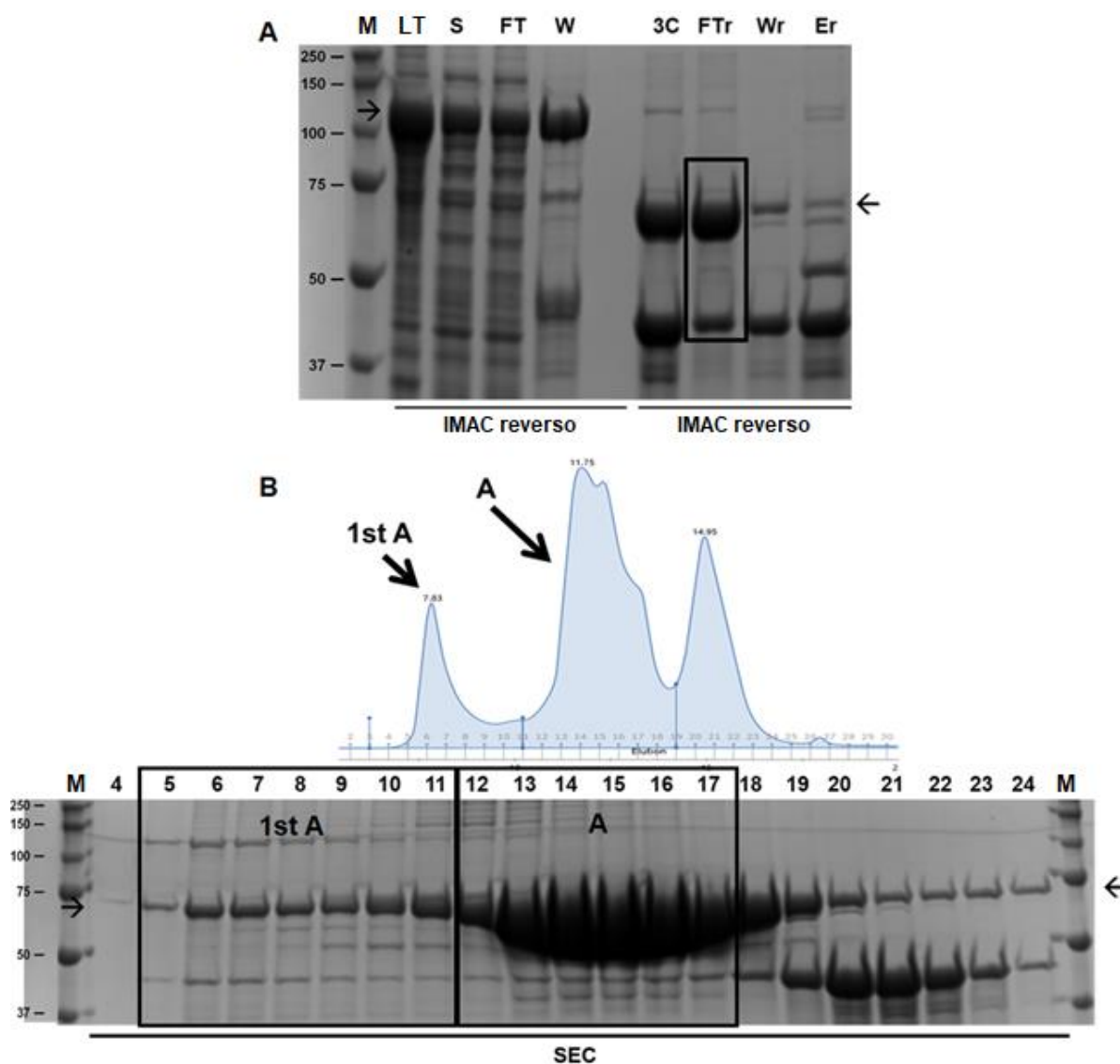
Portanto, para confirmar os resultados obtidos com o teste de expressão em pequena escala, no qual apenas a LdDHPS clonada no vetor pAVA-MBP produziu ambas isoformas na forma solúvel, as construções LdDHPSA-cb002 e LdDHPSB-cb002 transformadas na linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli* foram cultivadas em 4 L de meio de autoindução ZYP-5052 no biorreator LEX.

Além disso, considerando os problemas de solubilidade apresentados por essas proteínas, foi adicionada uma mistura de L-arginina e L-ácido glutâmico a 50 mM no momento da lise celular, pois alguns trabalhos anteriores demonstraram que a adição de misturas equimolares desses aminoácidos aumenta a solubilidade de várias proteínas pouco solúveis e previne a agregação e precipitação das mesmas (GOLOVANOV et al., 2004; SHUKLA; TROUT, 2011).

Como nos experimentos em pequena escala, a IMAC foi utilizada como a primeira etapa de purificação da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 a partir de volumes maiores de cultura. A análise por SDS-PAGE das frações geradas pela IMAC

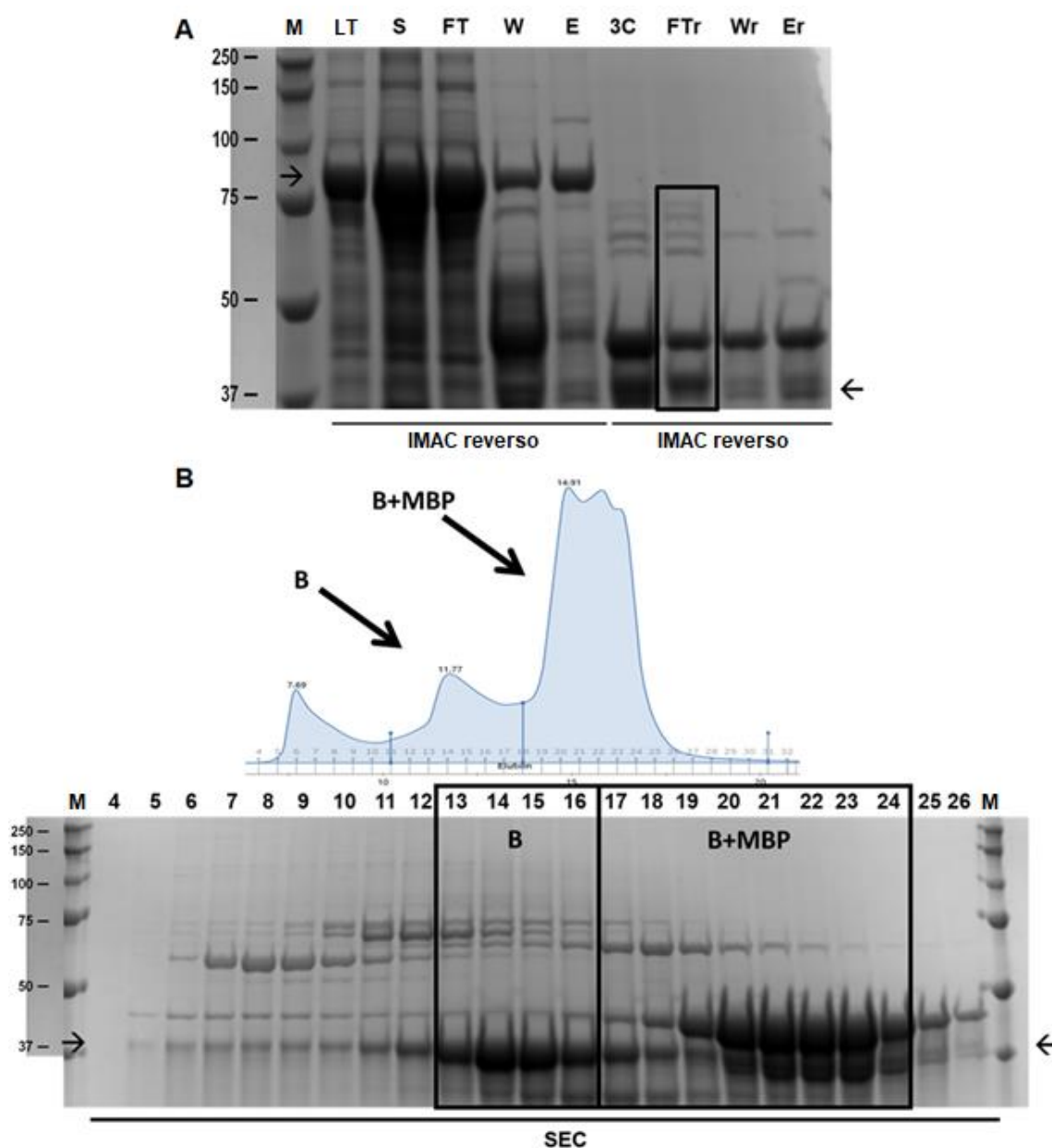
confirmou que este processo de purificação enriqueceu com sucesso as LdDHPSs provenientes dos lisados celulares clarificados (Figuras 33 e 34).

Figura 33. Purificação em larga escala da LdDHPSA-cb002. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (W); fração eluída após tratamento com protease HRV-3C (3C). A fração 3C foi purificada por uma segunda etapa de IMAC e gerou as seguintes frações: *flow-through* (FTr), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (Wr) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após a SEC. Tamanho aproximado da LdDHPSA-cb002 em kDa, com *tag*: 109,2; sem *tag*: 64,6. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da LdDHPSA-cb002. As frações destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para a concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Figura 34. Purificação em larga escala da LdDHPSB-cb002. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (W) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (E); fração eluída após tratamento com protease HRV-3C (3C). A fração 3C foi purificada por uma segunda etapa de IMAC e gerou as seguintes frações: *flow-through* (FTr), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (Wr) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanho aproximado da LdDHPSB-cb002 em kDa, com *tag*: 85,7; sem *tag*: 41,1. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da LdDHPSB-cb002. As frações destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para a concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

As LdDHPSSs recombinantes obtidas com a primeira etapa de purificação por IMAC foram tratadas *overnight* com a protease HRV-3C, em uma razão molar de 15:1 de LdDHPSS para HRV-3C. Este tratamento removeu eficientemente as *tags* His₆/MBP da região N-terminal das LdDHPSSs (3C nas Figuras 33A e 34A), pois uma redução no tamanho das LdDHPSSs de cerca de 44 kDa pode ser observada no gel.

Para remover as proteínas que se ligaram de forma inespecífica durante a primeira etapa da IMAC, as amostras tratadas com HRV-3C foram submetidas a uma segunda etapa de IMAC. Nesta etapa, a maioria das LdDHPSSs foi encontrada na fração *flow-through* (FTr nas Figuras 33A e 34A). Em contraste, a maioria dos contaminantes (incluindo LdDHPSSs contendo o *tag* His₆/MBP remanescentes, *tag* His₆/MBP livre e protease 3C) foram encontrados na fração de lavagem com 30 mM de imidazol (Wr nas Figuras 33A e 34A) e na fração eluída da resina com tampão contendo 300 mM imidazol (Er nas Figuras 33A e 34A). A fração *flow-through*, que incluiu a maior parte das LdDHPSSs, foi utilizada para a purificação por SEC (Figura 33B e 34B).

As Figuras 33B e 34B mostram que os cromatogramas da SEC para ambas as isoformas da LdDHPSSs apresentaram múltiplos picos assimétricos. As frações correspondentes aos picos 1st A, A, B e B+MBP (indicadas nas Figuras 33B e 34B) foram reunidas, e a atividade enzimática para estas proteínas foi testada *in vitro* (descrito a seguir no tópico 4.19).

Os rendimentos finais a partir de 4 L de cultura foram de 14 mg de LdDHPSSB-cb002 purificada (pico A; 3,5 mg de proteína por L de cultura) e 4 mg de LdDHPSSB-cb002 purificada (pico B; 1,0 mg de proteína por L de cultura).

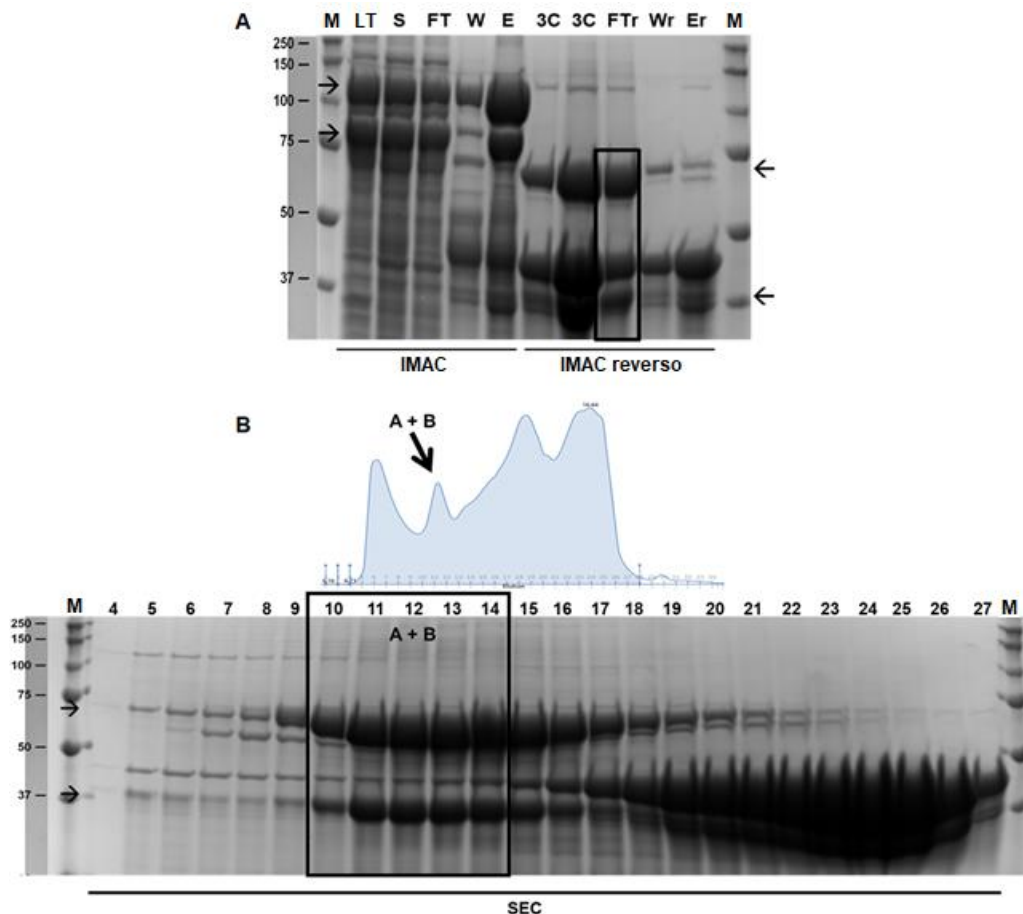
Mesmo após as três etapas de purificação, a LdDHPSSB-CB002 apresentou-se ainda muito contaminada, principalmente pelo MBP clivado (Figura 34B). Isso pode ter acontecido pois o MBP altamente solúvel atua como uma chaperona, sequestrando a proteína nascente propensa à agregação, permitindo o enovelamento conformacional nativo da mesma (HEWITT et al., 2011; KAPUST; WAUGH, 1999), o que pode significar que a LdDHPSSB não se dobra adequadamente quando está isolada e precisou do MBP para se tornar mais estável.

Considerando a hipótese de que a LdDHPSSA possa auxiliar na estabilização da LdDHPSSB, foi realizada a lise combinada da LdDHPSSA-cb002 e da LdDHPSSB-cb002 na presença de L-arginina e L-ácido glutâmico 50 mM. Além da lise combinada, todos

os procedimentos de purificação de proteínas para obtenção das LdDHPSs foram executados como descrito anteriormente.

A Figura 35 a seguir mostra o resultado obtido com a purificação combinada da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002).

Figura 35. Purificação em larga escala da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 em combinação. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (W) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (E); fração eluída após tratamento com protease HRV-3C (3C). A fração 3C foi purificada por uma segunda etapa de IMAC e gerou as seguintes frações: *flow-through* (FTr), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (Wr) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após a SEC. Tamanhos aproximados das LdDHPSs em kDa, com *tag* = LdDHPSA-cb002: 109,2 e LdDHPSB-cb002: 85,7; sem *tag* = LdDHPSA-cb002: 64,6 e LdDHPSB-cb002: 41,1. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da LdDHPSA e da LdDHPSB. As frações destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para a concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Conforme observado na Figura 35B, o cromatograma da SEC relativo à purificação combinada da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 também apresentou múltiplos picos assimétricos. Além disso, o rendimento final a partir de 8 L de cultura (4 L para cada construção) foi de 15 mg de LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificada (1,9 mg de proteína por L de cultura) e, aparentemente, mais pura do que as isoformas purificadas separadamente. A atividade enzimática para o pico A+B também foi testada *in vitro* (descrito no tópico 4.19 a seguir).

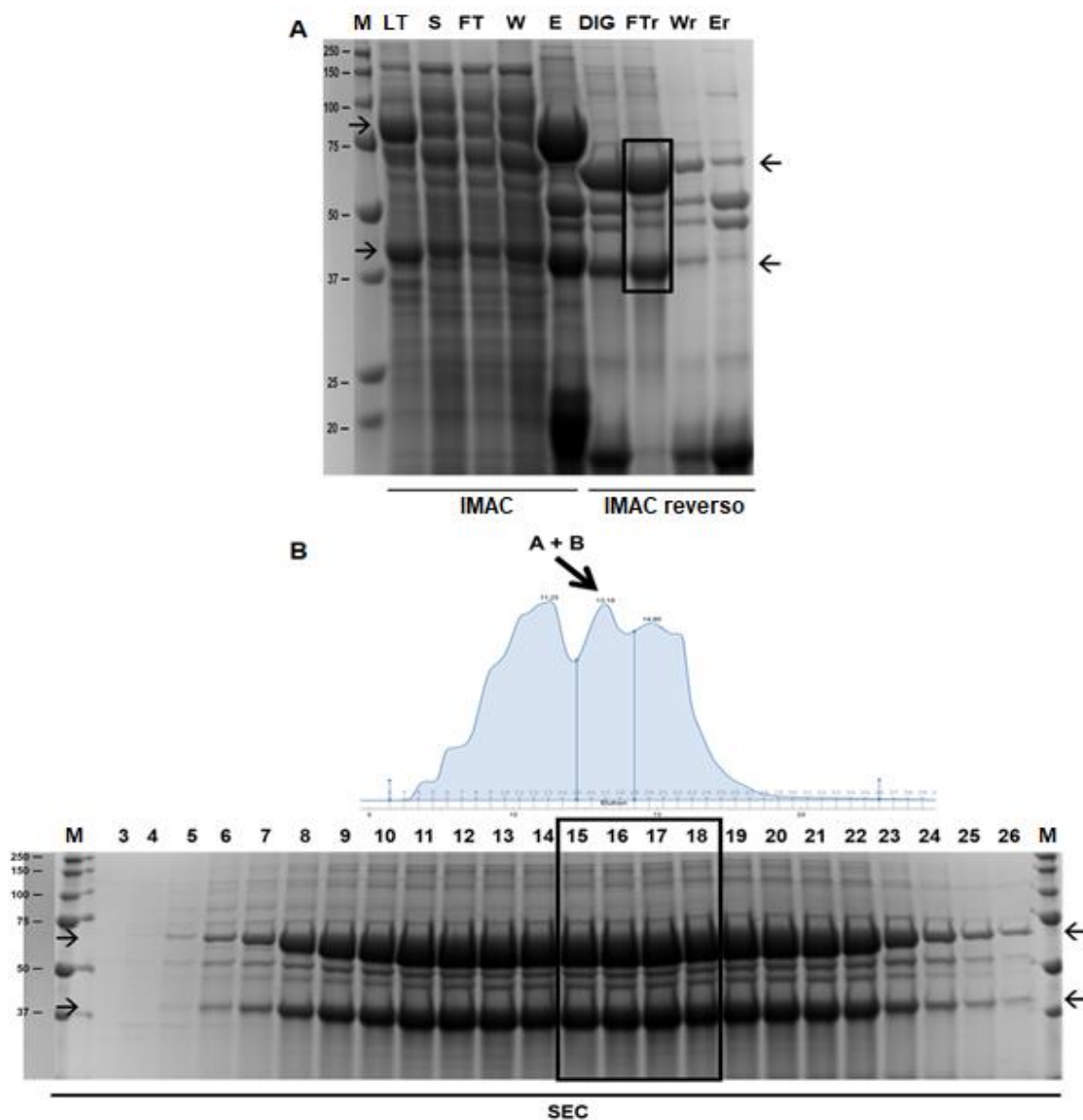
Apesar das LdDHPSs obtidas até o momento não serem altamente puras, o presente trabalho abriu caminho para uma melhor caracterização bioquímica e estrutural dessas proteínas.

Considerando todos os esforços despendidos para obter as novas construções da LmDHPS e o fato de que as LdDHPSs não foram obtidas com um alto grau de pureza, o processo de produção e purificação das construções LmDHPSA-cb018 e LmDHPSB-cb010 foi realizado utilizando a linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli*. Para isso essas células carregando a LmDHPSA-cb018 (clonada no vetor pSUMO-LIC) e a LmDHPSB-cb010 (clonada no vetor pNIC-CTH0) foram cultivadas em 12 L de meio TB (para cada isoforma da LmDHPS) no biorreator LEX.

A produção dessas proteínas por autoindução também foi testada, mas nenhuma proteína solúvel foi produzida empregando esta metodologia (dados não mostrados). Consequentemente, a expressão das LmDHPSs recombinantes foi induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura.

Após a produção dessas proteínas, foi realizada a lise combinada das construções LmDHPSA-cb018 e a LmDHPSB-cb010 em tampão de lise acrescido de L-arginina e L-ácido glutâmico 50 mM. Como nos experimentos em pequena escala, a IMAC foi empregada como a primeira etapa de purificação das LmDHPSs a partir de volumes maiores de cultura. A análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC confirmou que este processo de purificação enriqueceu com sucesso as LmDHPSs a partir de lisados celulares clarificados (Figura 36).

Figura 36. Purificação em larga escala da LmDHPSA-cb018 e da LmDHPSB-cb010 em combinação. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (W) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (E); fração eluída após tratamento com as proteases de SUMO e TEV (DIG). A fração DIG foi ainda purificada por uma segunda etapa de IMAC e gerou as seguintes frações: *flow-through* (FTr), lavagem com tampão contendo imidazol 30mM (Wr) e eluição com tampão contendo imidazol 300mM (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após a SEC. Tamanhos aproximados das LmDHPSs em kDa, com *tag* = LmDHPSA-cb018: 74,1 e LmDHPSB-cb010: 41,8; sem *tag* = LmDHPSA-cb018: 61,5 e LmDHPSB-cb010: 40,9. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da LmDHPSA e da LmDHPSB. As frações destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para a concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

As LmDHPSs recombinantes obtidas na primeira etapa de IMAC foram tratadas *overnight* com as proteases TEV e de SUMO, em uma razão molar de 15:1 de LmDHPSs para as proteases TEV ou de SUMO. Este tratamento removeu eficientemente os *tags* His₆/SUMO da LmDHPSA-cb018 e o *tag* His₆ da LmDHPSB-cb010 (DIG na Figura 36A), pois uma mudança visível no tamanho dessas proteínas, de cerca de 13 kDa para a LmDHPSA-cb018 e de 1 kDa para a LmDHPSB-cb010 foi observada no gel (DIG na Figura 36A).

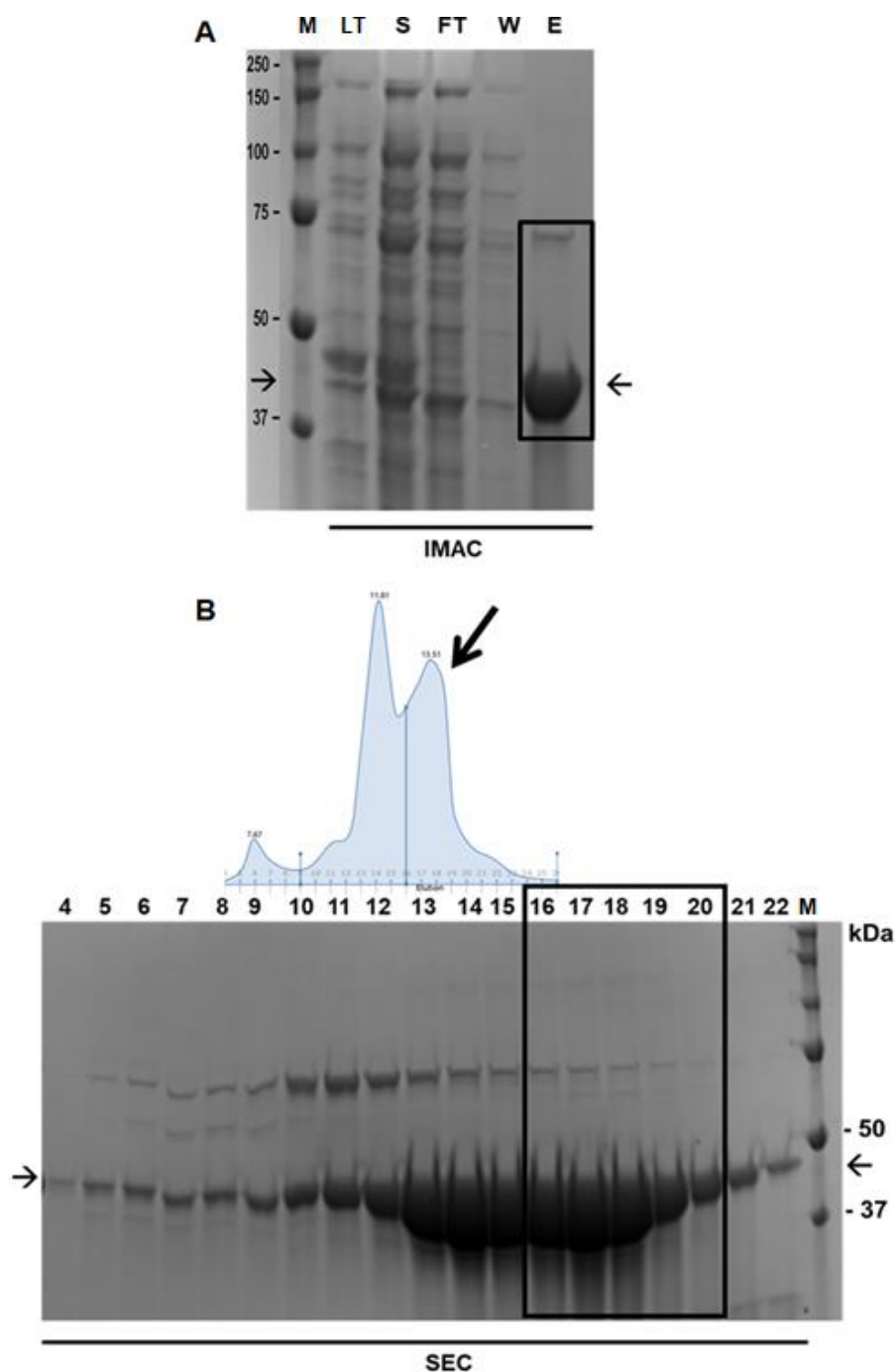
Para remover as proteínas que se ligaram de forma inespecífica durante a primeira etapa de IMAC, as amostras digeridas foram submetidas a uma segunda etapa de IMAC. Nesta etapa, a maioria das LmDHPSs foram encontradas na fração *flow-through* (FTr na Figura 36A), enquanto a maioria dos contaminantes – incluindo as LmDHPSs não digeridas, proteases de SUMO e TEV e *tag* SUMO livre foram encontrados na fração de lavagem com imidazol 30 mM (Wr na Figura 36A) e na fração eluída da resina com tampão contendo imidazol 300 mM (Er nas Figuras 36A). A fração *flow-through*, que continha a maioria das LmDHPSs, foi utilizada na próxima etapa de purificação por SEC (Figura 36B).

A Figura 36B mostra que o cromatograma gerado pela SEC relativo à purificação combinada das LmDHPSs também produziu picos assimétricos múltiplos. O rendimento final a partir de 24 L de cultura (12 L para cada isoforma) foi de 12 mg de LmDHPSA-cb010+LmDHPSB-cb010 purificada, correspondendo a um rendimento de 0,5 mg da LmDHPSA-cb010+LmDHPSB-cb010 purificada por L de cultura. Mais uma vez, a pureza dessas proteínas não foi muito alta (Figura 36B).

Finalmente, a produção e purificação da HsDHPS foi escalonada empregando a linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli* cultivada em 4 L de meio TB no biorreator LEX. A produção dessa proteína por autoindução foi testada, mas nenhuma proteína solúvel foi produzida empregando essa metodologia (dados não mostrados). Consequentemente, a expressão da HsDHPS recombinante foi induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura.

A IMAC também foi utilizada como a primeira etapa de purificação para a HsDHPS a partir de volumes maiores de cultura. A análise por SDS-PAGE das frações gerados pela IMAC confirmou que este processo de purificação enriqueceu com sucesso a HsDHPS obtida a partir de lisados celulares clarificados (Figura 37A). Como a construção da HsDHPS não possui um *tag* HIS₆ clivável, a fração eluída durante a IMAC foi utilizada para purificação por SEC (Figura 37B).

Figura 37. Purificação em larga escala da HsDHPS. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações obtidas com a IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (W), eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (E). **(B)** Análise por SDS-PAGE após a SEC. Tamanho aproximado da HsDHPS em kDa com *tag*: 42,0. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da HsDHPS. As frações destacadas com os retângulos foram selecionadas para a etapa de purificação subsequente ou foram coletadas para a concentração final da proteína.



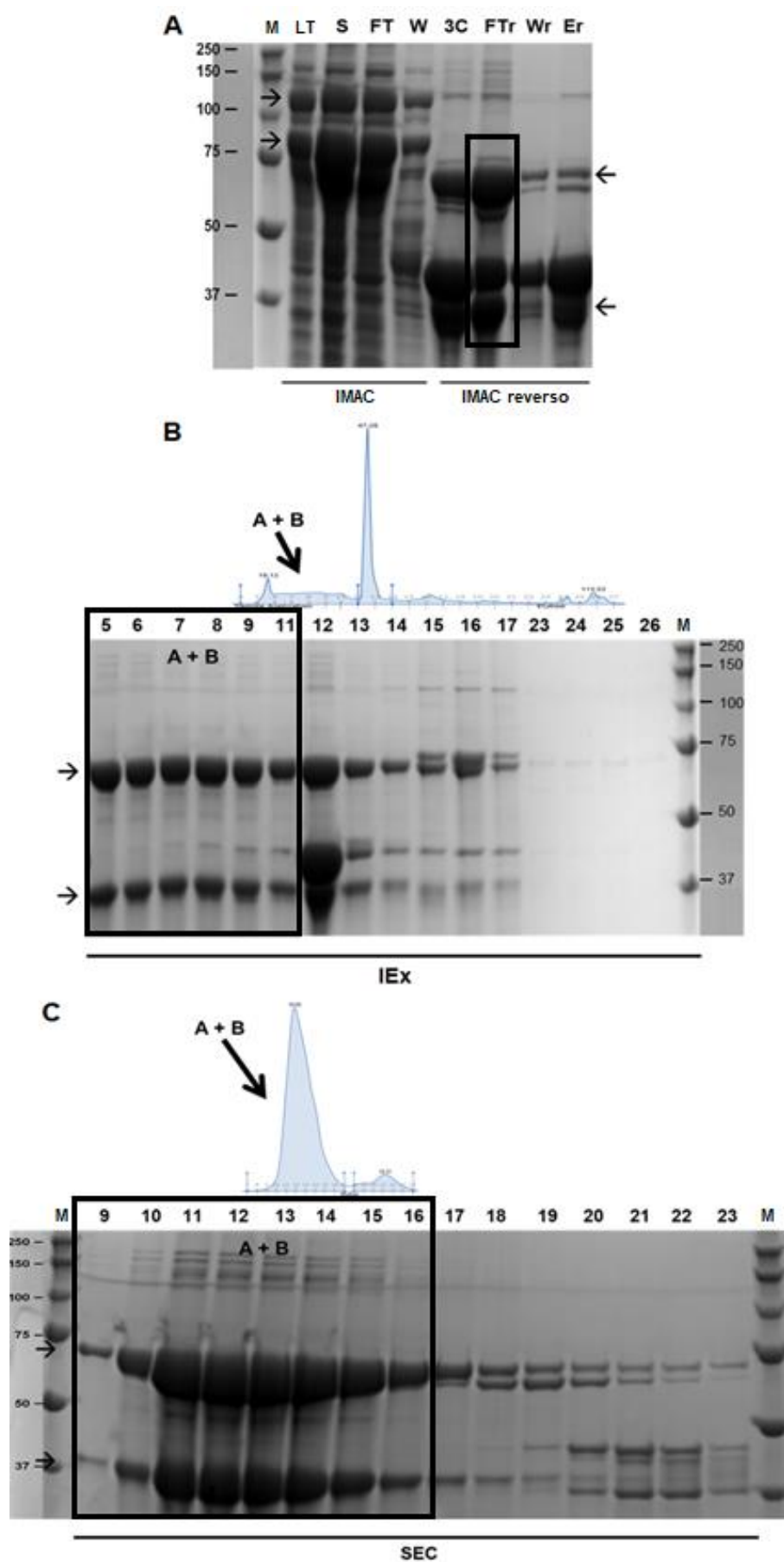
Fonte: autoria própria.

A Figura 37B mostra que o cromatograma da SEC gerado a partir da purificação da HsDHPS também produziu picos assimétricos e o rendimento proveniente de 4 L de cultura foi de 15,5 mg de HsDHPS purificada ou 3,9 mg de proteína por L de cultura.

4.18. Etapa extra de purificação por cromatografia de troca iônica para as isoformas da LdDHPS clonadas no vetor pAVA-MBP

Na tentativa de aumentar a pureza da LdDHPS, uma cromatografia de troca iônica foi realizada após a etapa de IMAC reverso, com o intuito de remover as proteínas contaminantes. Para isso, foi realizado o aumento da escala da produção das construções LdDHPSA-cb002 e LdDHPSB-cb002 (ambas isoformas da LdDHPS clonada no vetor pAVA-MBP) utilizando a linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli* cultivada em 4 L de meio de autoindução ZYP-5052, no biorreator LEX. Após a produção dessas proteínas, foi realizada a lise combinada da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 na presença de L-arginina e L-ácido glutâmico 50 mM, sendo que a IMAC foi utilizada como a primeira etapa de purificação das LdDHPSs. A análise por SDS-PAGE das frações geradas pela IMAC confirmou que este processo de purificação enriqueceu com sucesso as LdDHPSs a partir dos lisados celulares clarificados (Figura 38A).

Figura 38. Etapa extra de purificação por cromatografia de troca iônica com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (próxima página). O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa, cromatografia de troca iônica (IEx) e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações gerados pela IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com tampão contendo imidazol 30mM (W), eluição com tampão contendo imidazol 300mM (E). Análise por SDS-PAGE da fração eluída após o tratamento com a protease HRV-3C (3C). A fração 3C foi purificada por uma segunda etapa de IMAC e gerou as seguintes frações: *flow-through* (FTr), lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (Wr) e eluição com tampão contendo imidazol 300 mM (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após IEx. **(C)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanhos aproximados das LdDHPSs em kDa, com *tag* = LdDHPSA-cb002: 109,2 e LdDHPSB-cb002: 85,7; sem *tag* = LdDHPSA-cb002: 64,6 e LdDHPSB-cb002: 41,1. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein All Blue Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas das LdDHPSs. As frações destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para a concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

As LdDHPSSs recombinantes obtidas com a primeira etapa de purificação por IMAC foram tratadas *overnight* com a protease HRV-3C em uma razão molar de 15:1 das LdDHPSSs em relação à HRV-3C. Este tratamento removeu eficientemente os *tags* His₆/MBP da região N-terminal das LdDHPSSs (fração 3C na Figura 38A), pois uma diminuição visível no tamanho das LdDHPSSs de cerca de 44 kDa pode ser observada no gel (fração 3C na Figura 38A).

Para remover as proteínas que se ligaram de forma inespecífica durante a primeira etapa de IMAC, as amostras tratadas com HRV-3C foram submetidas a uma segunda etapa de IMAC. Nesta etapa, a maioria das LdDHPSSs foi encontrada na fração *flow-through* (FTr na Figura 38A), enquanto a maioria dos contaminantes, incluindo as LdDHPSSs contendo os *tags* His₆/MBP, o MPB livre e a protease 3C foram encontrados na fração de lavagem com tampão contendo imidazol 30 mM (Wr na Figura 38A) e na fração eluída da resina com tampão contendo imidazol 300 mM (Er na Figura 38A). A fração FTr da IMAC reversa contendo a proteína de interesse foi submetida à cromatografia de troca aniônica (Figura 38B).

A cromatografia de troca iônica contribuiu com o aumento na pureza das LdDHPSSs (Figura 38B) e, após essa etapa, a fração contendo as LdDHPSSs foi ainda purificada por SEC (Figura 38C). O cromatograma da SEC gerado a partir da purificação das LdDHPSSs gerou um pico mais simétrico. O rendimento final a partir de 8 L de cultura (4 L para cada construção) foi de 10 mg de LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificada, o que corresponde a 1,25 mg de proteína purificada por L de cultura.

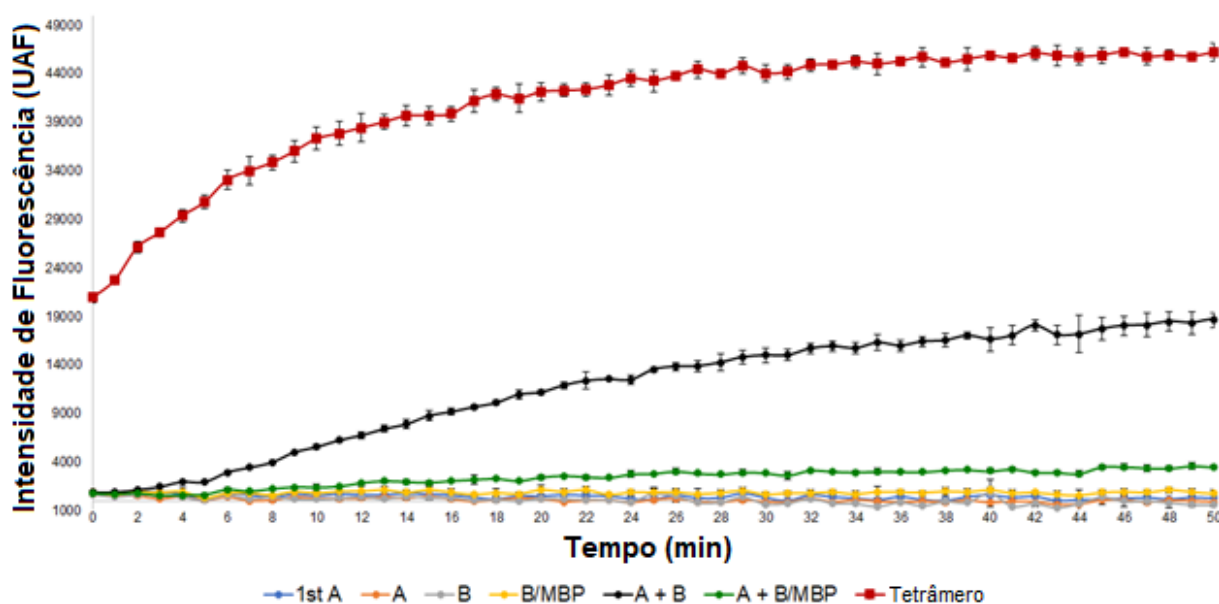
Este lote mais puro da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 foi reservado para determinar o IC₅₀ dos compostos *hit* obtidos no *high-throughput drug screening* (descrito no tópico 4.21.2 a seguir).

4.19. Ensaio de atividade enzimática *in vitro* com as isoformas da LdDHPS

Para avaliar se as LdDHPSSs purificadas apresentavam atividade, as diferentes amostras geradas com a purificação individual da LdDHPSA-cb002 (picos 1st A e A; Figura 33B) e da LdDHPSB-cb002 (picos B e B/MBP; Figura 34B), assim como a amostra gerada pela purificação concomitante da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 por IMAC e SEC (a partir de agora denominada “tetrâmero”; Figura 35B), foram testadas *in vitro*.

A atividade das LdDHPSs foi mensurada indiretamente, mediante a detecção do sinal de fluorescência do NADH gerado pela desidrogenação da espermidina na reação catalisada pela LdDHPS (SILVA et al., 2020; WOLFF; WOLFF; PARK, 2000). A Figura 39 a seguir mostra o resultado obtido com este experimento.

Figura 39. Ensaio de atividade enzimática *in vitro* com as diferentes amostras obtidas com a purificação das duas isoformas da LdDHPS. O monitoramento da atividade enzimática das LdDHPSs foi realizado indiretamente pela detecção do sinal de fluorescência do NADH gerado pela desidrogenação da espermidina catalisada pela DHPS (Figura 15). 1 μ M de cada isoforma purificada foi utilizado no ensaio quando analisada separadamente ou 0,5 μ M de cada isoforma quando combinadas na placa do ensaio. As amostras 1st A e A foram originadas da purificação individual da LdDHPSA-cb002. As amostras B e B/MBP foram originadas da purificação individual da LdDHPSB-cb002. A amostra tetrâmero foi gerada pela purificação concomitante das construções LdDHPSA-cb002 e LdDHPSB-cb002. A condição A + B foi obtida pela mistura das amostras A e B na placa do ensaio. A condição A + B/MBP foi obtida pela mistura das amostras A e B/MBP na placa do ensaio. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de triplicatas experimentais.



Fonte: autoria própria.

Conforme observado na Figura 39, as duas isoformas da LdDHPS não apresentam atividade quando testadas separadamente, o que contrasta com um trabalho anterior que afirmava que a LdDHPSA era levemente ativa por si só e que a LdDHPSB era inativa (CHAWLA et al., 2010). O fato de que essas enzimas só apresentarem atividade quando combinadas reforça a hipótese de que as duas isoformas da LdDHPS se associam para formar um heterocomplexo, como já foi demonstrado para a DHPS de *T. brucei* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018).

Além disso, um trabalho anterior publicado por nosso grupo de pesquisa mostrou, através de um ensaio de complementação funcional em levedura, que a DHPS de *L. major* só foi capaz de complementar a função da DHPS de *S. cerevisiae* quando as duas isoformas desta enzima foram produzidas em conjunto nesse organismo (SILVA et al., 2020), reforçando ainda mais essa hipótese.

A amostra tetrâmero, que corresponde às construções LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas concomitantemente por IMAC e SEC, foi mais ativa do que a condição formada por essas construções purificadas separadamente e misturadas no momento da realização do experimento (condição A + B da Figura 39). Isso pode ter acontecido pois a purificação combinada da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 produziu proteínas mais puras e em uma proporção estequiométrica mais adequada para a formação do complexo. Assim, a amostra “tetrâmero” foi selecionada para compor o ensaio *in vitro* com as LdDHPSs.

4.20. Estabelecimento de um ensaio bioquímico simples e aplicável para o rastreamento em larga escala de inibidores para a LdDHPSA+LdDHPSB, LmDHPSA+LmDHPSB e HsDHPS

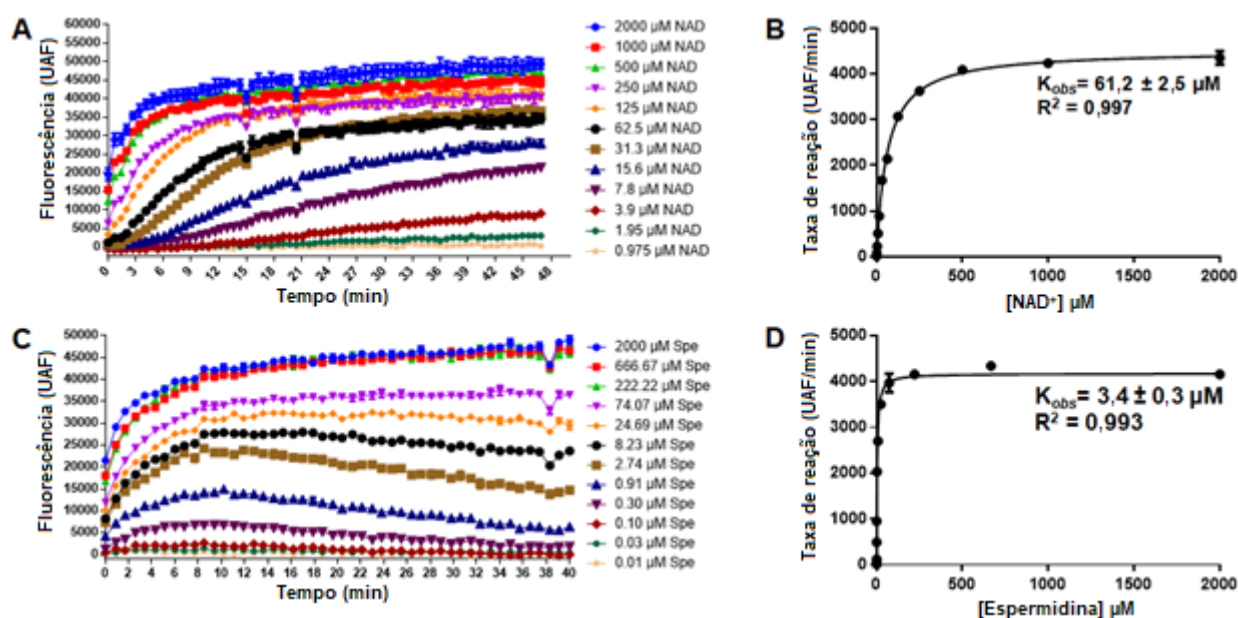
Assim como descrito nos tópicos 4.4 e 4.19, a reação parcial da DHPS (Figura 15) foi empregada para a realização deste experimento. Para garantir que este ensaio fosse robusto e sensível, a fluorescência produzida pelo NADH foi monitorada em concentrações crescentes da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (amostra “tetrâmero”), LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e HsDHPS purificadas, na presença de excesso de cofator NAD^+ e substrato espermidina (1 mM de cada). As curvas de progresso da reação resultantes foram utilizadas para determinar a concentração de enzima que produziu uma relação sinal/ruído robusta na faixa linear da reação (dados não mostrados). Com base nesses resultados, foi optado por trabalhar com uma concentração de 1 μM das enzimas tetraméricas.

Para determinar a concentração adequada de NAD^+ para o ensaio, foram analisadas as curvas de progresso da reação na presença de concentrações crescentes desse cofator (0,975 μM a 2000 para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002; 0,01 μM a 2000 para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; 0,04 μM a 2000 para a HsDHPS) e uma concentração fixa e em excesso do substrato espermidina (1 mM) (Painel A nas Figuras 40-42). Essas curvas foram utilizadas para calcular a taxa

linear de formação de NADH em várias concentrações de NAD^+ (V_{NAD^+}). Um gráfico com valores de V_{NAD^+} versus as concentrações de NAD^+ foi utilizado para estabelecer a relação hiperbólica da reação parcial das DHPs com a concentração do cofator ($K_{\text{obs,NAD}^+}$: $61,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002; $40,8 \pm 2,3 \mu\text{M}$ para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; $15,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$ para a HsDHPS; Painel B nas Figuras 40-42). A partir desses dados, foi optado por utilizar o NAD^+ em uma concentração fixa ($1,5 \times K_{\text{obs,NAD}^+}$) de $91,8$, $58,1$ e $23 \mu\text{M}$ para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002, LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e HsDHPS, respectivamente.

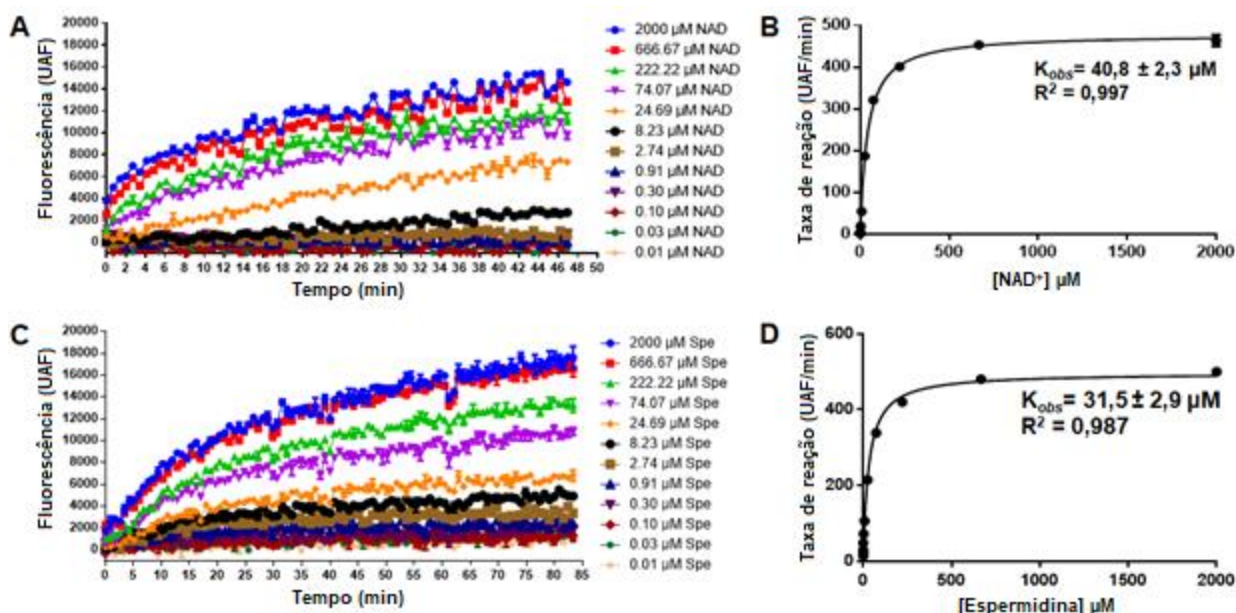
Foram realizados experimentos equivalentes para estabelecer as concentrações apropriadas do substrato espermidina para o ensaio. Nesses experimentos, a concentração do NAD^+ foi mantida fixa (1 mM para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 e a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; $45 \mu\text{M}$ para a HsDHPS) e a taxa linear de formação do NADH foi calculada na presença de concentrações crescentes da espermidina ($0,01$ a $2000 \mu\text{M}$ para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002; $0,01$ a $2000 \mu\text{M}$ para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e $0,006$ a $1000 \mu\text{M}$ para a HsDHPS) (V_{spe}). Um gráfico com os valores de V_{spe} versus as concentrações de espermidina foi empregado para estabelecer a relação hiperbólica da reação parcial com a concentração do substrato ($K_{\text{obs,spe}}$: $3,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002; $31,5 \pm 2,9 \mu\text{M}$ para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; $1,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para a HsDHPS; Painel D nas Figuras 40-42). A partir desses dados, foi optado por utilizar a espermidina em uma concentração fixa ($1,5 \times K_{\text{obs,spe}}$) de $5,1 \mu\text{M}$, $47,2 \mu\text{M}$ e $2 \mu\text{M}$ para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002, a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS, respectivamente.

Figura 40. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH empregando a reação parcial da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002. **(A)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 durante a titulação de NAD⁺. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm medida a cada 50 s durante 47 min. **(B)** Titulação do NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (0,975 a 2000 µM) e concentrações fixas da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (1 µM do tetrâmero) e da espermidina (1 mM) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD⁺ é mostrado na figura. **(C)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 durante a titulação da espermidina. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm medida a cada 50 s por 40 min. **(D)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,01 a 2000 µM) e concentrações fixas da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (1 µM do tetrâmero) e de NAD⁺ (1 mM) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



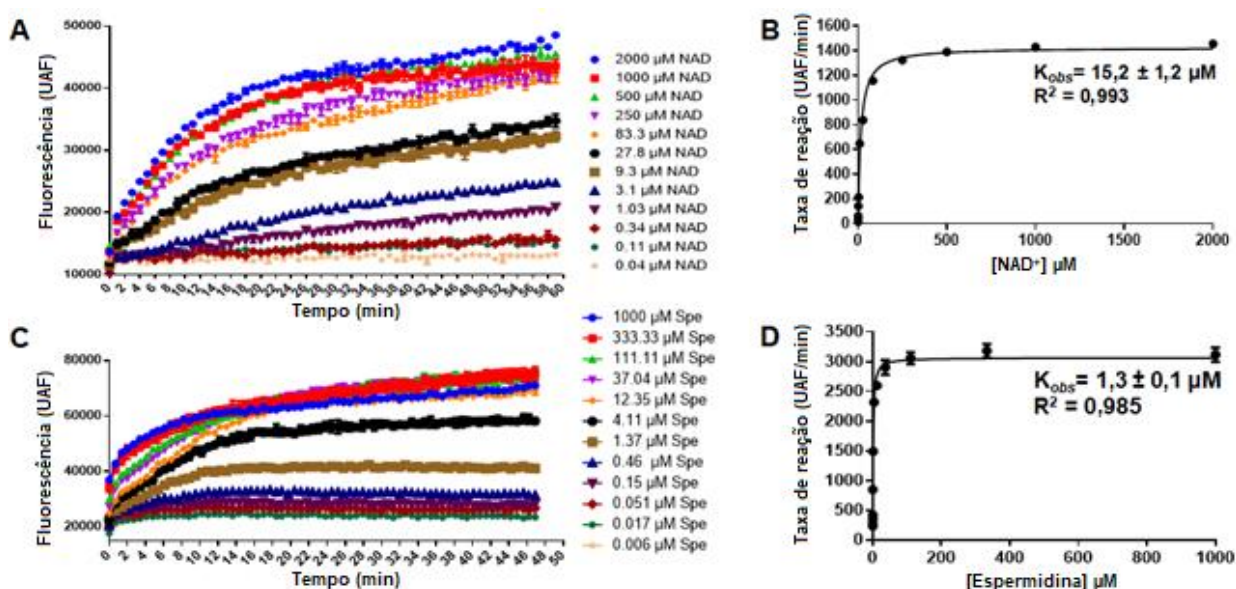
Fonte: autoria própria.

Figura 41. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH empregando a reação parcial da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010. **(A)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação de NAD⁺. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm medida a cada 50 s durante 47 min. **(B)** Titulação do NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (0,01 a 2000 µM) e concentrações fixas da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (1 µM do tetrâmero) e da espermidina (1 mM) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD⁺ é mostrado na figura. **(C)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação da espermidina. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm medida a cada 50 s por 85 min. **(D)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,01 a 2000 µM) e concentrações fixas da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (1 µM do tetrâmero) e do NAD⁺ (1 mM) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Fonte: autoria própria.

Figura 42. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH empregando a reação parcial da HsDHPS. (A) Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela HsDHPS durante a titulação do NAD⁺. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm medida a cada 50 s durante 60 min. **(B)** Titulação de NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (0,04 a 2000 µM) e concentrações fixas da HsDHPS (1 µM do tetrâmero) e da espermidina (1 mM) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD⁺ é mostrado na figura. **(C)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela HsDHPS durante a titulação da espermidina. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 340 nm medida a cada 50 s por 47 min. **(D)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,006 a 1000 µM) e concentrações fixas da HsDHPS (1 µM do tetrâmero) e NAD⁺ (45 µM) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Fonte: autoria própria.

É importante ressaltar que esse ensaio enzimático é apenas capaz de identificar inibidores da reação parcial dessas DHPSs (Figura 15).

4.21. High-throughput screening (HTS) *in vitro* de inibidores com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002

4.21.1. Ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH

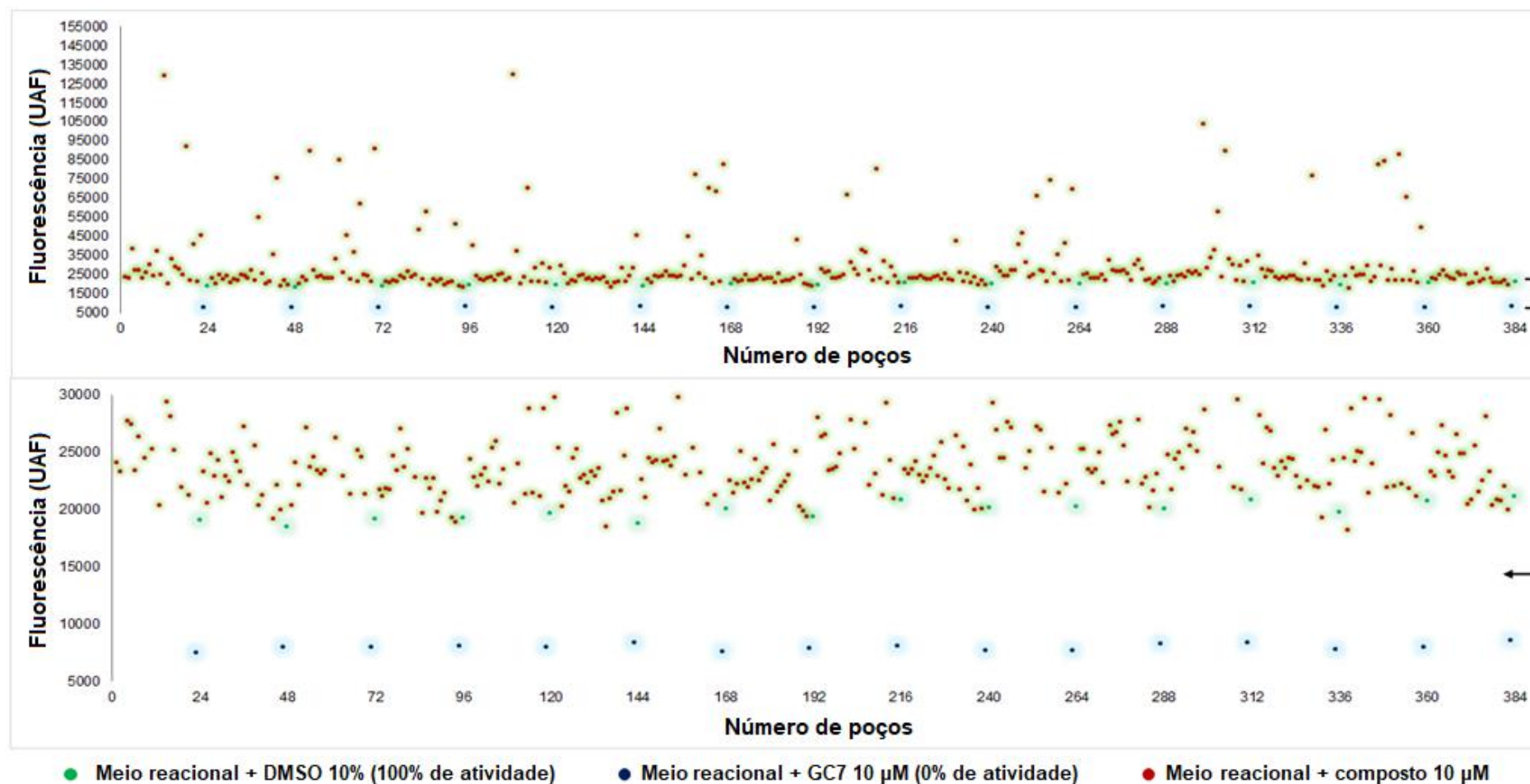
O primeiro lote da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 purificadas concomitantemente por IMAC e SEC (amostra “tetrâmero”) foi escolhido para realizar o ensaio HTS *in vitro* para a busca de inibidores para as *Leishmania sp.* DHPSS, pois este forneceu um rendimento proteico maior em comparação com as construções da *L. major*.

Assim, sob as condições de ensaio otimizadas previamente (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 1 μ M [tetrâmero], NAD⁺ 91,8 μ M e espermidina 5,1 μ M), foi implementado um ensaio HTS contra 10 μ M de cada composto da coleção de moléculas pequenas MMV12K BF3 (Figura 43).

O desempenho geral do ensaio foi robusto, com valores de Z-score (calculados com base em 16 poços controle por placa representando "100% de atividade" e 16 representando "0% de atividade"; vide a Figura 43) para cada placa testada acima de 0,6, indicando uma separação adequada entre os sinais de fluorescência obtidos para os controles representando "100% de atividade" e "0% de atividade".

Vale destacar que o Z-score corresponde a um parâmetro estatístico comumente utilizado para avaliar ensaios HTS, sendo que um ensaio considerado como excelente apresenta um Z-score entre 0,5 e 1 (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999).

Figura 43. High-throughput screening in vitro primário empregando o ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002. Exemplo de uma placa de compostos da coleção de moléculas pequenas MMV12K BF3, que foram testados a uma concentração de 10 μ M, empregando o ensaio de fluorescência otimizado. Dezesesseis poços controle representando “100% de atividade” (em verde) e 16 poços controle representando “0% de atividade” (em azul) foram empregados para calcular a % de inibição proporcionada para cada composto.



Fonte: autoria própria.

Embora os Z-score calculados para os experimentos tenham sido considerados como excelentes, os valores do sinal de fluorescência para a maioria dos poços contendo os compostos testados foi superior à média do sinal de fluorescência dos poços designados como “100% de atividade” para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (meio reacional + DMSO 10%) (Figura 43).

É importante destacar que fluorescência intrínseca do NADH tem sido empregada como sinal de detecção em ensaios HTS (NAPPER; SIVENDRAN, 2011). No entanto, muitas das moléculas pequenas encontradas em coleções utilizadas para triagem de compostos são fluorescentes, levando a possíveis resultados falsos por interferência (PARK et al., 2017; SIMEONOV; DAVIS, 2004), fato este que provavelmente aconteceu neste ensaio.

Na tentativa de anular o efeito da autofluorescência dos compostos, foi realizada uma leitura das placas previamente ao início da reação para avaliar a fluorescência intrínseca de cada composto testado, sendo esse valor inicial posteriormente subtraído dos valores finais da leitura de fluorescência, o que não surtiu nenhum efeito positivo. Cabe aqui destacar que, só porque um composto é fluorescente, não significa que o mesmo não possa ter atividade biológica relevante. Significa apenas que é necessário lançar mão de um método ortogonal que não esteja sujeito à interferência da fluorescência intrínseca desse composto para avaliar a sua atividade (SIMEONOV; DAVIS, 2004).

Como descrito anteriormente neste trabalho, um método ortogonal ao ensaio baseado na fluorescência do NADH já foi descrito para a HsDHPS e utiliza a reação parcial das DHPSS (ver Figura 15) acoplada à reação $\text{NAD}^+/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ (PARK et al., 2017). A vantagem na utilização desse ensaio acoplado ao invés do ensaio baseado em fluorescência, é que geralmente é observada pouca interferência no sinal de luminescência causada pelos compostos (PARK et al., 2017).

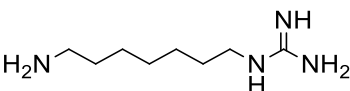
4.21.2. Ensaio enzimático baseado em luminescência utilizando a reação acoplada $\text{NAD}^+/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$

Para garantir que a reação parcial das DHPSS acoplada com a reação $\text{NAD}^+/\text{NADH-Glo}^{\text{TM}}$ seria capaz de estimar os valores de IC_{50} para inibidores dessas enzimas nas mesmas condições padronizadas pelo ensaio baseado na fluorescência do NADH, o GC7, um potente inibidor das DHPSS de mamíferos (LEE; PARK; FOLK,

1995; PARK et al., 1994), foi testado para concentração-resposta (0,006 a 100 μM) contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (tetrâmero) e a HsDHPS, empregando esse ensaio acoplado. Para isso, a reação foi montada de forma semelhante ao descrito anteriormente para a HsDHPS (LIU et al., 2021a; PARK et al., 2017), utilizando praticamente o mesmo meio reacional (glicina/NaOH 0,1 M, pH 8,8; glicerol 5%; Tween 20 0,025%; DTT 1 mM; $1,5 \times K_{\text{obs}}$ do NAD^+ e $1,5 \times K_{\text{obs}}$ da espermidina; ver Tabela 7) do ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH, apenas modificando a concentração das DHPSs, que passou de 1 μM para 65 nM. A redução na concentração das DHPSs era esperada, uma vez que o sinal do NADH gerado pelas DHPSs é amplificado pela luminescência gerada pela luciferase, tornando o ensaio mais sensível (PARK et al., 2017).

As curvas de concentração-resposta resultantes foram utilizadas para estimar os valores de IC_{50} para o GC7 contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (tetrâmero) e a HsDHPS (Tabela 13). Este ensaio foi repetido empregando um GC7 de um lote diferente. Além disso, o lote mais puro da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002, purificada com uma etapa extra de IEx (Figura 38C), foi utilizado nessa segunda rodada de concentração-resposta.

Tabela 13. Valores de IC_{50} para o GC7 contra a LdDHPS e a HsDHPS.

Composto	Estrutura	Primeira rodada de concentração-resposta		Segunda rodada de concentração-resposta	
		IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
		LdDHPS ^a	HsDHPS	LdDHPS ^b	HsDHPS
GC7		1,80 (1,59 a 2,0)	0,79 (0,68 a 0,90)	1,79 (1,55 a 2,08)	0,76 (0,63 a 0,92)

^a: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas em conjunto por IMAC e SEC (primeiro lote de purificação); ^b: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas em conjunto por IMAC, IEx e SEC (segundo lote de purificação mais puro). Os valores de IC_{50} e os intervalos de confiança de 95% foram calculados por meio da análise de regressão não linear dos percentuais de inibição usando o GraphPad.

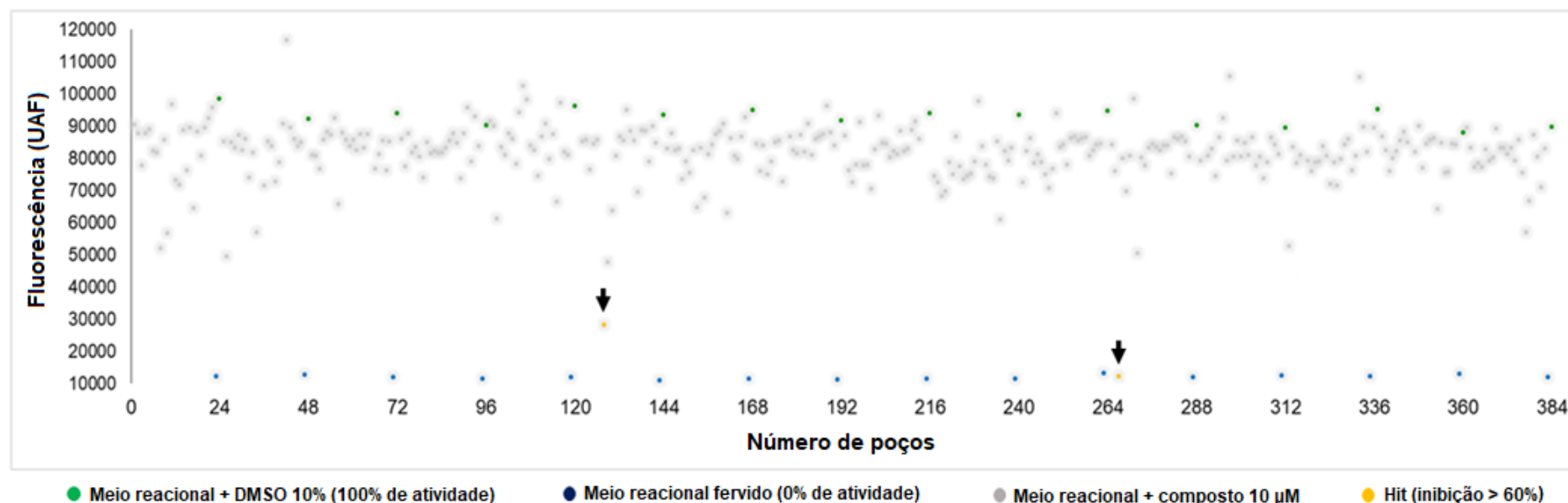
Fonte: autoria própria.

O valor médio do IC_{50} para o GC7, obtido a partir de dois experimentos independentes, foi de $1,795 \pm 0,003 \mu M$ contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (amostra tetrâmero) e de $0,775 \pm 0,018 \mu M$ contra a HsDHPS. Vale destacar que este valor de IC_{50} para a HsDHPS está em concordância com o valor de IC_{50} descrito anteriormente na literatura para esta enzima utilizando este mesmo ensaio ($1,72 \pm 0,56 \mu M$) (LIU et al., 2021a). Portanto, esse ensaio enzimático acoplado foi robusto e sensível na faixa de concentração testada para o GC7, utilizando uma pequena quantidade de enzima, o que significa que este ensaio é capaz de detectar inibidores para essas DHPSs.

Portanto um ensaio HTS foi implementado com a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (amostra tetrâmero) nas condições de ensaio otimizadas anteriormente (descritas no tópico 4.20), contra $10 \mu M$ de cada um dos compostos das coleções de moléculas pequenas MMV12K BF3 e MMV14K HGL (Figura 44).

Mais uma vez, o desempenho geral do ensaio foi robusto, com valores de Z-score (calculados com base em 16 poços controle por placa representando "100% de atividade" e 16 representando "0% de atividade"; vide a Figura 44) para cada placa testada acima de 0,7, indicando uma separação adequada entre os sinais de luminescência obtidos para os controles representando "100% de atividade" e "0% de atividade" (CRAIG et al., 2016; ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999).

Figura 44. High-throughput screening *in vitro* primário empregando a reação parcial da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 acoplada com o ensaio NAD⁺/NADH-Glo™. Exemplo de uma placa de compostos da coleção de moléculas pequenas MMV14K HGL, que foram testados a uma concentração de 10 μ M, utilizando a reação parcial da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 otimizada acoplada ao ensaio NAD⁺/NADH-Glo™. Dezesesseis poços controle representando “100% de atividade” (em verde) e 16 poços controle representando “0% de atividade” (em azul) foram empregados para calcular a % de inibição proporcionada para cada composto. As setas pretas indicam os compostos *hit* que inibiram a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 em mais de 60%.



Fonte: autoria própria.

Dos 26771 compostos rastreados inicialmente, 44 compostos (*hits*) inibiram a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 em mais de 60%, representando uma taxa de acerto de 0,16%. Essa taxa foi compatível com trabalhos anteriores conduzidos pelo grupo do Dr. Van Voorhis (CHOI et al., 2021; CRAIG et al., 2016). Vale destacar que esse ponto de corte de 60% de inibição foi escolhido para aumentar as chances de selecionar inibidores com IC₅₀ abaixo de 10 µM (CHOI et al., 2021).

Esses compostos *hit* foram testados novamente e 24 (57%) deles exibiram efeitos inibitórios consistentes (inibição maior do que 60%) sobre a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002. Essa taxa de confirmação dos *hits* também foi compatível com um trabalho anterior conduzido pelo grupo do Dr. Van Voorhis (CHOI et al., 2021). Acredita-se que nem todos os *hits* obtidos no *screening* primário foram confirmados no *screening* secundário devido a algum possível erro de diluição dos compostos nas coleções para uso nos *screenings* iniciais ou, ainda, devido aos múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento das placas de estoque de compostos, que podem ter levado à degradação dos compostos.

Além disso, para identificar resultados de inibição falso-positivos, gerados pela inibição das enzimas componentes do ensaio NAD⁺/NADH-Glo™ e não pela inibição da atividade da LdDHPS, foi realizado um contra ensaio com todos os 24 *hits* confirmados, utilizando uma reação preparada com NADH 1 µM diluído no meio reacional sem a adição da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002. A partir desse teste, 11 compostos que inibiram o sinal de luminescência em mais de 15% em relação ao controle representando 100% de atividade (NADH 1 µM diluído no tampão de ensaio sem a adição da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 e suplementado com DMSO 10%) foram considerados como falso-positivos ou insuficientemente seletivos para estudos posteriores (CRAIG et al., 2016).

É importante mencionar que um artefato comum em ensaios HTS para a busca de inibidores são os compostos PAINS (*pan-assay interference compounds*). Como exemplo, um estudo prévio realizado pelo grupo do Dr. Van Voorhis constatou que cerca de 80% dos *hits* iniciais eram PAINS (CHOI et al., 2021). Estes compostos PAINS podem participar de reações redox na presença de reagentes redutores, tais como DTT, e gerar espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, que é responsável pela desestabilização de proteínas e consequente redução da atividade (CHOI et al., 2021).

Como uma forma de validação adicional, os 13 compostos que causaram inibição sobre a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 e pouca ou nenhuma inibição sobre as enzimas do ensaio NAD⁺/NADH-Glo™ foram analisados quanto à concentração-resposta (0,2 a 100 µM) empregando a reação parcial da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 acoplada ao ensaio NAD⁺/NADH-Glo™ (Tabelas 14 e 15).

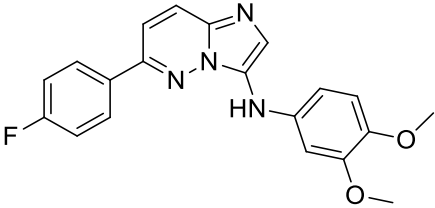
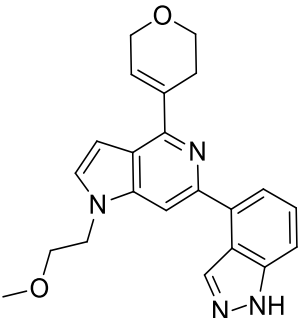
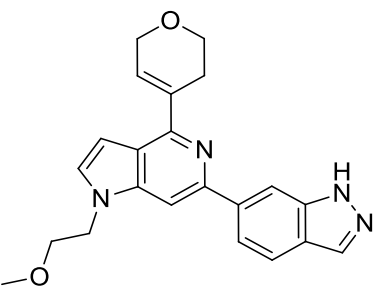
Considerando que a coleção MMV14K HGL apresentava uma quantidade suficiente dos compostos, os sete *hits* provenientes desta coleção (Tabela 15) também foram analisados quanto à concentração-resposta (0,2 a 100 µM) contra a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e da HsDHPS (Tabelas 15).

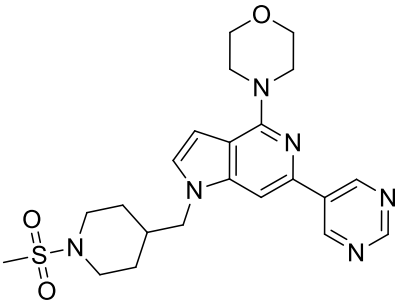
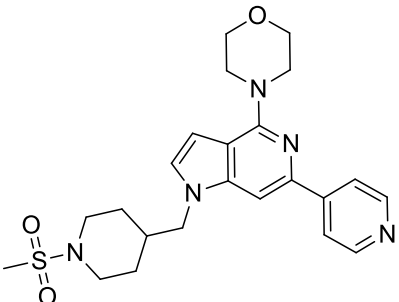
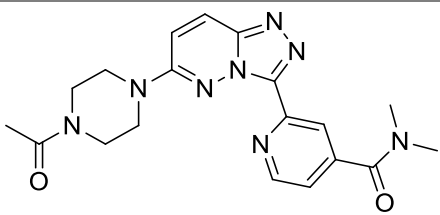
Além disso, os compostos *hit* foram adquiridos a partir de uma fonte distinta do estoque inicial (novos estoques de DMSO para os *hits* da coleção MMV12K BF3 ou uma nova solução preparada a partir do pó para os *hits* da coleção MMV14K HGL) e testados novamente quanto à concentração-resposta empregando a reação parcial das DHPSs acoplada ao ensaio NAD⁺/NADH-Glo™.

Durante essa segunda rodada de testes de concentração-resposta, foi utilizado o lote mais puro da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 e também foi testada a inibição contra a atividade da HsDHPS (Tabelas 14 e 15), com o intuito de verificar a seletividade da inibição desses compostos sobre a atividade da LdDHPS. Ainda, no caso da coleção MMV14K HGL, com exceção do composto MMV1674024, as concentrações testadas para os compostos foram aumentadas para o intervalo de 1,95 a 1000 µM.

Considerando que a coleção MMV14K HGL apresentava uma quantidade suficiente de material, os sete *hits* provenientes desta coleção também foram analisados quanto à concentração-resposta contra a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (Tabela 15).

Tabela 14. Estruturas dos hits da coleção MMV12K BF3 confirmados e seus valores de IC₅₀.

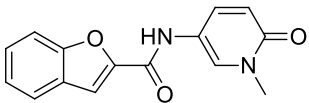
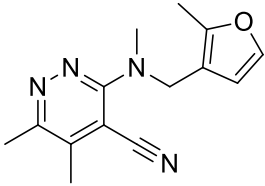
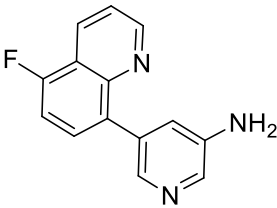
Composto	Estrutura	Coleção de moléculas pequenas	Primeira rodada de concentração-resposta	Segunda rodada de concentração-resposta		
			IC ₅₀ LdDHPS ^a (μ M)	IC ₅₀ LdDHPS ^b (μ M)	IC ₅₀ HsDHPS (μ M)	Fonte
MMV904628		MMV12K BF3	15,1 (13,8 a 16,6)	41,1 (36,0 a 46,8)	n.i. ^c	Novo estoque de DMSO da MMV
MMV904563		MMV12K BF3	12,3 (10,1 a 15,0)	4,3 (3,7 a 5,0)	n.i. ^c	Novo estoque de DMSO da MMV
MMV904400		MMV12K BF3	7,2 (5,7 a 9,0)	7,3 (6,2 a 8,6)	n.i. ^c	Novo estoque de DMSO da MMV

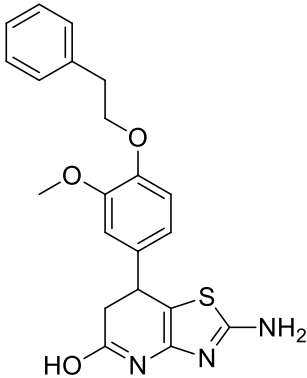
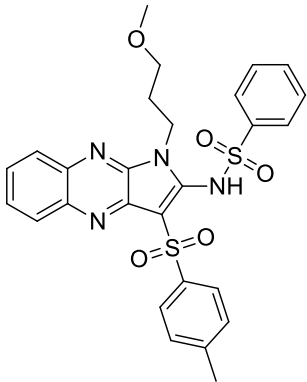
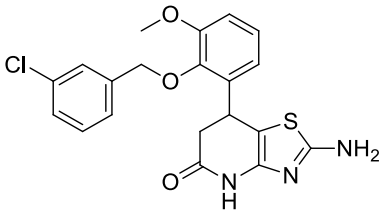
MMV903248		MMV12K BF3	8,9 (8,0 a 10,0)	5,1 (4,7 a 5,5)	n.i ^c	Novo estoque de DMSO da MMV
MMV902990		MMV12K BF3	5,6 (4,9 a 6,3)	3,1 (2,7 a 3,5)	n.i ^c	Novo estoque de DMSO da MMV
MMV902970		MMV12K BF3	3,8 (3,0 a 4,6)	7,9 (7,1 a 8,9)	n.i ^c	Novo estoque de DMSO da MMV

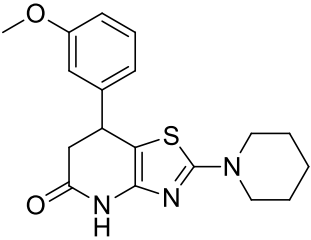
^a: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas em combinação por IMAC e SEC (primeiro lote de purificação); ^b: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas em combinação por IMAC, IEx e SEC (lote de purificação mais limpo); n.i^c: sem atividade inibitória. IC₅₀ representa a concentração que inibe a atividade da DHPS em 50%. Os valores de IC₅₀ e os intervalos de confiança de 95% foram calculados por meio da análise de regressão não linear dos percentuais de inibição usando o *GraphPad PRISM* versão 8.0.

Fonte: autoria própria.

Tabela 15. Estruturas dos *hits* da coleção MMV14K HGL confirmados e seus valores de IC₅₀.

Composto	Estrutura	Coleção de moléculas pequenas	Primeira rodada de concentração-resposta			Segunda rodada de concentração-resposta			
			IC ₅₀ LdDHPS ^a (μM)	IC ₅₀ LmDHPS ^b (μM)	IC ₅₀ HsDHPS (μM)	IC ₅₀ LdDHPS ^c (μM)	IC ₅₀ LmDHPS ^b (μM)	IC ₅₀ HsDHPS (μM)	Fonte
MMV1767969		MMV14K HGL	5,0 (4,2 a 5,8)	1,7 (1,5 a 1,9)	n.i ^d	>500	- ^e	- ^e	Nova solução a partir do pó
MMV1732934		MMV14K HGL	3,1 (2,5 a 3,8)	0,9 (0,8 a 1,0)	n.i ^d	68,9 (65,0 a 72,9)	33,6 (28,7 a 39,6)	n.i ^d	Nova solução a partir do pó
MMV1674024		MMV14K HGL	3,7 (3,1 a 4,5)	1,0 (0,9 a 1,1)	n.i ^d	10,4 (9,7 a 11,1)	5,2 (4,6 a 6,0)	n.i ^d	Nova solução a partir do pó

MMV1653983		MMV14K HGL	7,1 (6,3 a 7,9)	2,1 (1,8 a 2,5)	83,7 (67,7 a 103,3)	271,6 (245,2 a 300,8)	170,7 (142,2 a 205,0)	n.i ^d	Nova solução a partir do pó
MMV1652530		MMV14K HGL	1,1 (0,8 a 1,3)	0,6 (0,5 a 1,6)	58,8 (50,3 a 68,9)	312,6 (284,7 a 343,2)	126,3 (114,1 a 139,8)	1708 (1300 a 2245)	Nova solução a partir do pó
MMV1646485		MMV14K HGL	2,9 (2,5 a 3,5)	0,83 (0,7 a 0,9)	199,9 (125,5 a 318,5)	301,9 (260,0 a 350,5)	218,1 (193,4 a 245,8)	n.i ^d	Nova solução a partir do pó

MMV1646508		MMV14K HGL	6,9 (5,9 a 8,1)	2,3 (1,9 a 2,7)	n.i ^d	- ^e	- ^e	- ^e	Não disponível
------------	---	---------------	--------------------	--------------------	------------------	----------------	----------------	----------------	----------------

^a: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas em combinação por IMAC e SEC (primeiro lote de purificação); ^b: LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 purificadas em combinação por IMAC e SEC; ^c: LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 purificadas em combinação por IMAC, IEx e SEC (lote de purificação mais limpo); n.i^c: sem atividade inibitória; -^e: não testado por falta de material ou por não ser promissor. IC₅₀ representa a concentração que inibe a atividade da DHPS em 50%. Os valores de IC₅₀ e os intervalos de confiança de 95% foram calculados por meio da análise de regressão não linear dos percentuais de inibição usando o *GraphPad PRISM* versão 8.0.

Fonte: autoria própria.

Os 13 *hits* testados durante a primeira rodada de ensaios de concentração-resposta inibiram a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (primeiro lote de purificação) com IC₅₀ variando entre 1,1 e 15,1 µM, representando uma inibição na faixa micromolar baixa (Tabelas 14 e 15).

Além disso, devido à disponibilidade de material, para os sete *hits* da coleção MMV14K HGL, o ensaio de concentração-resposta também foi realizado com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS durante a primeira rodada de testes (Tabela 15). Todos os sete compostos também inibiram a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e quatro deles não inibiram a HsDHPS nas concentrações testadas (MMV1646508, MMV1767969, MMV1674024 e MMV1732934), correspondendo assim a uma inibição seletiva para as DHPSs de *Leishmania sp.* Mesmo os três compostos que inibiram a atividade da enzima humana em certo nível apresentaram uma inibição pelo menos 12 vezes mais potente sobre a atividade das DHPSs de *Leishmania sp.* em comparação com a inibição sobre a atividade da HsDHPS. Essa seletividade é extremamente importante durante o processo de descoberta de novos fármacos, pois a falta de seletividade para enzimas estruturalmente relacionadas pode levar a efeitos colaterais durante os ensaios clínicos (WU; CLAUSEN; NIELSEN, 2015).

Após a primeira rodada de ensaios de concentração-resposta, uma segunda rodada de testes foi realizada contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 mais pura (purificada com a etapa extra de IEx) e a HsDHPS, utilizando os compostos *hit* provenientes de outro lote. Como os compostos da coleção MMV12K BF3 não estão disponíveis comercialmente, a MMV forneceu um novo estoque de DMSO para esses compostos (Tabela 14). Já no caso da coleção MMV14K HGL, com exceção do composto MMV1646508, os *hits* estão disponíveis comercialmente e novas soluções foram feitas a partir dos novos pós adquiridos.

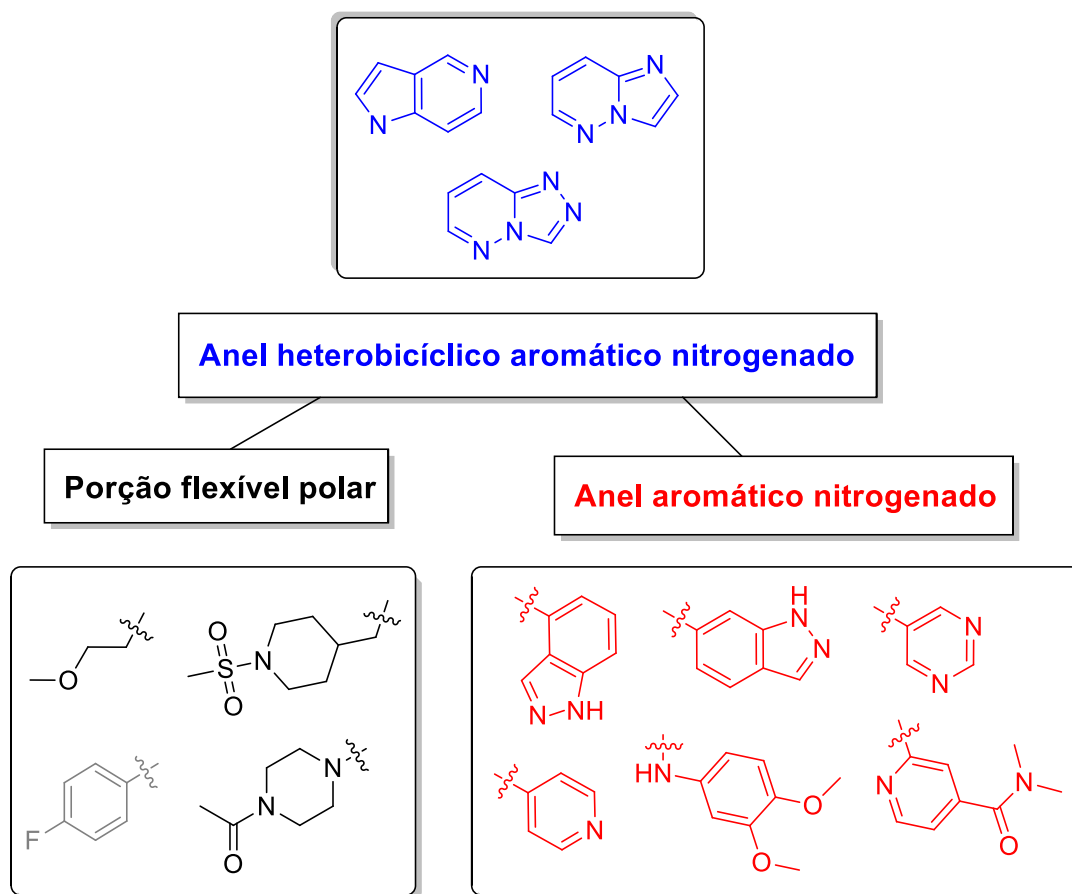
Conforme mostrado na Tabela 14, durante a segunda rodada de concentração-resposta, os seis *hits* da coleção MMV12K BF3 inibiram a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 com um IC₅₀ variando entre 3,1 e 41,0 µM, valores estes consistentes com os valores obtidos durante a primeira rodada de concentração-resposta (Tabela 14). Além disso, todos os seis *hits* não inibiram a HsDHPS nas concentrações testadas, o que corresponde a uma inibição seletiva contra a LdDHPS. Como a quantidade dos compostos

fornecidos pela MMV era pequena, não foi possível realizar o teste de concentração-resposta contra a LmDHPS.

Por outro lado, no caso dos *hits* provenientes da coleção MMV14K HGL, com exceção do composto MMV1674024, os valores de IC₅₀ obtidos na segunda rodada de ensaios de concentração-resposta não concordaram com os valores obtidos durante primeira rodada. Durante a segunda rodada de testes, os valores dos IC₅₀ contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 foram pelo menos 10 vezes maiores do que os obtidos no primeiro teste, variando entre 10,4 e 312,6 µM (Tabela 15). No entanto, excluindo o composto MMV1767969, todos os cinco *hits* restantes desta coleção apresentaram uma inibição concentração-dependente contra a atividade da LdDHPS e da LmDHPS. Além disso, quatro desses compostos (MMV1646485, MMV1653983, MMV1674024 e MMV1732934) não inibiram a atividade da HsDHPS nas concentrações testadas, apresentando-se como inibidores seletivos para a LdDHPS e a LmDHPS.

Dentre os *hits* provenientes da coleção de pequenas moléculas MMV12K BF3 estão os compostos MMV904563, MMV904400, MMV903248, MMV902990 e MMV902970. Estes compostos apresentaram IC₅₀ contra a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 muito parecidos, variando entre 3,1 e 7,9 µM, e também exibem uma grande semelhança estrutural (Tabela 14), compartilhando entre si um núcleo formado por um anel heterobícíclico aromático nitrogenado ligado a uma porção flexível polar e a um anel aromático nitrogenado (Figura 45). Ainda, o composto MMV904628, também proveniente da coleção MMV12K BF3, compartilha o núcleo formado por um anel heterobícíclico aromático nitrogenado ligado a um anel aromático nitrogenado (Figura 45). Entretanto, o mesmo não apresenta a porção polar flexível ligada ao núcleo heterobícíclico aromático nitrogenado, o que poderia explicar a sua menor potência de inibição comparada com os demais compostos dessa série (IC₅₀ de 41,1 µM; vide Tabela 14). No geral, as diferentes substituições observadas nesses grupos funcionais foram bem toleradas, visto que esses compostos apresentam valores similares de potência de inibição sobre a atividade da LdDHPSAB.

Figura 45. Grupos funcionais compartilhados pelos *hits* da coleção de pequenas moléculas MMV12K BF3. Estes compostos apresentam um núcleo formado por um anel heterobícíclico aromático nitrogenado ligado a uma porção flexível polar e a um anel aromático nitrogenado.



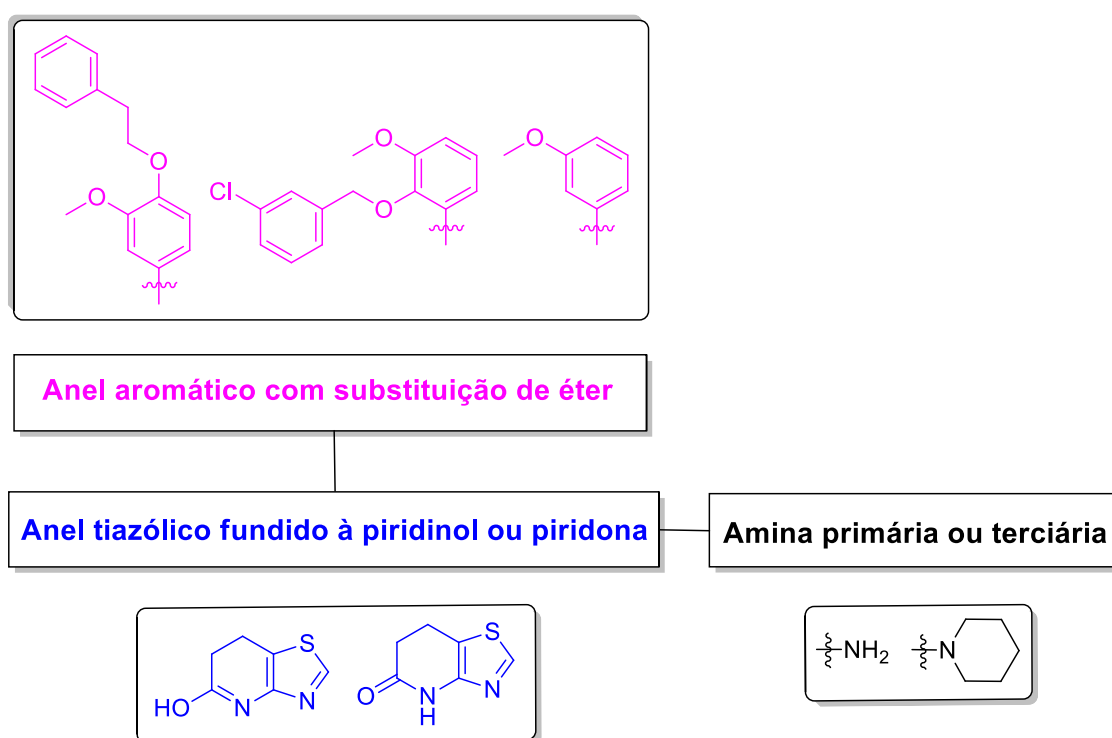
Fonte: autoria própria.

Ainda, o composto MMV1674024, proveniente da coleção de moléculas pequenas MMV14K HGL, também compartilha com essa série de compostos o núcleo formado por um anel heterobícíclico aromático nitrogenado ligado a um anel aromático nitrogenado (vide Tabela 15), fato este que reforça a importância desses grupos para a atividade desses compostos.

Também foi identificada uma segunda série de compostos, proveniente da coleção MMV14K HGL, formada pelos compostos MMV1653983, MMV1646485 e MMV1646508, que também são estruturalmente relacionados (Tabela 15). Estes compostos exibem um núcleo formado por um anel tiazólico fundido ao piridinol ou à piridona, ligado a um anel aromático com substituição de éter e a uma amina (primária ou terciária) (Figura 46). Entretanto, essa série foi menos potente quanto à inibição da atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002,

sendo que os compostos MMV1653983 e MMV1646485 apresentaram um IC_{50} na segunda rodada de testes de concentração-resposta de 271,6 e 301,9 μM , respectivamente. Já o composto MMV1646508 não foi testado durante a segunda rodada de testes de concentração-resposta pois este não estava disponível comercialmente.

Figura 46. Grupos funcionais compartilhados por alguns *hits* da coleção de pequenas moléculas MMV14K HGL. Estes compostos apresentam um núcleo formado por um anel tiazólico fundido ao piridinol ou à piridona, ligado a um anel aromático com substituição de éter e a uma amina primária ou terciária.



Fonte: autoria própria.

Os valores de IC_{50} obtidos para a maioria dos *hits* descritos neste trabalho são comparáveis aos valores de IC_{50} publicados anteriormente (57 e 66 μM) para compostos *hit* em um ensaio HTS realizado com a HsDHPS (TANAKA et al., 2020b). Tanaka e colaboradores projetaram e sintetizaram uma nova série química a partir dos compostos obtidos pelo ensaio HTS, descobrindo um novo composto (26d), com uma potente atividade inibitória *in vitro* contra a HsDHPS ($IC_{50} = 0,0092 \mu M$) (TANAKA et al., 2020b). Esses autores também descreveram a análise da estrutura da HsDHPS ligada ao composto 26d e demonstraram que esse composto apresenta um modo de ligação alostérico distinto do relatado

anteriormente para outro inibidor alostérico da HsDHPS (YT-11g) (TANAKA et al., 2020a). Esses achados foram significativamente úteis para a análise funcional de alterações conformacionais da HsDHPS e no desenvolvimento de um novo inibidor alostérico (8g) que inibiu efetivamente o desenvolvimento de melanoma ao mesmo tempo que apresentou baixa toxicidade (LIU et al., 2021a).

Assim, os inibidores seletivos da LdDHPS e da LmDHPS descritos no presente trabalho podem ser utilizados em trabalhos futuros como pontos de partida para o desenvolvimento de novos fármacos para o combate à leishmaniose.

Cabe aqui destacar que leishmaniose apresenta três principais formas, com sintomas distintos e diferentes graus de severidade (SONI; PRATAP, 2022). A leishmaniose cutânea corresponde ao tipo mais prevalente da leishmaniose, sendo que esta causa lesões na pele que podem gerar cicatrizes permanentes e deficiências graves (JAIN et al., 2022; SAHU; KHARE, 2021). Outra forma de leishmaniose é mucocutânea, que faz com que as membranas mucosas do nariz, boca e garganta sejam parcialmente ou completamente destruídas (JAIN et al., 2022; SONI; PRATAP, 2022). Já a leishmaniose visceral corresponde à forma mais letal, que afeta principalmente o fígado, baço e medula óssea (JAIN et al., 2022; SONI; PRATAP, 2022).

Apesar da leishmaniose ser uma condição terrível, as opções de tratamento ainda são restritas e insatisfatórias (JAIN et al., 2022; SOTO-VÁSQUEZ et al., 2023). A maioria dos tratamentos anti-*Leishmania* requer doses múltiplas por um período de tempo prolongado, contribuindo não só para a dificuldade no manejo clínico dessa doença, mas também para o desenvolvimento de resistência aos medicamentos disponíveis (ROATT et al., 2020; SONI; PRATAP, 2022). Consequentemente, há uma necessidade persistente de descobrir fármacos baratos, altamente potentes e com um bom perfil farmacocinético para o tratamento da leishmaniose (DE SOUSA et al., 2023; HANIF et al., 2023; JAIN et al., 2022; JAMSHAD; DIN; KHAN, 2021).

Vias como a biossíntese de esteróis, resgate de purinas, biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, biossíntese de folato e de hipusina desempenham um papel crucial na sobrevivência e proliferação de *Leishmania sp.*, tornando essas vias alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos para combater a leishmaniose (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; JAIN et al., 2022). Cabe aqui

destacar que mesmo que a via de biossíntese da hipusina tenha sido destacada como uma via interessante para o desenvolvimento de fármacos direcionados à *Leishmania sp.*, ainda não existem inibidores específicos para as *Leishmania sp.* DHPSS descritos na literatura.

4.22. Análise do potencial dos *hits* obtidos com o HTS para futuras otimizações

Um dos principais desafios durante o desenvolvimento de novos fármacos é avaliar com precisão o potencial dos *hits* obtidos durante um ensaio HTS (MORTENSON; MURRAY, 2011). A qualidade dos pontos de partida químicos é um fator-chave a ser considerado durante o planejamento de um fármaco, pois *hits* de baixa qualidade têm maior probabilidade de falhar durante as fases de otimização subsequentes (DE OLIVEIRA et al., 2021).

Tradicionalmente, a afinidade é o primeiro aspecto considerado para seleção e otimização dos *hits*. No entanto, a afinidade por si só pode ser enganosa, pois muitas vezes está ligada ao tamanho da molécula. Assim, um foco na afinidade pode enviesar a seleção de compostos maiores durante a otimização de *hits* (HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004; SCHULTES et al., 2010). Além da afinidade pelo alvo, os compostos também devem apresentar propriedades físico-químicas adequadas, para que sejam capazes de avançar nas fases do desenvolvimento de fármacos (GLEESON et al., 2011; LEESON et al., 2021; MIGNANI et al., 2018; SCHULTES et al., 2010).

Um dos trabalhos pioneiros com o intuito de prever características de permeabilidade e solubilidade, particularmente no caso de compostos destinados à administração oral, foi realizado por Lipinski e colaboradores no final da década de 90 (LIPINSKI et al., 1997). Foi analisada uma série de fármacos que apresentavam uma boa biodisponibilidade oral (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Através desse estudo foi constatado que a maioria (90%) desses compostos apresentavam massa molecular (MW) menor ou igual a 500 Da, logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol/água calculado (ClogP) menor ou igual a 5, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor*; HBD) menor ou igual a 5 e número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor*; HBA) menor ou igual a 10

(LIPINSKI et al., 1997). A aplicação destes quatro parâmetros com os valores de corte mencionados anteriormente é conhecida como a “Regra dos 5” de Lipinski, sendo esta aplicada rotineiramente nos protocolos de descoberta de fármacos (LEESON et al., 2021; MIGNANI et al., 2016, 2018; MINETTI; REMETA, 2022; PICCIRILLO; AMARAL, 2018; SCHULTES et al., 2010). Essa estratégia visa usar um filtro de “*drug-likeness*” para identificar compostos com propriedades farmacocinéticas desfavoráveis já nos estágios iniciais do planejamento de fármacos (MIGNANI et al., 2018; TIAN et al., 2015).

Considerando essas informações e, com exceção do composto MMV1646508, os 12 *hits* do HTS testados nos ensaios de concentração-resposta também foram analisados quanto a alguns parâmetros clássicos da química medicinal, que são comumente considerados durante o processo de desenvolvimento de um fármaco, tais como CLogP, HBA, HBD, eficiência do ligante (*Ligand Efficiency*; LE), eficiência do ligante-lipofilicidade (*Lipophilic Ligand Efficiency*; LLE), contagem de átomos pesados (*Heavy Atom Count*; HAC), área de superfície polar (*Polar Surface Area*; PSA), número de ligações com rotação livre (*Rotatable Bonds*; RTB) (MIGNANI et al., 2018; MINETTI; REMETA, 2022; OSELUSI; CHRISTOFFELS; EGIEYEH, 2021; VALLIANATOU; GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2015; YUSOF; SEGALL, 2013). Estes parâmetros foram calculados através do *software* DataWarrior (SANDER et al., 2015) e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 16 a seguir.

Tabela 16. Parâmetros clássicos da química medicinal calculados pelo software DataWarrior para os hits obtidos com o HTS.

<i>Hit</i> ^a	IC ₅₀ ^b	pIC ₅₀ ^c	MW ^d	CLogP ^e	HBA ^f	HBD ^g	PSA ^h	LE ⁱ	LLE ^j	LLE _{AT} ^k	HAC ^l	Ligações rotacionáveis ^m
MMV904628	40,7	4,4	364,4	3,2	6	1	60,7	0,22	1,2	0,17	27	5
MMV904563	4,5	5,3	374,4	1,8	6	1	65,0	0,26	3,5	0,29	28	5
MMV904400	7,7	5,1	374,4	1,8	6	1	65,0	0,25	3,3	0,28	28	5
MMV903248	5,0	5,3	456,6	1,2	9	0	101,8	0,23	4,1	0,29	32	4
MMV902990	4,1	5,4	455,6	1,8	8	0	88,9	0,23	3,6	0,27	32	4
MMV902970	7,7	5,1	394,4	-0,2	10	0	99,8	0,24	5,3	0,37	29	3
MMV1767969	491,7	3,3	268,3	1,3	5	1	62,5	0,23	2,0	0,25	20	2
MMV1732934	66,3	4,2	256,3	1,6	5	0	65,9	0,30	2,6	0,30	19	3
MMV1674024	11,5	4,9	239,3	2,1	3	1	51,8	0,38	2,9	0,33	18	1
MMV1653983	30,4	3,5	395,5	3,2	6	2	118,2	0,17	0,3	0,13	28	6
MMV1652530	295,5	3,5	550,7	3,6	9	1	137,0	0,13	-0,1	0,11	38	8
MMV1646485	365,6	3,4	415,9	3,3	6	2	114,7	0,17	0,1	0,12	28	5

^a: As estruturas dos *hits* foram apresentadas nas Tabelas 14 e 15; ^b: Média dos IC₅₀ em µM a partir de pelo menos dois experimentos independentes; ^c: logaritmo negativo do IC₅₀ (pIC₅₀) em M; ^d: massa molecular em Dalton; ^e: logaritmo decimal do coeficiente de partição octanol/água calculado pelo *software* DataWarrior; ^f: número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (soma dos átomos O e N); ^g: número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (soma dos átomos OH e NH); ^h: área de superfície polar em Å²; ⁱ: eficiência do ligante expressa em unidades de kcal/mol/átomo pesado; ^j: eficiência do ligante-lipofilicidade, que é adimensional; ^k: eficiência do ligante-lipofilicidade Astex, que corresponde a um índice de eficiência modificado que combina lipofilicidade, tamanho e potência expresso em unidades de kcal/mol/átomo pesado; ^l: contagem de átomos pesados; ^m: número de ligações com rotação livre.

Fonte: autoria própria.

Como observado na Tabela 16, apenas o composto MMV1652530 apresenta um parâmetro que não se enquadra na Regra dos 5, no caso sua massa molecular, sendo esse valor um pouco maior do que o preconizado (550,7 Da; Tabela 16). Como esse composto também apresenta uma baixa potência de inibição contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (IC_{50} médio de 295,5 μ M), o mesmo não será priorizado para futuras otimizações.

Outras regras para prever a biodisponibilidade oral de fármacos foram criadas a partir da Regra dos 5, sugerindo-se diferentes valores de corte de acordo com os tipos de compostos analisados (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). No caso dos compostos em fases iniciais de otimização, alguns autores recomendam que os valores de corte sejam menores quando comparados com os descritos para os fármacos, que no caso seriam: MW menor ou igual a 400 Da, ClogP menor ou igual a 4, HBD menor ou igual a 4 e HBA menor ou igual a 8, seguindo assim à “Regra dos 4” (GLEESON, 2008; MINETTI; REMETA, 2022; PICCIRILLO; AMARAL, 2018; TEAGUE et al., 1999).

Estes valores mais restritos seriam adotados pois durante a fase de otimização de um composto *lead*, existe uma tendência de aumento da complexidade da molécula, como por exemplo, o aumento da massa molecular, aumento do número de ligações com rotação livre, e também da lipofilicidade destes compostos (HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004; JABEEN et al., 2012; KESERÜ; MAKARA, 2009; MIGNANI et al., 2018; MINETTI; REMETA, 2022; PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Portanto, para evitar que os compostos obtidos após este processo tenham baixa biodisponibilidade oral, seus valores de corte são menores.

Considerando a Regra dos 4, os compostos MMV903248, MMV902990, MMV902970, MMV1646485 não satisfazem a todos os requisitos preconizados para candidatos a compostos *lead* (vide Tabela 16), tendo assim menos chance de apresentar uma boa biodisponibilidade oral (PICCIRILLO; AMARAL, 2018). Além disso, o composto MMV1646485 apresenta uma baixa potência de inibição contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 (IC_{50} médio de 365,6 μ M) e não será priorizado para futuras otimizações.

O avanço dos protocolos de otimização de fármacos levou à percepção de que a Regra dos 5 não atendia adequadamente às necessidades do planejamento de fármacos baseado em fragmentos e, portanto, outras métricas foram introduzidas para preencher essa lacuna (MINETTI; REMETA, 2022). Neste sentido, a “Regra dos 3” foi

implementada para auxiliar os processos de tomada de decisão envolvendo essas moléculas menores (MW menor do que 300 Da) (CONGREVE et al., 2003).

De forma análoga à Regra dos 5 e com base em sucessos anteriores, os fragmentos ideais devem aderir às seguintes propriedades físico-químicas adequadas: MW menor ou igual a 300 Da, ClogP menor ou igual a 3, HBD menor ou igual a 3 e HBA menor ou igual a 3 (CONGREVE et al., 2003; FATTORI; SQUARCIA; BARTOLI, 2008). Também foi observado que o número de ligações rotacionáveis menor ou igual a 3 e a área de superfície polar menor ou igual a 60 Å² também podem ser critérios úteis para a seleção de fragmentos (CONGREVE et al., 2003; REES et al., 2004). O planejamento de fármacos baseado em fragmentos normalmente se inicia com um fragmento compatível com a Regra dos 3 e, idealmente, termina com um potente composto candidato compatível com a Regra dos 5 (SCHULTES et al., 2010).

Dentre os *hits* encontrados, os compostos MMV1767969, MMV1732934, MMV1674024 correspondem a compostos com MW menores do que 300 Da e podem ser considerados como fragmentos (WALSH et al., 2023). O composto MMV1674024 engloba todos os requisitos preconizados para um fragmento interessante para ser otimizado. Já os compostos MMV1767969 e MMV1732934 apresentam área de superfície polar e HBA maiores do que o recomendado. Como o composto MMV1767969 também apresenta uma baixa potência de inibição (IC₅₀ médio de 491,7 µM) contra a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002, este apresenta-se como uma molécula menos desejável para futuras otimizações.

Além desses parâmetros discutidos anteriormente, que são utilizados para escapar do viés da seleção dos *hits* apenas pela afinidade, culminando com a otimização de ligantes maiores, o foco da seleção deve ainda ser direcionado para o desenvolvimento de compostos que utilizam seus átomos de forma mais eficiente (SCHULTES et al., 2010). Neste contexto, para estimar a eficiência dos compostos, foi proposta a avaliação da afinidade de ligação em relação ao número de átomos pesados em uma molécula (átomos diferentes de hidrogênio), sendo esse parâmetro denominado eficiência do ligante (LE), podendo ser útil para avaliar a qualidade dos ligantes selecionados e no processo de otimização das moléculas (HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004).

A LE é definida como a energia livre de ligação (-ΔG) dividida pelo número de átomos pesados do ligante, ou seja $LE = -\Delta G/HAC$ ou $LE = 1,37 \cdot (pIC_{50})/HAC$

(HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004; KUNTZ et al., 1999). Portanto, a LE permite avaliar qual a contribuição de cada átomo para a interação com o alvo (CARR et al., 2005), sendo uma métrica simples para avaliar se um ligante deriva sua potência do ajuste ideal com a proteína alvo ou simplesmente em virtude de fazer muitos contatos com ela (KUNTZ et al., 1999).

A LE tornou-se rapidamente aceita como uma métrica para auxiliar na avaliação do potencial de fragmentos e *hits* iniciais, sendo que priorizar *hits* de acordo com sua LE permite que compostos menores de baixa afinidade sejam atraentes para otimizações adicionais (CARR et al., 2005; HOPKINS; GROOM; ALEX, 2004; MIGNANI et al., 2018; MORTENSON; MURRAY, 2011; SCHULTES et al., 2010).

Em geral, um candidato clínico com administração oral possui uma potência de 10 nM e, se compatível com a Regra dos 5, uma massa molecular máxima de 500 Da, que equivale, em média, a 38 HAC (LIPINSKI et al., 1997). Isso significa que uma LE de pelo menos 0,29 kcal/mol/HAC precisa ser mantida durante a otimização dos *hits* (SCHULTES et al., 2010). Este perfil leva ao valor limite comumente utilizado para a LE de pelo menos 0,3 kcal/mol/HAC para um fragmento ou um *hit* inicial para possibilitar a obtenção de um composto com alta eficiência e afinidade (KESERÜ; MAKARA, 2009; MIGNANI et al., 2018; SCHULTES et al., 2010; SIEGAL; AB; SCHULTZ, 2007). Considerando esse valor, apenas os compostos MMV1732934 e MMV1674024 apresentam uma LE adequada (de 0,3 e 0,38, respectivamente; Tabela 16) e por isso o composto MMV1674024 será priorizado para o processo de otimização, pois também atende à Regra dos 3 (vide Tabela 16).

Entretanto, é importante considerar que a métrica LE tende a favorecer compostos menores (MIGNANI et al., 2018; REYNOLDS; TOUNGE; BEMBENEK, 2008), como foi observado no presente trabalho. Sendo assim, a comparação de compostos com base na LE pode ser útil para avaliar o potencial de otimização adicional dos *hits* e *scaffolds* químicos específicos, principalmente de fragmentos (MORTENSON; MURRAY, 2011), desde que LE não seja empregada como um ponto de corte definitivo no processo de filtragem (KENNY; LEITÃO; MONTANARI, 2014; MINETTI; REMETA, 2022).

Ainda, a LE não permite avaliar outros parâmetros importantes que devem ser considerados durante o processo de desenvolvimento de fármacos, como por exemplo, a lipofilicidade, que deve ser considerada pois compostos altamente lipofílicos tendem a apresentar uma promiscuidade maior para interagir com vários

alvos (CONGREVE et al., 2008; HOPKINS et al., 2014; LEESON; SPRINGTHORPE, 2007). De fato, a alta lipofilicidade está fortemente associada a questões cruciais que podem afetar negativamente as propriedades *drug-likeness*, como solubilidade, penetração na membrana, estabilidade metabólica, falta de seletividade e toxicidade (LEESON; SPRINGTHORPE, 2007; MIGNANI et al., 2018; MORTENSON; MURRAY, 2011).

Neste contexto, o conceito de eficiência ligante-lipofilicidade (*Ligand-lipophilicity efficiency*; LLE), que é calculado de acordo com a equação: $LLE = pIC_{50} - ClogP$, deve ser considerado (LEESON; SPRINGTHORPE, 2007). A literatura relacionada à química medicinal descreve um número crescente de exemplos em que a LLE foi explicitamente empregada durante o processo de otimização de moléculas, pois essa métrica combina potência e lipofilicidade de tal maneira que a afinidade de um composto é normalizada pelo seu grau de lipofilicidade (FREEMAN-COOK; HOFFMAN; JOHNSON, 2013; GRIFFITH et al., 2009; HOPKINS et al., 2014; MINETTI; REMETA, 2022; PLOWRIGHT et al., 2013; SCHULTES et al., 2010). Uma LLE alta favorece os compostos que ganham muito de sua potência por meio de interações direcionadas, tornando assim a interação com o alvo mais específica (SCHULTES et al., 2010).

Com base nas propriedades médias de um fármaco de uso oral com um CLogP de aproximadamente 2,5 a 3,0 e potência na faixa de 1 a 10 nM, um valor de LLE ideal para um candidato a fármaco otimizado é de aproximadamente 5 a 7 (LEESON; SPRINGTHORPE, 2007; SCHULTES et al., 2010). O foco na LLE durante a otimização de um composto facilita a descoberta de moléculas com maior afinidade de ligação sem necessariamente aumentar a lipofilicidade ao mesmo tempo (HOPKINS et al., 2014; PEROLA, 2010). Entretanto, alcançar altos valores de LLE em moléculas otimizadas é mais provável quando se começa o processo com compostos que possuem um baixo CLogP (idealmente menor do que 3) (HOPKINS et al., 2014).

No caso de *hits* iniciais de coleções de moléculas pequenas, é recomendado que a LLE seja maior ou igual a 3 (MIGNANI et al., 2018; SCHULTES et al., 2010). Considerando esse dado, os compostos MMV904563, MMV904400, MMV903248, MMV902990 e MMV902970 apresentam uma LLE adequada para *hits* iniciais (Tabela 16). Cabe aqui destacar que, como descrito no tópico 4.22, esses compostos são estruturalmente relacionados e apresentam valores de IC_{50} contra a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 muito parecidos. Dentre estes, os compostos

MMV904563 e MMV904400 também satisfazem a Regra dos 4 e, como o composto MMV904563 apresenta um IC_{50} ligeiramente menor, ele será priorizado para futuras otimizações.

O composto MMV1674024, que apresentam uma LE adequada, possui uma LLE um pouco abaixo do que o recomendado (2,9; Tabela 16). Entretanto, alguns trabalhos já relataram a otimização de compostos com valores de LLE pouco promissores (próximos de zero) e com uma LE favorável (maior ou igual a 0,3), onde foram observados aumentos da LLE em até 5 unidades, mantendo os valores de LE constantes, atingindo assim o valor de LLE preconizado (GRIFFITH et al., 2009; HOPKINS et al., 2014; PLOWRIGHT et al., 2013; WALSH et al., 2023).

Além disso, o composto MMV1674024, que apresenta características de um fragmento, não deve ter seu potencial para otimização desmerecido apenas pelo fato de possuir uma LLE um pouco abaixo do desejado, pois, valores de LLE altos para fragmentos são incomuns, pois os mesmos geralmente não são muito potentes (HOPKINS et al., 2014; MORTENSON; MURRAY, 2011). Como consequência de seu pequeno tamanho, os *hits* de fragmentos geralmente têm IC_{50} elevados, comumente na faixa de 1 mM a 10 μ M. Nesse caso, a LE corresponde a uma métrica útil para identificar os melhores pontos de partida para otimização (HOPKINS et al., 2014; WALSH et al., 2023).

Ainda, no caso da otimização de fragmentos, também é muito interessante avaliar um índice de eficiência derivado da LLE, a LLE_{AT} , que combina lipofilicidade, tamanho da molécula e potência, e é calculado pela fórmula: $LLE_{AT} = 0,111 + 1,37 \cdot (LLE/HAC)$ (HOPKINS et al., 2014; MIGNANI et al., 2018; MORTENSON; MURRAY, 2011). Este índice foi projetado para ter o mesmo valor de corte da LE, sendo que os fragmentos com LE e LLE_{AT} maior ou igual a 0,3 tem maior probabilidade de serem otimizados em moléculas potentes com propriedades físico-químicas apropriadas para um medicamento oral (MORTENSON; MURRAY, 2011).

Como observado na Tabela 16, o composto MMV1674024 apresenta uma LLE_{AT} de 0,33, estando assim de acordo com o valor preconizado para essa métrica. Sendo assim, mais uma vez o composto MMV1674024 demonstra um bom potencial para ser submetido ao processo de otimização.

Após todas essas análises, os compostos MMV1674024 e MMV904563 apresentaram-se como os *hits* com o maior potencial para futuras otimizações buscando melhorar a potência de inibição sobre as *Leishmania sp.* DHPs. Um dos

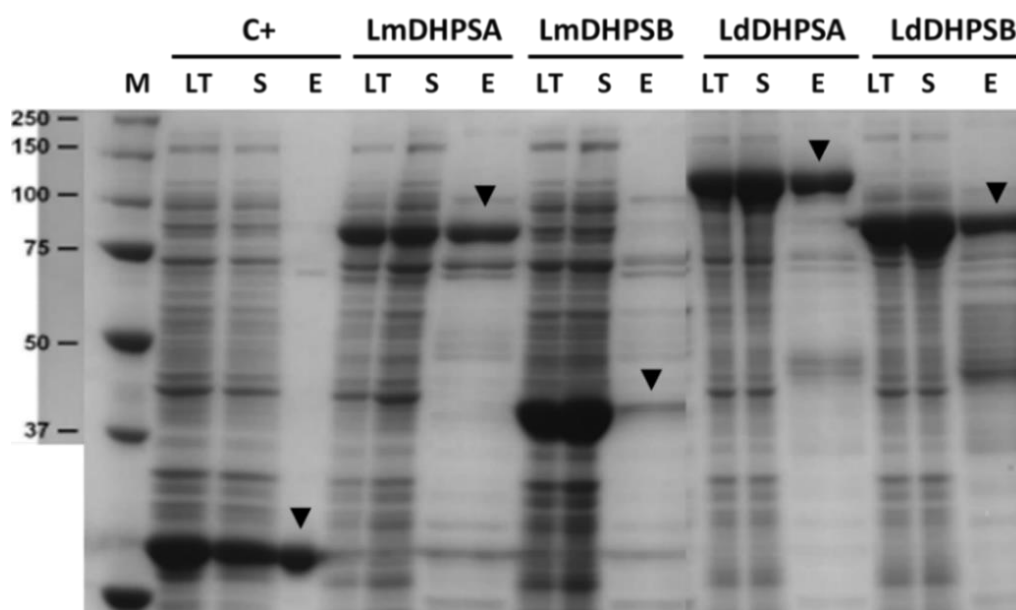
caminhos para guiar esse processo de otimização corresponde à determinação do sítio de ligação desses compostos na proteína alvo por cristalografia de raios X (MURRAY; REES, 2009; WALSH et al., 2023).

4.23. Nova expressão em pequena escala das *Leishmania* sp. DHPs

Como descrito anteriormente, combinando uma série de estratégias, como por exemplo, a clonagem das DHPs de várias espécies de *Leishmania* associada à fusão com diferentes tags; produção de proteína por autoindução; lise combinada das duas isoformas das *Leishmania* sp. DHPs na presença de L-arginina e de L-ácido glutâmico, foi finalmente possível produzir as LdDHPs e LmDHPs na forma solúvel e ativa em *E. coli*. No caso, as LdDHPs clonadas no plasmídeo pAVA-MBP (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002) e produzidas em um meio de autoindução de proteínas apresentou o melhor rendimento proteico (1,9 mg de proteína por L de cultura).

Como esse método diferente de indução da expressão de proteínas em *E. coli* requer um meio de cultura específico e um sistema de crescimento diferente (LEX *biorreactor*), não foi possível reproduzi-lo no Brasil após o término do período da BEPE. Sendo assim, para dar continuidade ao projeto, foi realizado um teste de expressão em pequena escala com as LdDHPs utilizando a indução da expressão de proteínas pelo IPTG. Para isso, os plasmídeos pAVA-MBP (Tabela 2) contendo a LdDHPSA-cb002 e a LdDHPSB-cb002 clonadas foram transformados na linhagem de expressão BL21(DE3)-R3-pRARE2 de *E. coli*, seguida pela purificação por IMAC, a partir dos lisados celulares clarificados (BURGESS-BROWN et al., 2014; SAVITSKY et al., 2010). Esse teste também foi realizado com a LmDHPSA clonada em pSUMO-LIC (LmDHPSA-cb018) e da LmDHPSB clonada em pNIC-CTH0 (LmDHPSB-cb010) (Figura 47).

Figura 47. SDS-PAGE das frações obtidas a partir do teste de expressão em pequena escala com as DHPs de *Leishmania* sp. O sobrenadante, obtido após lise celular e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Tamanhos aproximados das proteínas em kDa: LmDHPSA-cb018: 74; LmDHPSB-cb010: 42; LdDHPSA-cb002: 109,2; LdDHPSB-cb002: 85,7. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). LT: lisado total. S: fração solúvel. E: fração eluída. C+: controle positivo de expressão de proteínas em *E. coli* utilizado pelo CQMED (resíduos M1 a T248 do gene NANPA clonado em pNIC28-Bsa4; 30,4 kDa). As setas indicam as bandas das proteínas de interesse.



Fonte: autoria própria.

A Figura 47 mostra que a expressão da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 na forma solúvel em *E. coli* foi eficientemente induzida pelo IPTG. O mesmo pode ser observado para a LmDHPSA-cb018 e a LmDHPSB-cb010. Entretanto, como a LmDHPSB-cb010 apresentou-se pouco solúvel durante esse teste, as LdDHPSs foram selecionadas para serem produzidas e purificadas em larga escala.

4.24. Purificação em larga escala da LdDHPS, LmDHPS e HsDHPS

Como as LdDHPSs apresentaram bandas mais fartas durante o ensaio de expressão em pequena escala, essas enzimas foram escolhidas para serem purificadas em larga escala. Para confirmar os resultados obtidos no teste de expressão em pequena escala, foi realizado um aumento da escala de produção da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 empregando a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 cultivada em 6 L de meio TB para casa isoforma, totalizando 12 L de cultura.

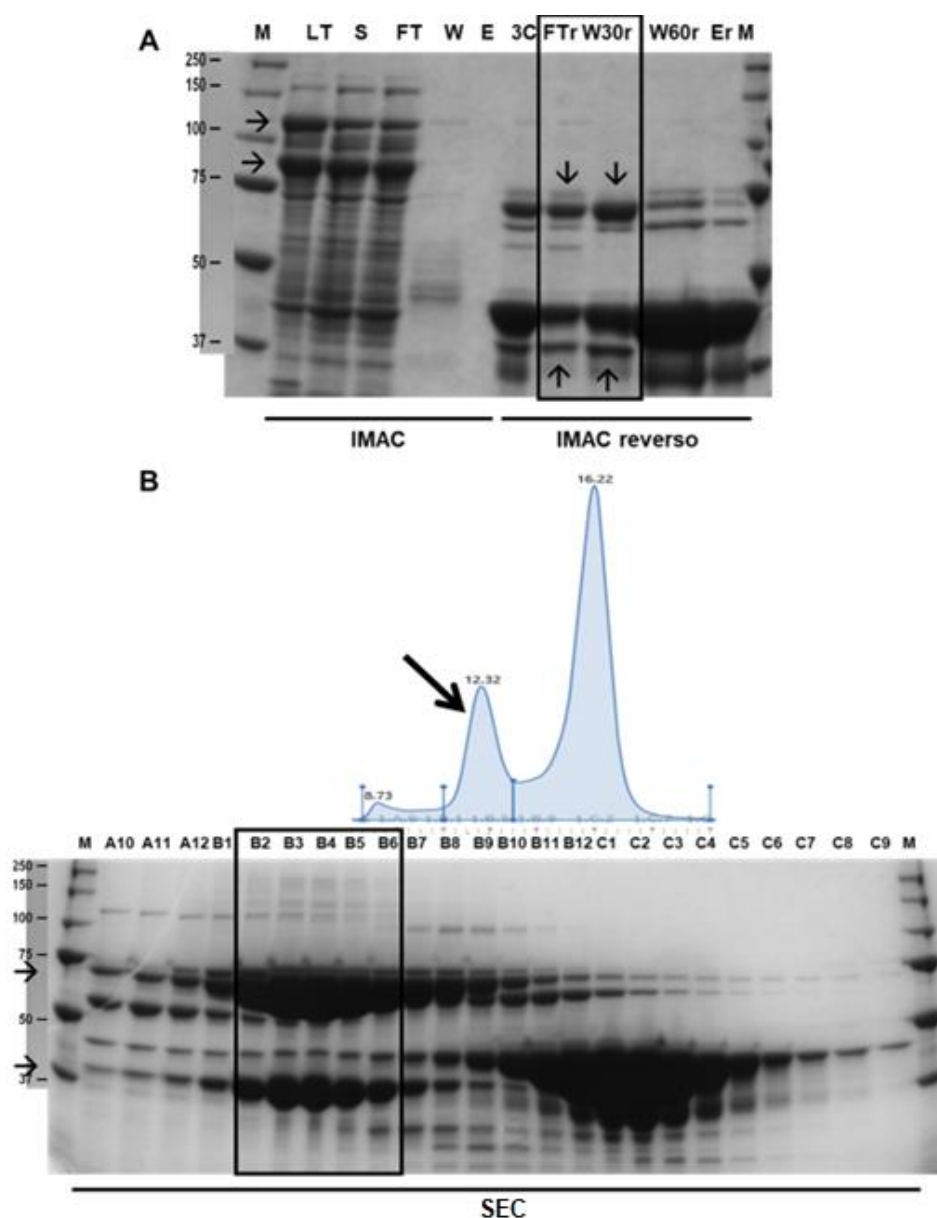
Além disso, considerando os problemas de solubilidade dessas proteínas, foi realizada a lise combinada das linhagens de *E. coli* carreando a LdDHPSA-cb002 e a LdDHPSB-cb002, assim como foram adicionados L-arginina e L-ácido glutâmico 50 mM durante o processo de lise celular.

Como nos testes de expressão em pequena escala, a IMAC foi utilizada como a primeira etapa de purificação. A análise por SDS-PAGE 12% das frações da IMAC demonstrou que esse processo de purificação enriqueceu com sucesso as LdDHPSs provenientes dos lisados celulares clarificados (Figura 48A).

A fração eluída obtida a partir da primeira etapa de IMAC foi tratada *overnight* com protease 3C em uma proporção molar de 15:1 da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 para a protease 3C. Este tratamento removeu eficientemente as *tags* His₆/MBP da região N-terminal das LdDHPSs, como evidenciado pela redução de aproximadamente 44 kDa no tamanho dessas proteínas (Figura 48A; fração 3C).

Para remover as proteínas que se ligaram inespecificamente durante a primeira etapa de IMAC, a amostra tratada com protease 3C foi submetida a um segundo processo de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC revers). Nesta etapa, a maioria das LdDHPSs foram encontrados nas frações *flow-through* e lavagem com 30 mM de imidazol (Figura 48A; frações FTr e W30r), enquanto alguns contaminantes, incluindo as LdDHPSs contendo as *tags* His₆/MBP, MBP livre e a protease 3C, foram eluídos da resina com tampão contendo 60 ou 300 mM de imidazol (Figura 48A; frações W60 e Er). Então as frações *flow-through* e lavagem com 30 mM de imidazol foram reunidas e submetidas à etapa final de purificação por SEC (Figura 48B).

Figura 48. Purificação em larga escala da LdDHPSA-cb002 e da LdDHPSB-cb002 em combinação. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas pela IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), eluato com 300 mM de imidazol (E). Análise por SDS-PAGE da fração eluída após o tratamento com protease 3C (3C). A fração 3C gerou os seguintes estratos após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (FTr), lavagem com 30 mM de imidazol (W30r), lavagem com 60 mM de imidazol (W60r) e eluição em 300 mM de imidazol (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanho aproximado das LdDHPSs em kDa, com *tag* = LdDHPSA-cb002: 109,2 e LdDHPSB-cb002: 85,7; sem *tag* = LdDHPSA-cb002: 64,6 e LdDHPSB-cb002: 41,1. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam as bandas das LdDHPSs. As frações proteicas destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Mesmo após as três etapas de purificação, a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 apresentou contaminação pelo MBP clivado. Isso pode ter acontecido pois o MBP é altamente solúvel e pode atuar como uma chaperona ao sequestrar proteínas propensas à agregação, permitindo o dobramento nativo da proteína nascente (HEWITT et al., 2011; KAPUST; WAUGH, 1999), o que pode significar que a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 não se dobrou corretamente por si só e precisou do MBP livre para se estabilizar.

Além da contaminação com o MBP, essa purificação gerou apenas 3,1 mg da LdDHPS, representando um rendimento proteico de 0,26 mg de LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 por L de cultura, ficando muito aquém do rendimento de 1,9 mg de LdDHPS por L de cultura obtido durante a BEPE no laboratório do Dr. Van Voorhis. Isso pode ter acontecido pois a produção de proteínas por autoindução geralmente resulta em um maior rendimento em comparação com a indução convencional com IPTG (STUDIER, 2005).

Como a pureza e o rendimento da purificação das LdDHPSs não foi satisfatório, foi realizado o aumento da escala de produção da LmDHPSA clonada em pSUMO-LIC (LmDHPSA-cb018) e da LmDHPSB clonada em pNIC-CTH0 (LmDHPSB-cb010) empregando a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2, cultivadas em 9 L de meio TB para casa isoforma, totalizando 18 L de cultura. Além disso, considerando os problemas de solubilidade dessas proteínas, também foi realizada a lise combinada das duas isoformas da LmDHPS, assim como foram adicionados L-arginina e de L-ácido glutâmico 50 mM durante o processo de lise celular. Como nos testes em pequena escala, a IMAC foi utilizada como a primeira etapa de purificação. A análise por SDS-PAGE 12% das frações da IMAC demonstrou que esse processo de purificação enriqueceu com sucesso as LmDHPSs provenientes dos lisados celulares clarificados (Figura 49A).

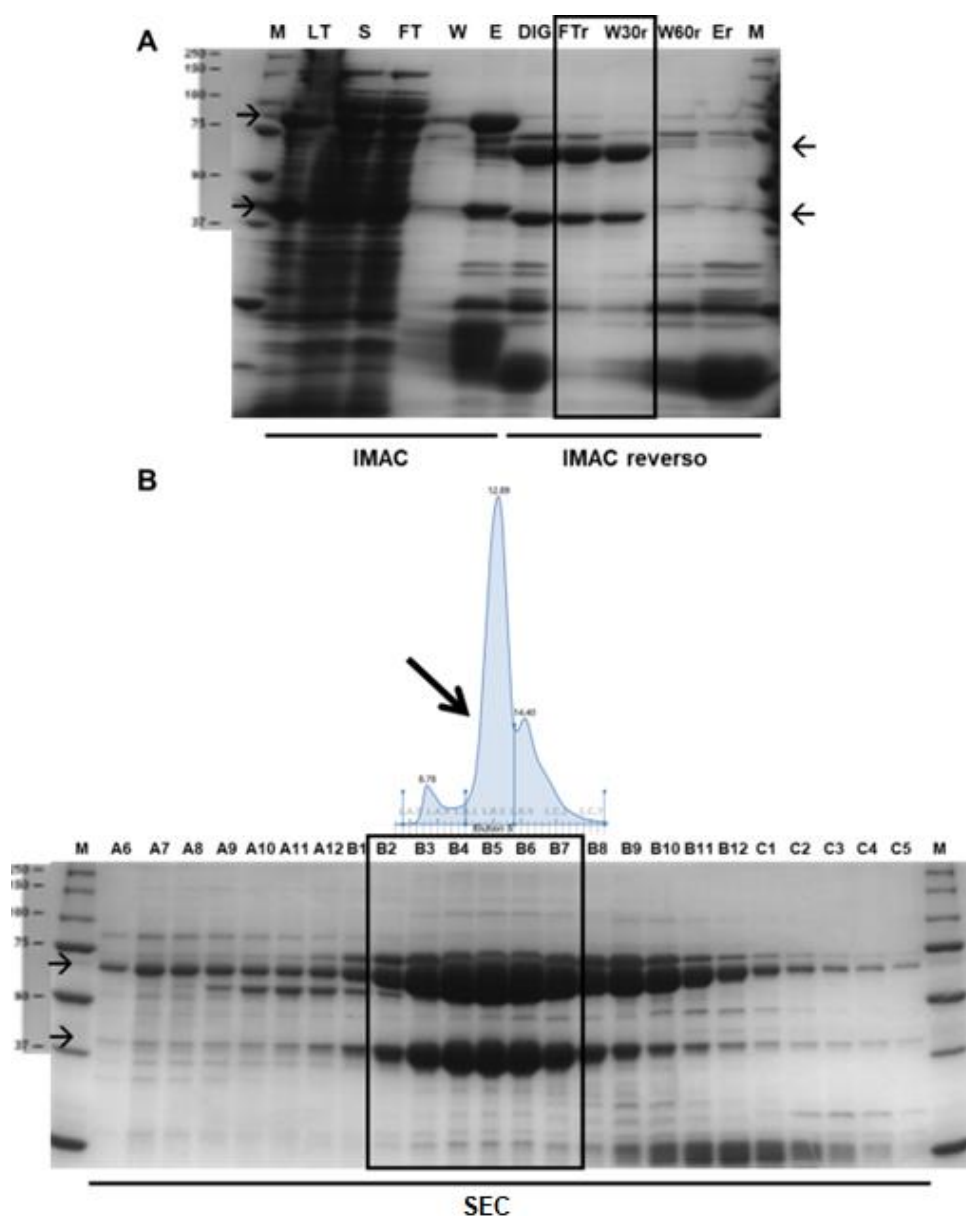
A fração eluída obtida a partir da primeira etapa de IMAC foi tratada *overnight* com as proteases de SUMO e TEV, em uma proporção molar de 15:1 de LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 para cada protease. Este tratamento removeu eficientemente as *tags* His₆/SUMO da porção N-terminal da LmDHPSA-cb018, assim como a *tag* His₆ da porção C-terminal da LmDHPSB-cb010, como evidenciado pela redução de aproximadamente 13 e 1 kDa no tamanho da LmDHPSA-cb018 e da LmDHPSB-cb010, respectivamente (Figura 49A; fração DIG).

Para remover as proteínas que se ligaram inespecificamente durante a primeira etapa de IMAC, a amostra tratada com as proteases foi submetida a um segundo processo de IMAC. Nesta etapa, a maioria das LmDHPSs foram encontrados nas frações *flow-through* e lavagem com 30mM de imidazol (Figura 49A; frações FTr e W30r), enquanto que a maioria dos contaminantes, incluindo as LmDHPSs contendo as *tags*, SUMO livre e as proteases, foram eluídos da resina com tampão contendo 60 ou 300 mM de imidazol (Figura 49A; frações W60 e Er). Então, as frações *flow-through* e lavagem com 30 mM de imidazol foram reunidas e submetidas à etapa final de purificação por SEC (Figura 49B).

Além do maior nível de pureza, o rendimento da LmDHPS foi um pouco maior, gerando 7,8 mg de proteína, o que corresponde a 0,43 mg de LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 por L de cultura.

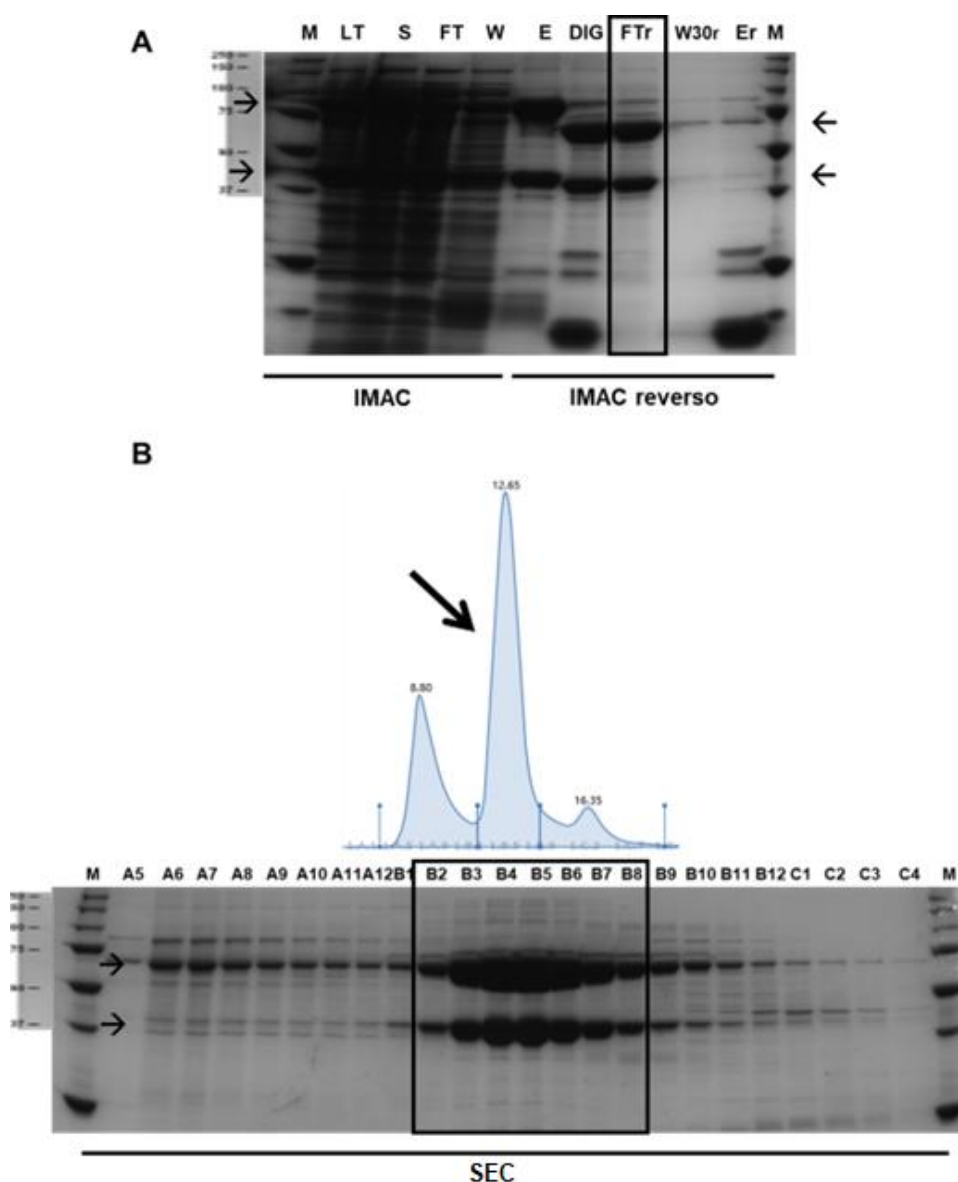
Em uma tentativa de aumentar o rendimento da purificação da LmDHPS, foram realizados praticamente os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a purificação da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010, com as seguintes modificações: adição de detergente zwitteriônico CHAPS 0,5% ao tampão de lise e o cultivo de 12 L de cultura para cada isoforma da LmDHPS, totalizando 24 L de cultura (Figura 50).

Figura 49. Purificação em larga escala da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 em combinação. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas pela IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), eluato com 300 mM de imidazol (E). Análise por SDS-PAGE das frações eluídas após tratamento com as proteases de SUMO e TEV (DIG). A fração DIG gerou as seguintes frações após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (FTr), lavagem com 30 mM de imidazol (W30r), lavagem com 60 mM de imidazol (W60r) e eluição em 300 mM de imidazol (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanho aproximado das proteínas em kDa, com *tag* = LmDHPSA-cb018: 74,1 e LmDHPSB-cb010: 41,8; sem *tag* = LmDHPSA-cb018: 61,5 e LmDHPSB-cb010: 40,9. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam as bandas das LmDHPSs. As frações proteicas destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou coletadas para concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Figura 50. Purificação em larga escala das LmDHPSS utilizando o detergente CHAPS no tampão de lise. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma IMAC reversa e cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas pela IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), eluato com 300 mM de imidazol (E). Análise por SDS-PAGE das frações eluídas após tratamento com as proteases de SUMO e TEV (DIG). A fração DIG gerou as seguintes frações após a segunda etapa de purificação por IMAC: *flow-through* (FTr), lavagem com 30 mM de imidazol (W30r) e eluição em 300 mM de imidazol (Er). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após SEC. Tamanho aproximado das proteínas em kDa, com *tag* = LmDHPSA-cb018: 74,1 e LmDHPSB-cb010: 41,8; sem *tag* = LmDHPSA-cb018: 61,5 e LmDHPSB-cb010: 40,9. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standards*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas das LmDHPSS. As frações proteicas destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

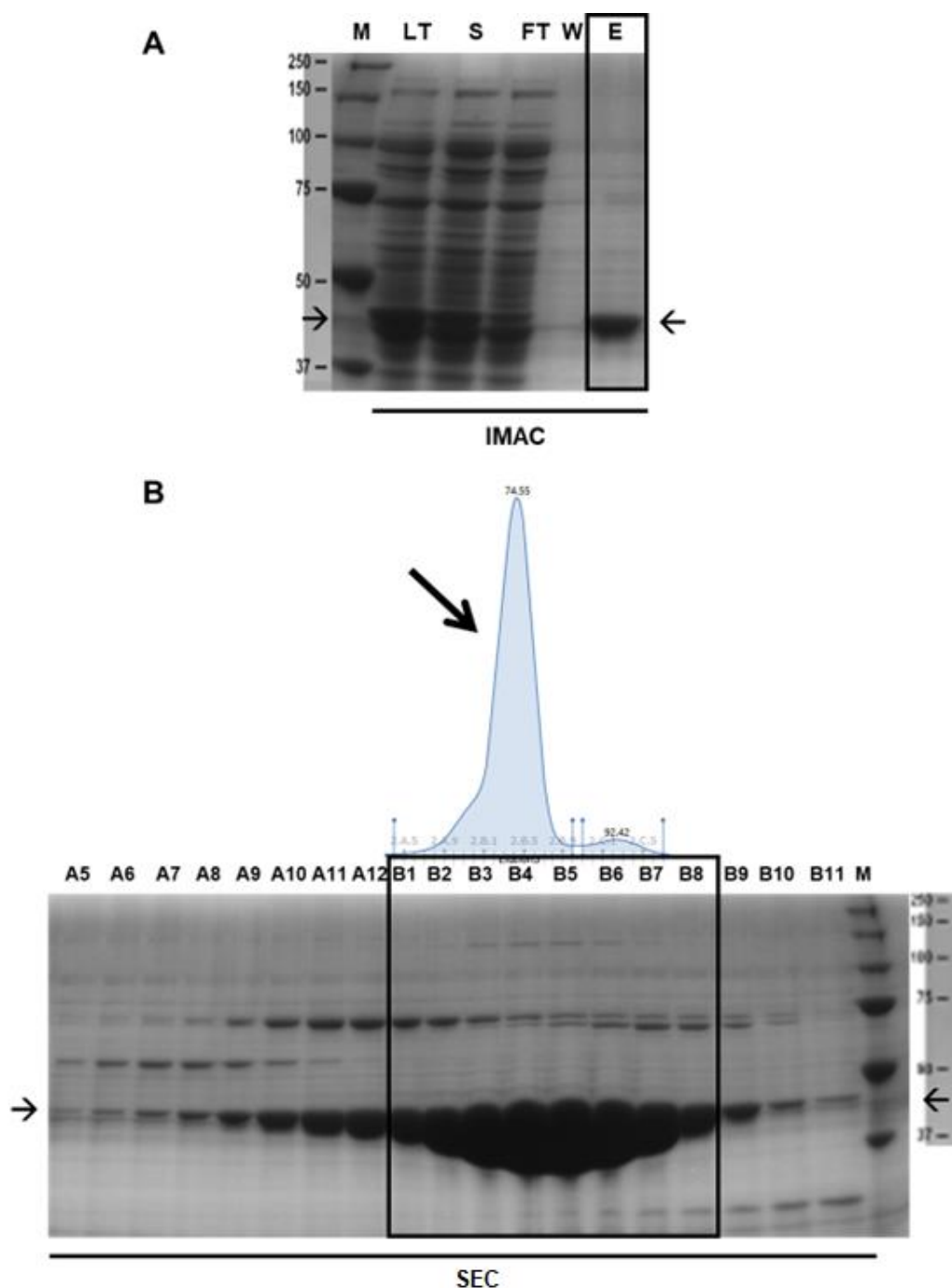
A adição de CHAPS ao tampão de lise proporcionou um aumento no rendimento da purificação, gerando 22 mg de LmDHPS, ou seja, 0,92 mg de LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 por L de cultura.

Finalmente, a produção e purificação da HsDHPS foi escalonada utilizando a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)-R3-pRARE2 cultivada em 4,5 L de meio TB. A IMAC também foi utilizada como primeira etapa de purificação desta proteína. A análise por SDS-PAGE 12% das frações geradas pela IMAC demonstrou que este processo de purificação enriqueceu com sucesso a HsDHPS a partir dos lisados celulares clarificados (Figura 51A). Como essa construção da HsDHPS não apresenta a *tag* His₆ clivável, a fração eluída com tampão contendo imidazol 300 mM durante o IMAC foi submetida à próxima etapa purificação por SEC (Figura 51B).

Após essas etapas de purificação, o rendimento obtido para a HsDHPS foi de 4,8 mg de proteína por L de cultura, totalizando 21,4 mg de HsDHPS purificada.

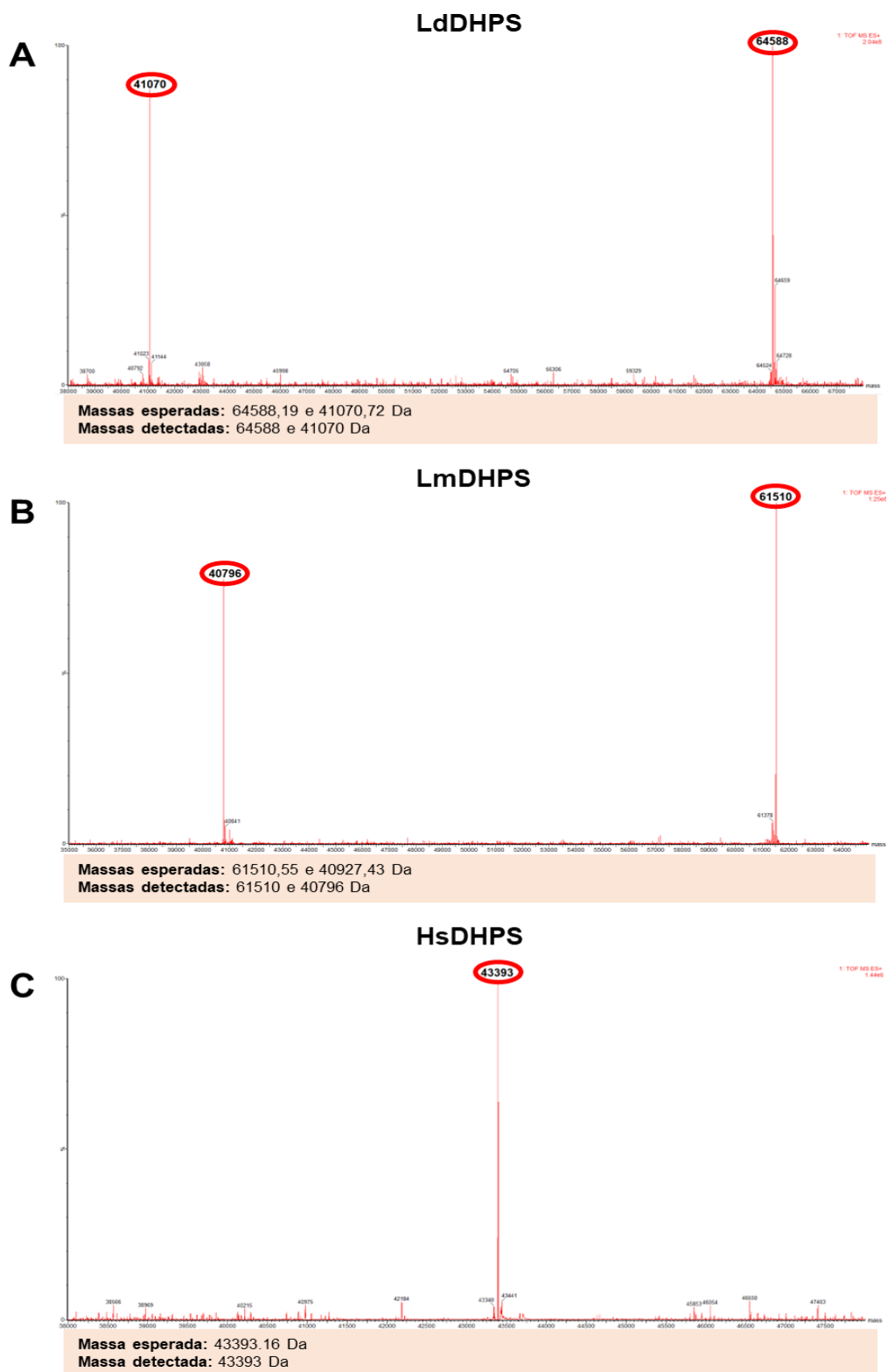
Além disso, com excessão da LmDHPSB-cb010, as DHPSs purificadas apresentaram a massa molecular esperada, conforme determinado pela espectrometria de massa intacta (Figura 52).

Figura 51. Purificação em larga escala da HsDHPS. O sobrenadante, obtido após sonicação e clarificação, foi submetido a uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), seguida de uma cromatografia de exclusão molecular (SEC). **(A)** Análise por SDS-PAGE das frações geradas pela IMAC: lisado total (LT), fração solúvel (S), *flow-through* (FT), lavagem com 30mM de imidazol (W) e eluato com 300 mM de imidazol (E). **(B)** Análise por SDS-PAGE das amostras após a SEC. Tamanho aproximado da HsDHPS em kDa: 43,4. M: marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Unstained Protein Standard*, Bio-Rad). As setas indicam a localização das bandas da HsDHPS. As frações proteicas destacadas com os retângulos foram selecionadas para a próxima etapa de purificação ou foram coletadas para concentração final da proteína.



Fonte: autoria própria.

Figura 52. Análise de espectrometria de massa intacta das DHPs purificadas a partir de culturas em larga escala. Os espectros de massa/carga são mostrados para: **(A)** LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002, **(B)** LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e **(C)** HsDHPSA. Os valores de massa esperados e observados estão indicados na figura.



Fonte: autoria própria.

A diferença de tamanho observada para a LmDHPSB-cb010 (40796 Da ao invés de 40927,4 Da) pode ser explicada pelo fato de que a LmDHPSB-cb010 apresenta a sua metionina no N-terminal exposta, pois a *tag* His₆ está localizada na região C-terminal. A metionina N-terminal pode ser clivada co-traducionalmente pela enzima metionina aminopeptidase (MAP). Quando as proteínas recombinantes são expressas em sistemas de expressão de bactérias e mamíferos, existe uma regra universal simples que prevê se a metionina iniciadora será processada pela MAP. Esta regra se baseia no tamanho do resíduo adjacente (penúltimo) à N-metionina (WINGFIELD, 2017). Como o aminoácido adjacente à N-metionina na LmDHPSB-cb010 é uma prolina, a clivagem dessa N-metionina pela MAP é favorecida (WINGFIELD, 2017), o que explicaria essa diferença de tamanho entre a massa observada e a massa esperada para a LmDHPSB-cb010.

4.25. Ensaio de atividade enzimática *in vitro* por fluorescência com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS

Durante o período de BEPE no laboratório do Dr. Wesley Van Voorhis, não foi possível utilizar o ensaio *in vitro* baseado na detecção da fluorescência do NADH para realizar o rastreamento de inibidores para as DHPSS de *Leishmania sp.* devido à grande interferência da autofluorescência dos compostos testados. A maioria dos ensaios HTS utiliza leitores de placas com filtros com bandas de grande amplitude. Esses filtros aumentam a probabilidade de um composto fluorescente interferir no ensaio, mas têm o benefício de permitir que o mesmo conjunto de filtros seja utilizado para fluoróforos com excitação e emissão próximas (SIMEONOV; DAVIS, 2004). Como o leitor de placas disponível no CQMED possui filtros de fluorescência com menor amplitude, os *hits* identificados durante a BEPE foram testados pelo ensaio baseado na fluorescência do NADH, com o intuito de confirmar a inibição desses compostos por um ensaio alternativo ao NAD⁺/NADH-Glo utilizado durante a BEPE.

Cabe aqui destacar que o ensaio bioquímico utilizado aqui corresponde ao mesmo ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pelas DHPSS, descrito previamente nos tópicos 4.4 e 4.20.

Com o intuito de garantir que esse ensaio fosse robusto e sensível, a fluorescência produzida pelo NADH foi mensurada em concentrações crescentes das LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e HsDHPS na presença de excesso de cofator

NAD⁺ e do substrato espermidina (concentrações descritas na Tabela 8 e nas legendas das Figuras 53 e 54 a seguir). As curvas de progresso da reação permitiram determinar uma concentração de enzima que produziu uma razão entre o sinal/ruído robusta na faixa linear da reação. Com base nesses resultados, a concentração de trabalho escolhida para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS foi de 500 nM do tetrâmero.

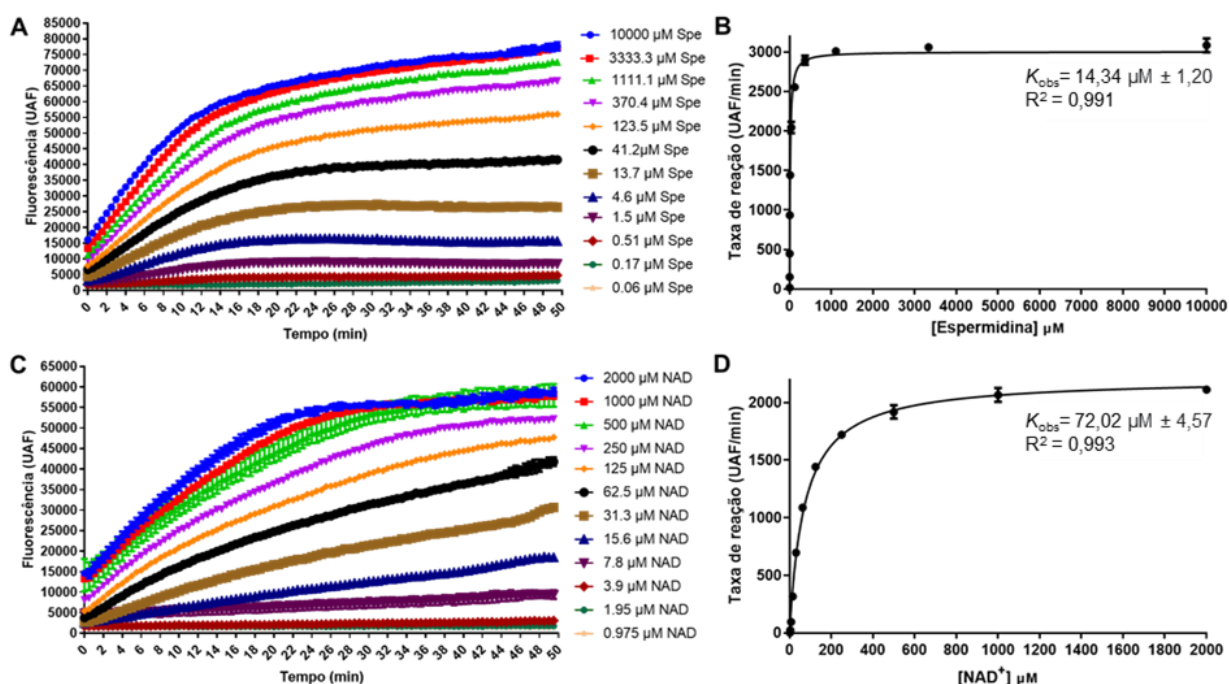
Para definir uma concentração de espermidina apropriada para o ensaio, as curvas de progresso da reação na presença de concentrações crescentes desse substrato (0,06 a 10000 µM para LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; 0,01 a 2000 µM para HsDHPS) e uma concentração fixa e excessiva do cofator NAD⁺ (300 µM para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; 60 µM para a HsDHPS) foram determinadas. Essas curvas foram utilizadas para calcular a taxa linear de formação de NADH em várias concentrações de espermidina (V_{esp}) (Figuras 53A e 54A).

Um gráfico com valores de V_{esp} versus as concentrações de espermidina foi utilizado para estabelecer a relação hiperbólica da reação parcial das DHPSs com a concentração de substrato (K_{obs} da espermidina para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010: $14,34 \pm 1,20$ µM, Figura 53B; K_{obs} da espermidina para a HsDHPS: $2,06 \pm 0,12$ µM, Figura 54B). A partir desses dados, a concentração fixa de espermidina escolhida para a realização dos ensaios de inibição enzimática foi de 21,5 e 3,1 µM ($1,5 \times K_{obs}$ da espermidina) para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS, respectivamente.

Experimentos equivalentes foram realizados para estabelecer as concentrações apropriadas do cofator NAD⁺ para o ensaio. Nesses experimentos, a concentração de espermidina foi mantida fixa (100 µM para LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; 50 µM para HsDHPS) e a taxa linear de formação do NADH foi calculada na presença de concentrações crescentes de NAD⁺ (0,975 a 1000 µM para LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010; 0,06 a 2000 µM para HsDHPS) (V_{NAD^+}) (Figuras 53C e 54C).

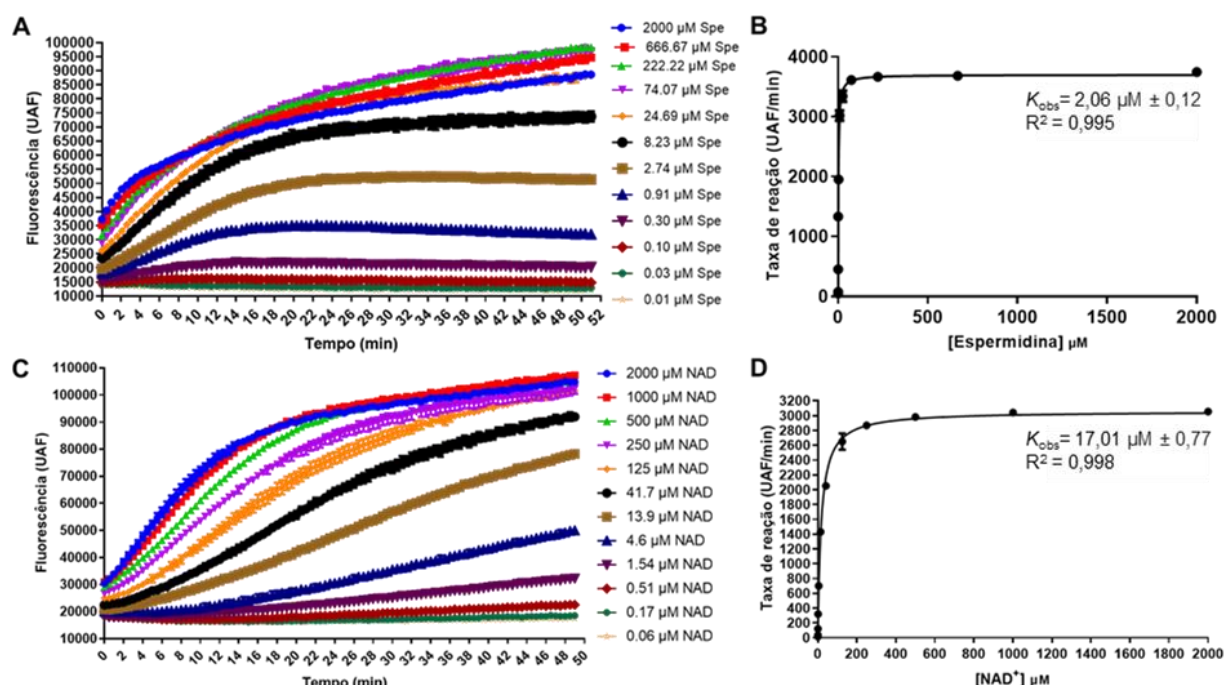
O gráfico dos valores de V_{NAD^+} versus as concentrações de NAD⁺ foi empregado para estabelecer a relação hiperbólica da reação parcial das DHPSs com a concentração de cofator (K_{obs} do NAD⁺ para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010: $72,02 \pm 4,57$ µM, Figura 53D; K_{obs} do NAD⁺ para a HsDHPS: $17,01 \pm 0,77$ µM, Figura 54D). A partir desses dados, a concentração fixa de NAD⁺ escolhida para a realização dos ensaios de inibição enzimática foi de 108 e 25,5 µM ($1,5 \times K_{obs}$ do NAD⁺) para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS, respectivamente.

Figura 53. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010. **(A)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação do NADH pela LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação da espermidina. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm medida a cada 45s por 50 min. **(B)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,06 a 10000 μ M) e concentrações fixas da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (500 nM do tetrâmero) e do NAD⁺ (300 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da espermidina é mostrado na figura. **(C)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela LmDHPS durante a titulação de NAD⁺. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm medida a cada 45s por 50 min. **(D)** Titulação do NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (0,975 a 1000 μ M) e concentrações fixas da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (500 nM do tetrâmero) e da espermidina (100 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do do NAD⁺ é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Fonte: autoria própria.

Figura 54. Estabelecimento de um ensaio enzimático baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial da HsDHPS. (A) Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela HsDHPS durante a titulação de espermidina. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm medida a cada 45s por 50 min. **(B)** Titulação da espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (0,01 a 2000 μ M) e concentrações fixas da HsDHPS (500 nM do tetrâmero) e do NAD⁺ (60 μ M) foram empregadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} da spermidina é mostrado na figura. **(C)** Curva de progresso da reação demonstrando a formação de NADH pela HsDHPS durante a titulação de NAD⁺. Intensidade de emissão de fluorescência após excitação a 355 ± 15 nm medida a cada 45s por 50 min. **(D)** Titulação do NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (0,06 a 2000 μ M) e concentrações fixas da HsDHPS (500 nM do tetrâmero) e da espermidina (50 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. O valor estimado para o K_{obs} do NAD⁺ é mostrado na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.

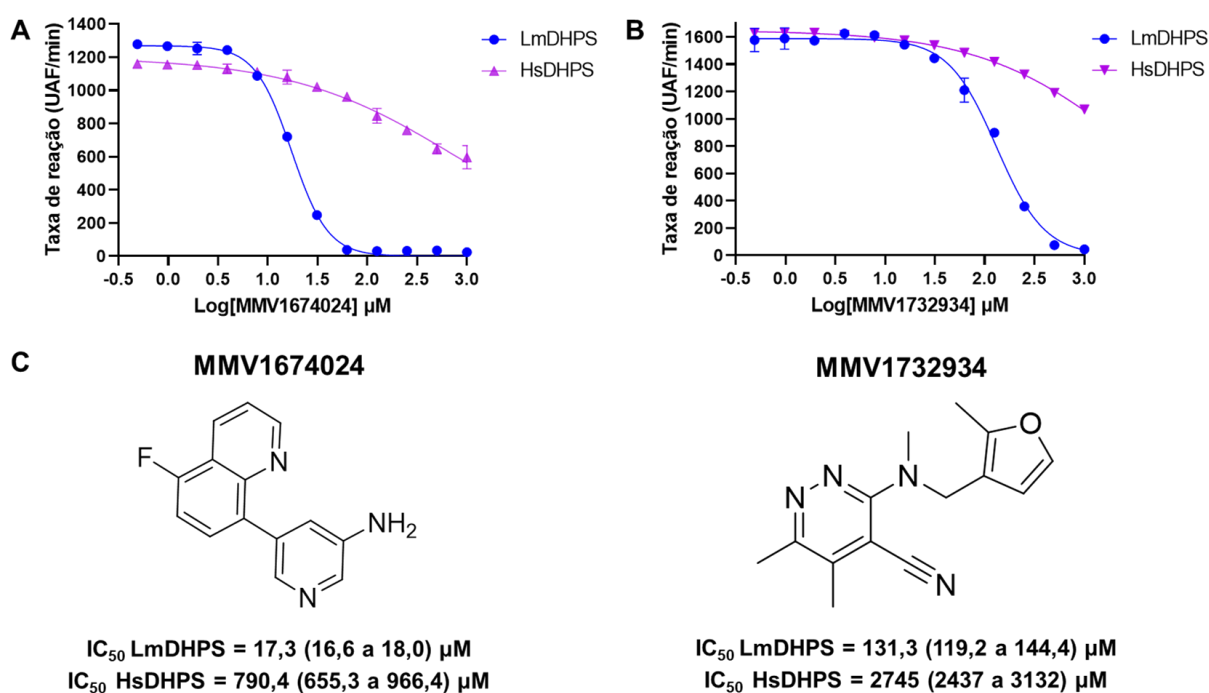


Fonte: autoria própria.

No seguimento desses estudos preliminares, foi realizada a tentativa de mostrar que esse ensaio poderia ser utilizado para estimar valores de IC₅₀ para os 12 inibidores das *Leishmania sp.* DHPSS identificados pelo ensaio HTS durante o período de BEPE. Entretanto, os únicos compostos que não ultrapassaram o limite de detecção do leitor de placas devido à autofluorescência foram os compostos MMV1674024 e MMV1732934. As curvas de progresso da reação foram utilizadas para estimar a taxa linear de formação de NADH pelas DHPSS em concentrações crescentes de MMV1674024 e MMV1732934 (0,49 a 1000 μ M), mantendo concentrações fixas de NAD⁺, de espermidina e das enzimas LmDHPSA-

cb018+LmDHPSB-cb010 e HsDHPS (500 nM do tetrâmero). A curva de concentração-resposta resultante foi utilizada para estimar o valor de IC_{50} para os compostos MMV1674024 e MMV1732934 (Figura 55 A e B).

Figura 55. Concentração-resposta dos compostos MMV1674024 e MMV1732934 contra a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e a HsDHPS utilizando o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH. (A) Determinação do IC_{50} para o composto MMV1674024. Concentrações variáveis de MMV1674024 foram empregadas (0,49 a 1000 μ M) e concentrações fixas das DHPSS (500 nM do tetrâmero), espermidina (21,5 μ M para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e 3,1 μ M para a HsDHPS) e NAD^+ (108 μ M para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e 25,5 μ M para a HsDHPS) foram utilizadas para realizar o experimento. **(B)** Determinação do IC_{50} para o composto MMV1732934. Concentrações variáveis de MMV1732934 foram empregadas (0,49 a 1000 μ M) e concentrações fixas das DHPSS (500 nM do tetrâmero), espermidina (21,5 μ M para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e 3,1 μ M para a HsDHPS) e NAD^+ (108 μ M para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 e 25,5 μ M para a HsDHPS) foram usadas para realizar o experimento. **(C)** Estrutura dos compostos e seus respectivos IC_{50} contra a LmDHPS e HsDHPS.



Fonte: autoria própria.

Os valores de IC_{50} obtidos para os compostos MMV1674024 e MMV1732934 contra a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 foram de 17,3 e 131,3 μ M, respectivamente. Esses valores foram maiores do que os valores de IC_{50} obtidos para esses compostos empregando o ensaio NAD^+ /NADH-Glo baseado em luminescência (5,2 e 33,6 μ M para MMV1674024 e MMV1732934, respectivamente).

Apesar dos valores de IC_{50} obtidos através do ensaio baseado em fluorescência serem maiores do que os obtidos com o ensaio baseado em luminescência, a inibição da atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 ainda foi significativamente maior do que a inibição da atividade da HsDHPS (45 vezes maior para o composto MMV1674024 e 21 vezes maior para o composto MMV1732934).

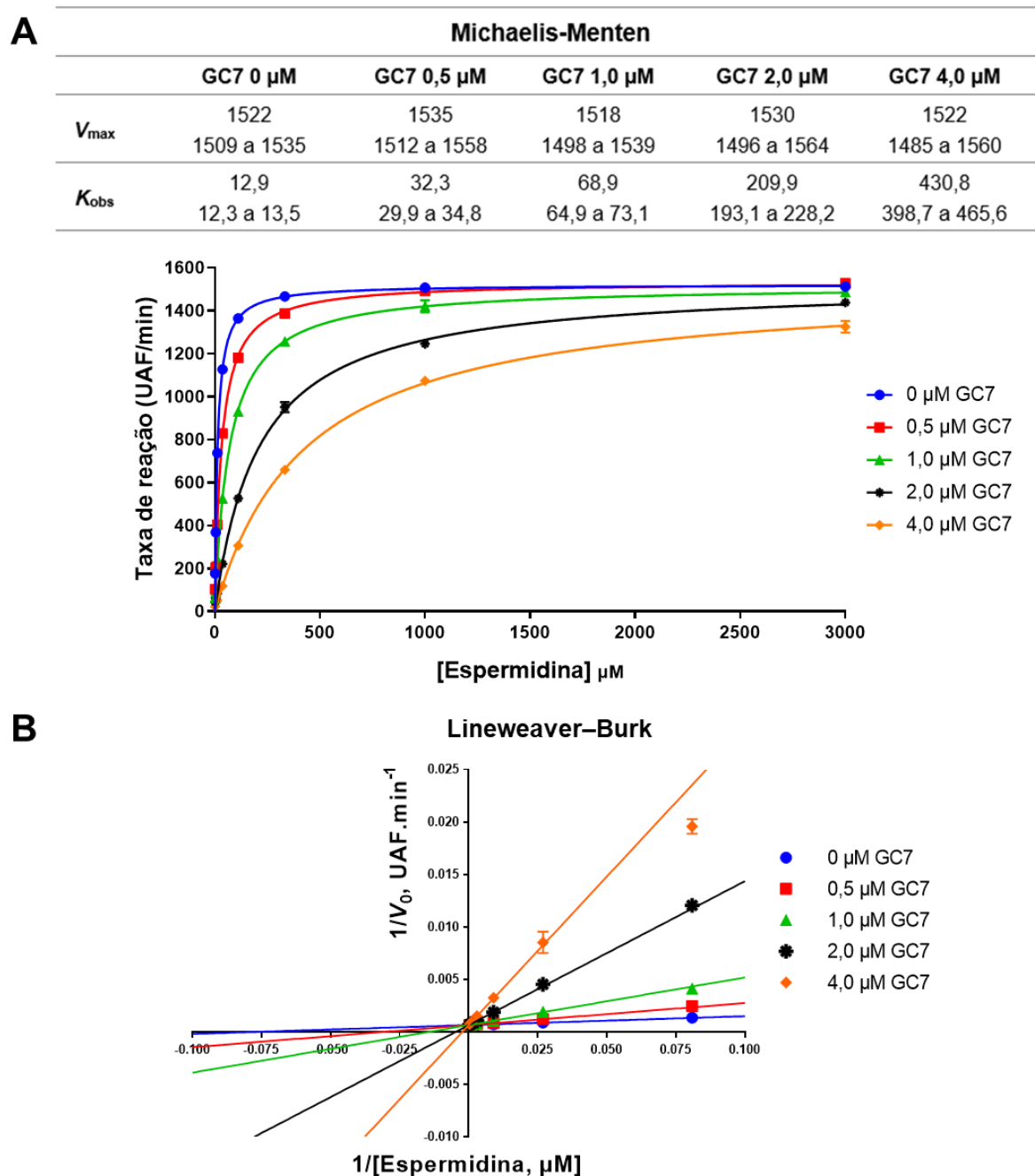
4.26. Análise do perfil de inibição do composto MMV1674024 sobre a LmDHPS

Com o intuito de compreender melhor o mecanismo de inibição do composto MMV1674024 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010, inicialmente foi averiguado se o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH seria capaz de demonstrar um perfil de inibição conhecido. Para isso, foi realizada a titulação da espermidina na presença de concentrações crescentes do GC7, que corresponde a um inibidor competitivo pelo sítio de ligação à espermidina nas DHPSs de mamíferos (JAKUS et al., 1993).

Como inibidores competitivos ligam-se ao mesmo sítio que o substrato na enzima, esta pode se ligar ao substrato ou ao inibidor, mas não a ambos ao mesmo tempo (ALGIERI et al., 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017). Em concentrações muito altas de substrato, o inibidor será deslocado da enzima; portanto, a velocidade máxima (V_{max}) da reação permanece inalterada, entretanto, na presença de inibidores será necessário mais substrato para chegar à V_{max} . Assim, uma quantidade maior de substrato também é necessária para atingir a metade da V_{max} . Portanto, para inibidores competitivos, a V_{max} permanece inalterada, mas o K_m (aqui denominado K_{obs}) é aumentado (KAN et al., 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017).

A Figura 56 a seguir demonstra os resultados obtidos com a titulação da espermidina em concentrações crescentes de GC7 (0 a 4 μM).

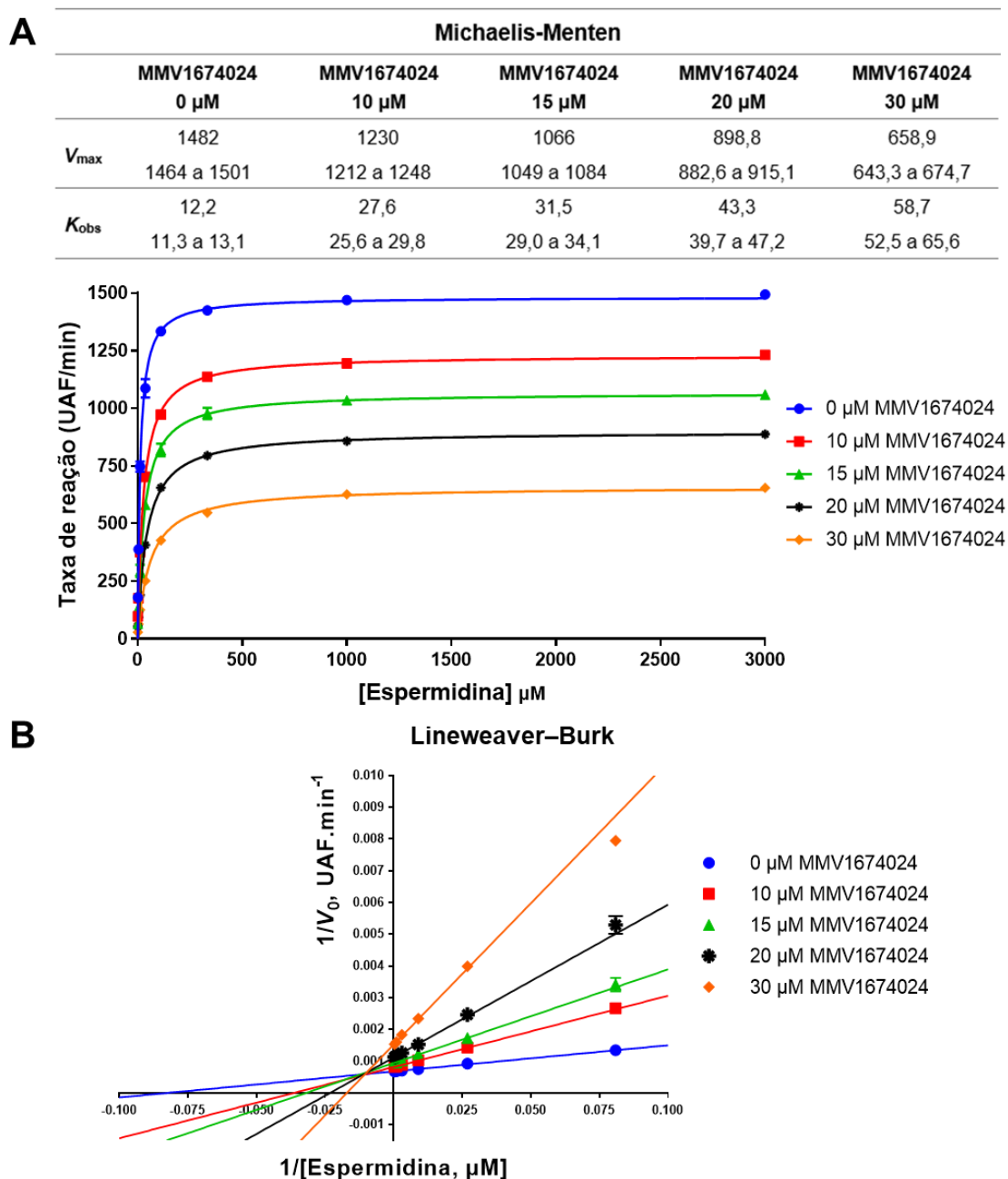
Figura 56. Efeito do GC7 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação de espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (1,37; 4,12; 12,35; 37,04; 111,11; 1000; e 3000 μM) e concentrações fixas de LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (500 nM do tetrâmero) e NAD^+ (150 μM) foram utilizadas para realizar o experimento. **(A)** Os parâmetros K_{obs} e V_{max} foram calculados a partir de uma regressão não linear das taxas de reação iniciais em função da concentração de espermidina ajustadas para a equação de Michaelis-Menten empregando o software GraphPad Prism 8.0. **(B)** Gráfico de Lineweaver-Burk representando o recíproco da velocidade inicial ($1/V_0$) contra o recíproco da concentração da espermidina ($1/[\text{espermidina}]$). As concentrações do GC7 testadas e os valores calculados para o K_{obs} da espermidina e para a V_{max} encontram-se na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Como observado na Figura 56A, o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH foi capaz de demonstrar o padrão de inibição competitiva causada pelo GC7 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010, onde foi observado um aumento progressivo do K_{obs} da espermidina com o aumento da concentração de GC7 no meio reacional, sem haver alteração significativa da V_{max} (RAMSAY; TIPTON, 2017). Esse padrão de inibição competitiva foi confirmado pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 56B), onde é observada a interseção das retas no mesmo ponto no eixo Y, que representa o valor de $1/V_{max}$, indicando que não houve variação nos valores de V_{max} com o aumento da concentração de GC7. Ainda, foi observada a interseção em pontos diferentes no eixo X, que representa $-1/K_{obs}$, indicando um aumento dos valores de K_{obs} com o aumento progressivo da concentração de GC7 (KAN et al., 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017).

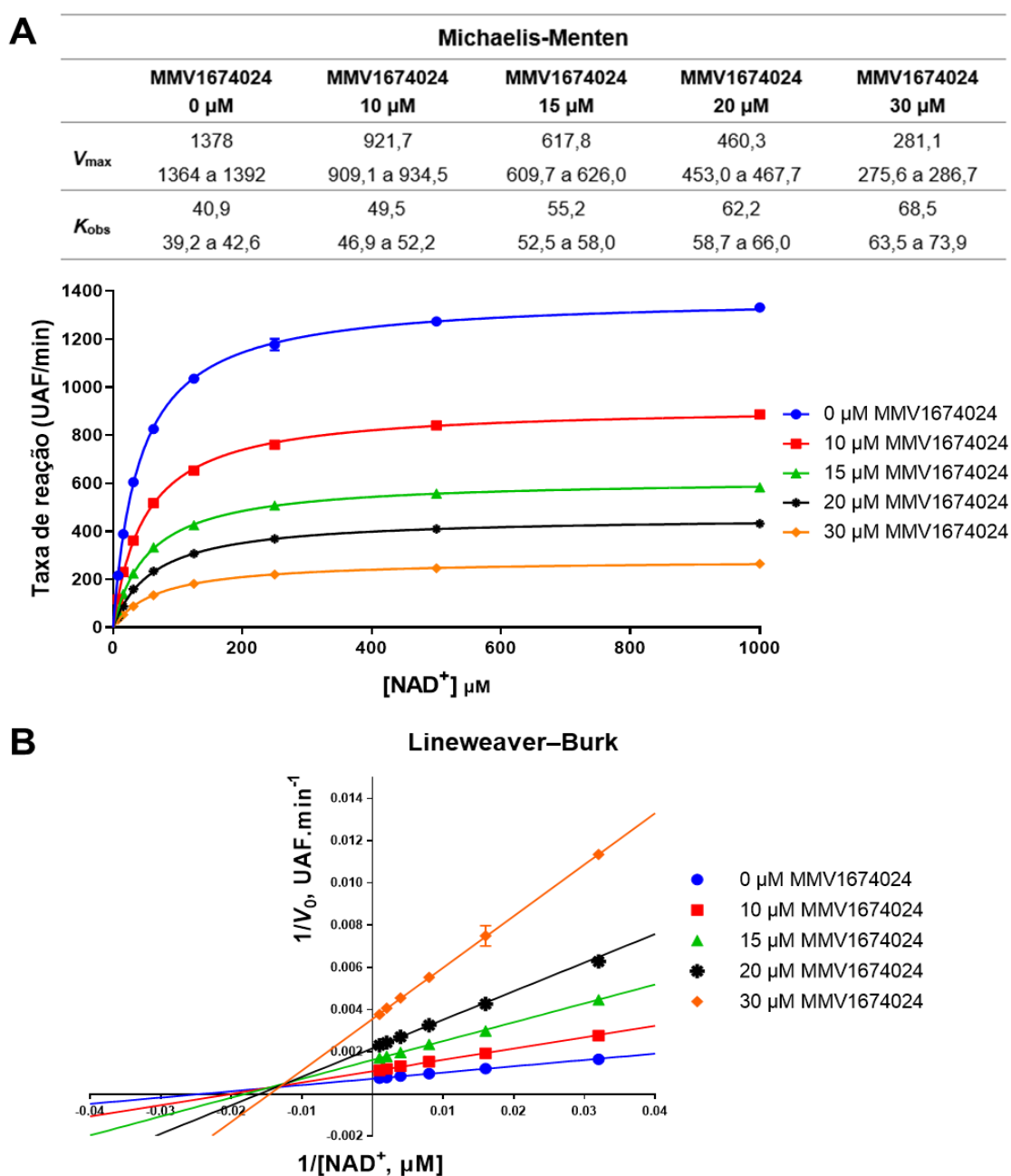
Portanto, como o perfil de inibição do GC7 sobre a LmDHPSAB determinado por esse ensaio foi acurado, o perfil de inibição do composto MMV1674024 sobre a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 também foi investigado. Para isso, foram realizadas as titulações de espermidina e NAD⁺ na presença de concentrações crescentes do inibidor MMV1674024 (0 a 30 μ M). As Figuras 57 e 58 a seguir demonstram os resultados obtidos com esses experimentos.

Figura 57. Efeito do composto MMV1674024 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação de espermidina. Concentrações variáveis de espermidina (1,37; 4,12; 12,35; 37,04; 111,11; 1000; e 3000 μM) e concentrações fixas da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (500 nM do tetrâmero) e de NAD^+ (150 μM) foram utilizadas para realizar o experimento. **(A)** Os parâmetros K_{obs} e V_{max} foram calculados a partir de uma regressão não linear das taxas de reação iniciais em função da concentração de espermidina ajustadas para a equação de Michaelis-Menten empregando o software GraphPad Prism 8.0. **(B)** Gráfico de Lineweaver-Burk representando o recíproco da velocidade inicial ($1/V_0$) contra o recíproco da concentração da espermidina ($1/[\text{espermidina}]$). As concentrações do composto MMV1674024 testadas e os valores calculados para o K_{obs} da espermidina e para a V_{max} encontram-se na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Fonte: autoria própria.

Figura 58. Efeito do composto MMV1674024 sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 durante a titulação do NAD⁺. Concentrações variáveis de NAD⁺ (7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 μ M) e concentrações fixas da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (500 nM do tetrâmero) e da espermidina (100 μ M) foram utilizadas para realizar o experimento. **(A)** Os parâmetros K_{obs} e V_{max} foram calculados a partir de uma regressão não linear das taxas de reação iniciais em função da concentração de espermidina ajustadas para a equação de Michaelis-Menten empregando o software GraphPad Prism 8.0. **(B)** Gráfico de Lineweaver-Burk representando o recíproco da velocidade inicial ($1/V_0$) contra o recíproco da concentração do NAD⁺ ($1/[NAD^+]$). As concentrações do composto MMV1674024 testadas e os valores calculados para o K_{obs} do NAD⁺ e para a V_{max} encontram-se na figura. Os pontos individuais representam a média $\pm$ erro padrão de duplicatas experimentais.



Fonte: autoria própria.

As Figuras 57A e 58A mostram um aumento progressivo do K_{obs} da espermidina e do NAD^+ com o aumento da concentração do composto MMV1674024 no meio reacional, acompanhada pela redução significativa da V_{max} , correspondendo assim a uma inibição do tipo mista tanto para a espermidina quanto para o NAD^+ (RAMSAY; TIPTON, 2017). Esse padrão de inibição mista foi confirmado pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Figuras 57B e 58B), onde é observada a intersecção das retas em pontos diferentes no eixo Y, que representa o valor de $1/V_{max}$, com um aumento progressivo dos valores de intersecção nesse eixo, indicando uma diminuição dos valores de V_{max} com o aumento da concentração do composto MMV1674024. Ainda, foi observada a intersecção em pontos diferentes no eixo X, que representa $-1/K_{obs}$, indicando um aumento dos valores de K_{obs} com o aumento da concentração do composto MMV1674024 (KAN et al., 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017; REILAND; ECKROAT, 2022). Ainda, a intersecção das linhas está localizada acima do eixo da abcissa e à esquerda do eixo da ordenada, o que corresponde a um padrão de inibição mista. Os valores dos K_i calculados para o composto MMV1674024 durante a titulação da espermidina e do NAD^+ foram de 5,01 (3,91 a 6,50) μM e 7,82 (5,36 a 12,11) μM , respectivamente.

A inibição mista representa o caso em que o inibidor pode se ligar tanto à enzima livre (competitiva) quanto ao complexo enzima-substrato (não competitiva) (ALGIERI et al., 2021; HUANG et al., 2021; KAN et al., 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017). Tal composto se comportaria como uma mistura de um inibidor competitivo e não competitivo, daí o termo inibição mista (RAMSAY; TIPTON, 2017). O efeito competitivo aumentará o K_m , enquanto o efeito não competitivo diminuirá tanto o K_m quanto a V_{max} . O resultado líquido desses efeitos dependerá se o inibidor tem mais afinidade pela enzima livre ou pelo complexo enzima-substrato. O valor de K_m será aumentado se o inibidor apresentar maior afinidade pela enzima livre do que pelo complexo enzima-substrato, enquanto no caso inverso, o K_m será diminuído. A V_{max} diminui em todos os casos (AGNARELLI et al., 2023; KAN et al., 2021; RAMSAY; TIPTON, 2017; SUN et al., 2022). Como foi observado um aumento nos K_{obs} , provavelmente o composto MMV1674024 apresenta uma maior afinidade pela LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 livre.

Para elucidar o mecanismo de inibição do composto YT-11g sobre a atividade da HsDHPS, Tanaka e colaboradores determinaram perfil de atividade inibitória desse inibidor na presença de concentrações únicas altas de NAD^+ e espermidina (TANAKA

et al., 2020a). Esse composto foi menos potente em concentrações mais altas de NAD⁺ e espermidina em relação às concentrações normais, indicando que o YT-11g poderia ocupar competitivamente os sítios de ligação do NAD⁺ e da espermidina (TANAKA et al., 2020a). Entretanto, foi demonstrado nesse mesmo trabalho que o composto YT-11g se liga a um sítio alostérico da HsDHPS, causando uma mudança drástica na estrutura secundária dessa proteína, que culmina com uma alteração nos sítios de ligação ao NAD⁺ e à espermidina, gerando uma redução na afinidade de ligação da HsDHPS tanto para o NAD⁺ quanto para a espermidina, independentemente de sua característica de ligação alostérica (TANAKA et al., 2020a).

Cabe aqui destacar que Tanaka e colaboradores testaram uma única concentração alta de NAD⁺ e espermidina e chegaram a essa conclusão de um perfil de inibição competitiva do composto YT-11g em relação ao NAD⁺ e à espermidina, sendo que em nenhum momento os valores de V_{max} das reações foram considerados. Neste sentido, essa inibição pode ser na verdade mista ao invés de competitiva, assim como observado para o composto MMV1674024 em relação à LmDHPSAB, podendo este corresponder a um inibidor alostérico das *Leishmania sp.* DHPSs.

Essa possibilidade de inibição alostérica é muito interessante, pois, conforme descrito anteriormente no presente trabalho, a descoberta de inibidores alostéricos para a HsDHPS representou um avanço muito importante para o desenvolvimento de moléculas promissoras para o tratamento de câncer (LIU et al., 2021a; TANAKA et al., 2020a, 2020b). Além disso, visar sítios alostéricos corresponde a uma estratégia validada para alcançar a seletividade de homólogos (HEWITT et al., 2017; WU; CLAUSEN; NIELSEN, 2015).

No caso da HsDHPS, alguns inibidores descritos previamente apresentam semelhança estrutural com a espermidina, o substrato dessa enzima (JAKUS et al., 1993; LEE; FOLK, 1998; SCHROEDER et al., 2014). Dentre eles, o GC7, o inibidor da HsDHPS mais pesquisado, inibe competitivamente a ligação da espermidina à HsDHPS e mostra um efeito antiproliferativo em várias linhagens celulares cancerosas em cultura (CHEN et al., 1996; JAKUS et al., 1993; SHI et al., 1996). Entretanto, embora o GC7 tenha sido descoberto há 30 anos, faltam informações na literatura sobre ensaios clínicos para esse composto (LIU et al., 2021a). Isso pode ser devido à estrutura semelhante à espermidina e às propriedades de ligação não seletiva de GC7 (TANAKA et al., 2020b).

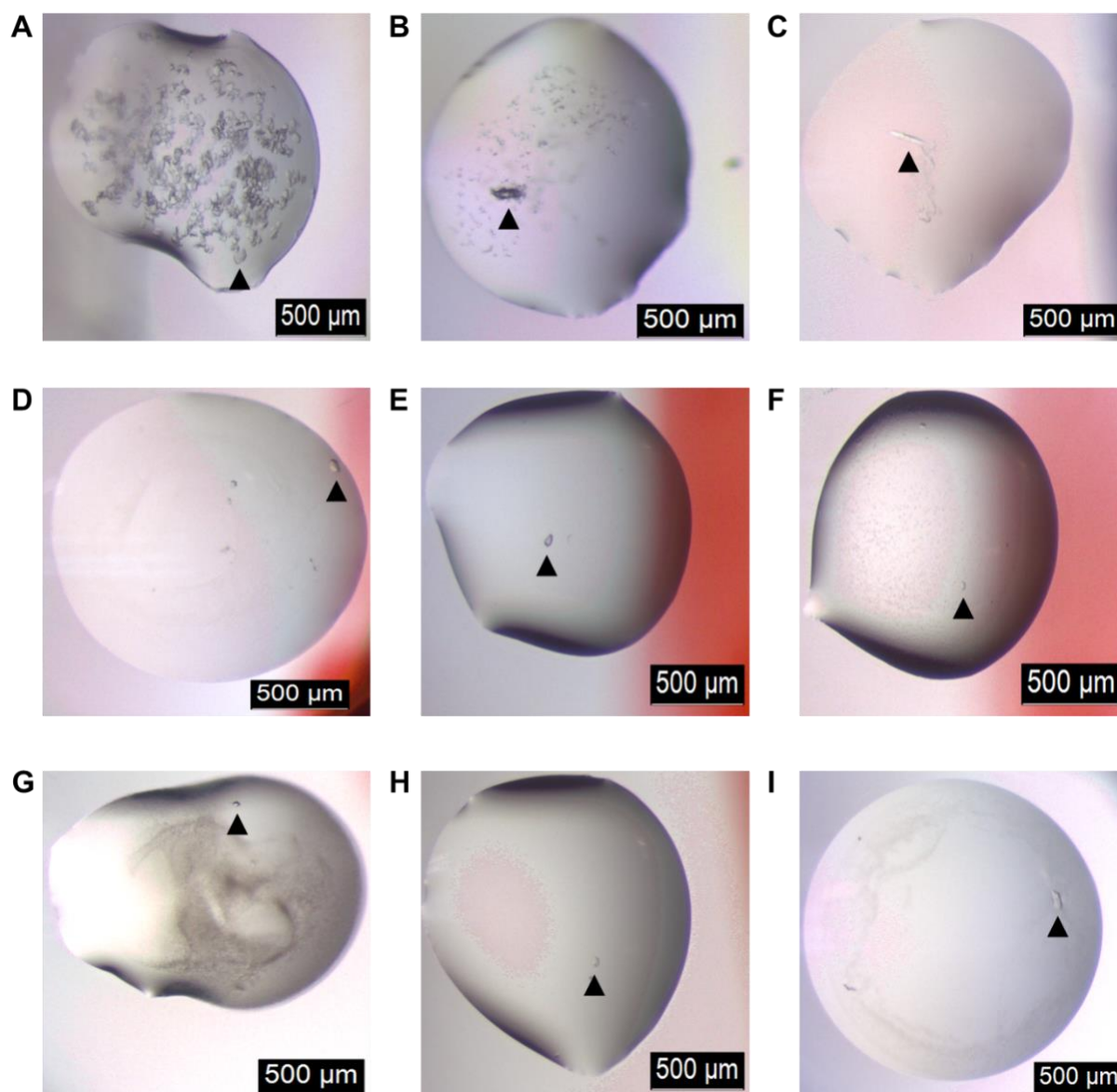
Portanto, para confirmar se o composto MMV1674024 se liga a um sítio de ligação alostérico nas *Leishmania* sp. DHPs, foram realizadas triagens de cocristalização com esse composto e a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 (descrito no tópico seguinte).

4.27. Ensaios de cocristalização com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010, NAD⁺ e o composto MMV1674024

Como o composto MMV1674024 teve a inibição sobre a atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 confirmada pelo ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH, sendo este inibidor um dos mais potentes até o momento, foram realizados ensaios de cocristalização com a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 na presença de NAD⁺ e do composto MMV1674024, ou apenas na presença do composto MMV1674024, utilizando *kits* de cristalização comerciais disponíveis no CQMED, com o intuito de descobrir o sítio de ligação deste composto na LmDHPS, o que pode guiar as etapas de otimização dessa molécula para aumentar sua potência de inibição sobre a LmDHPS.

Os cristais foram obtidos apenas na presença de NAD⁺ e do composto MMV1674024, nas seguintes condições: (A) PEG *Smear Medium* 22,5%, citrato 0,1 M pH 5,5, sulfato de amônio 0,1M e sulfato de magnésio 0,05 M; (B) 2-propanol 30%, HEPES 0,1 M pH 7,5 e cloreto de magnésio 0,2 M; (C) PEG200 50%, cloreto de sódio 0,2 M e fosfato de sódio/potássio 0,1 M; (D) MPD 60% e HEPES 0,1 M pH 7,5; (E) PEG *Smear Low* 16%, HEPES 0,1 M pH 7,5, cloreto de potássio 0,1 M e etilenoglicol 5%; (F) Nitrato de sódio 0,09 M, fosfato de sódio 0,09 M, sulfato de amônio 0,09 M, imidazol 0,1 M pH 6,5, MES 0,1 M pH 6,5, etilenoglicol 20% e PEG 8000 10%; (G) DL-ácido glutâmico 0,1 M, DL-alanina 0,1 M, glicina 0,1 M, DL-lisina 0,1 M, DL-serina, imidazol 0,1 M pH 6,5, MES 0,1 M pH 6,5, etilenoglicol 20% e PEG 8000 10%; (H) PEG *Smear Low* 16%, HEPES 0,1 M pH 7,5, cloreto de potássio 0,1 M e etilenoglicol 5%; (I) MPD 60% e MIB (ácido malônico + imidazol + ácido bórico) 0,1 M pH 8,0 (Figura 59).

Figura 59. Cristais obtidos para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 na presença de NAD⁺ e MMV1674024. Os melhores cristais foram obtidos nas seguintes condições: **(A)** PEG *Smear Medium* 22,5%, citrato 0,1 M pH 5,5, sulfato de amônio 0,1M e sulfato de magnésio 0,05 M. **(B)** 2-propanol 30%, HEPES 0,1 M pH 7,5 e cloreto de magnésio 0,2 M. **(C)** PEG200 50%, cloreto de sódio 0,2 M e fosfato de sódio/potássio 0,1 M. **(D)** MPD 60% e HEPES 0,1 M pH 7,5. **(E)** PEG *Smear Low* 16%, HEPES 0,1 M pH 7,5, cloreto de potássio 0,1 M e etilenoglicol 5% **(F)** Nitrato de sódio 0,09 M, fosfato de sódio 0,09 M, sulfato de amônio 0,09 M, imidazol 0,1 M pH 6,5, MES 0,1 M pH 6,5, etilenoglicol 20% e PEG 8000 10%. **(G)** DL-ácido glutâmico 0,1 M, DL-alanina 0,1 M, glicina 0,1 M, DL-lisina 0,1 M, DL-serina, imidazol 0,1 M pH 6,5, MES 0,1 M pH 6,5, etilenoglicol 20% e PEG 8000 10%. **(H)** PEG *Smear Low* 16%, HEPES 0,1 M pH 7,5, cloreto de potássio 0,1 M e etilenoglicol 5%. **(I)** MPD 60% e MIB (ácido malônico + imidazol + ácido bórico) 0,1 M pH 8,0. As setas indicam os cristais selecionados para a coleta de dados de difração por raios X.



Fonte: autoria própria.

Como os cristais obtidos eram pequenos, os mesmos não difrataram durante a coleta de dados de difração por raios X. Na tentativa de obter cristais maiores, também foram realizadas tentativas de otimização das condições em que foram obtidos cristais, variando-se as concentrações de todos os componentes da solução reservatório. Entretanto, essas tentativas não foram bem-sucedidas.

As informações estruturais relativas ao complexo proteína-ligante podem fornecer muitos benefícios, como a confirmação do sítio de ligação e modo de ligação de um composto, o que é particularmente importante para sítios de ligação novos/alostéricos; principais interações proteína-ligante; propriedades do sítio de ligação e oportunidades para crescimento adicional da molécula ligante (MURRAY; REES, 2009; WALSH et al., 2023).

Entretanto, a cristalografia de raios X apresenta algumas desvantagens, tais como: a determinação da estrutura de novas proteínas pode ser extremamente desafiadora e demorada, o que pode não ser adequado para as escalas de tempo de um projeto; certos tipos de proteínas podem não ser passíveis de cristalização (WALSH et al., 2023), como foi o caso da LmDHPS até o momento. Nesses casos mais difíceis, a criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM) poderia ser empregada no futuro para dar continuidade aos estudos estruturais com as *Leishmania sp.* DHPSs.

5. CONCLUSÕES

Com a finalidade de determinar a estrutura tridimensional das DHPSS de diferentes organismos patogênicos causadores de doenças tropicais negligenciadas e buscar inibidores para essas enzimas por meio de um *high-throughput screening in vitro* de inibidores, inicialmente foram projetadas 31 construções de DNA: três para a PbDHPSA; 16 para a HcDHPSA; quatro para a BmDHPSA e oito para a LmDHPS (quatro para cada isoforma). Foram obtidos amplicons para todas as construções planejadas. Estes foram posteriormente clonados no vetor de expressão em *E. coli* pNIC28-Bsa4 via LIC. Ainda, 26 dessas construções foram expressas em pequena escala. Dentre estas, foi realizado o aumento da escala de produção para seis construções de três organismos: *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. malayi*, sendo que uma das construções correspondia à proteína *full-length* e a outra uma forma truncada da DHPS. Além disso, as versões *full-length* dessas DHPSS purificadas apresentaram a massa molecular esperada, conforme determinado por espectrometria de massa intacta.

Foi estabelecimento um ensaio bioquímico fácil de ser miniaturizado e de baixo custo para a HcDHPSA, BmDHPSA e PbDHPSA, sendo que os valores de IC₅₀ para o GC7 obtidos nesse ensaio (9 nM para HcDHPSA, 28 nM para BmDHPSA e 61 nM para PbDHPSA) estão em concordância com os valores de IC₅₀ descritos para as DHPSS de mamíferos.

As construções *full-length* da BmDHPS e da HcDHPS produziram cristais que difrataram bem, sendo as estruturas cristalográficas resolvidas com uma resolução de 2,3 Å e 2,1 Å, respectivamente. No entanto, as estruturas cristalográficas da BmDHPSA e a HcDHPSA mostraram que essas enzimas possuem uma arquitetura semelhante à enzima humana, o que pode dificultar o desenvolvimento de inibidores seletivos direcionados para as DHPSS desses patógenos (SILVA et al., 2020). Em contraste, os parálogos de *Leishmania sp.* provavelmente formam um complexo heterotetramérico e têm um mecanismo regulador distinto em comparação com a enzima humana (SILVA et al., 2020). Assim, o desenvolvimento de inibidores seletivos para as *Leishmania sp.* DHPSS pode ser uma tarefa factível.

Combinando uma série de estratégias, como por exemplo, a clonagem das DHPSS de várias espécies de *Leishmania* associada à fusão com diferentes *tags*; produção de proteína por autoindução; lise combinada das duas isoformas das

Leishmania sp. DHPs na presença de L-arginina e de L-ácido glutâmico, foi finalmente possível produzir a LdDHPSA e a LmDHPSA na forma solúvel e ativa em *E. coli*. No caso, as LdDHPSs (LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002) clonadas no plasmídeo pAVA-MBP e produzidas em um meio de autoindução de proteínas apresentou o melhor rendimento (1,9 mg de LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 por L de cultura). Portanto, foi desenvolvido um protocolo para produção e purificação de *Leishmania* sp. DHPs solúveis e ativas, abrindo o caminho para uma caracterização mais aprofundada dessas enzimas.

O ensaio enzimático *in vitro* mostrou que as duas isoformas da LdDHPS não são ativas quando testadas separadamente, o que contrasta com um trabalho anterior com essas enzimas que afirmou que a isoforma A era levemente ativa por si só, a isoforma B era inativa e que a mistura das duas isoformas não aumentou a atividade dessas enzimas (CHAWLA et al., 2010). O fato das LdDHPSs só apresentarem atividade quando combinadas reforça a hipótese de que a LdDHPSA e a LdDHPSB se associam para formar um heterocomplexo, como demonstrado para a DHP de *T. brucei* (AFANADOR; TOMCHICK; PHILLIPS, 2018).

O ensaio enzimático *in vitro* baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial das DHPs, previamente descrito por nosso grupo de pesquisa como um ensaio bioquímico pronto para campanhas HTS para a identificação de novos inibidores para as DHPs não funcionou para a descoberta de inibidores para a LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 devido à interferência da autofluorescência dos compostos testados. No entanto, um método alternativo, que emprega a reação parcial das LdDHPSs acoplado ao ensaio NAD⁺/NADH-Glo™, foi utilizado para superar esse problema. Dos 26771 compostos inicialmente testados utilizando este ensaio acoplado, 44 compostos (*hits*) inibiram a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 em mais de 60%, representando uma taxa de acerto de 0,16%. Uma triagem secundária confirmou que 24 (57%) dos *hits* exibiram efeitos inibitórios consistentes (inibição maior do que 60%) sobre a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002.

Depois de excluir os *hits* que também inibiram as enzimas do ensaio NAD⁺/NADH-Glo™, os 13 compostos que mostraram inibição sobre a atividade da LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 e pouca ou nenhuma inibição sobre a atividade das enzimas do ensaio NAD⁺/NADH-Glo™ foram analisados quanto à concentração-resposta pelo mesmo ensaio acoplado. Nove desses 13 compostos apresentaram

IC₅₀ contra LdDHPSA-cb002+LdDHPSB-cb002 na faixa micromolar baixa. Portanto, foi estabelecido um ensaio bioquímico aplicável para ensaios HTS capaz de identificar novos inibidores promissores para as *Leishmania sp.* DHPSS.

Dentre os *hits* do HTS, os compostos MMV1674024 e MMV904563 se apresentaram como os compostos com um maior potencial para futuras otimizações para melhorar a potência de inibição sobre a atividade das *Leishmania sp.* DHPSS. Assim, esses compostos podem servir como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos para combater a leishmaniose. Além disso, os dados *in vitro* sugerem que a inibição das *Leishmania sp.* DHPSS sem afetar a DHPS humana é uma tarefa viável, confirmando a hipótese de que a DHPS corresponde a um alvo interessante para ser explorado em *Leishmania sp.*

Devido a diferenças de infraestrutura disponível, tais como o emprego de um método diferente de indução da expressão de proteínas em *E. coli* (autoindução), que utiliza um meio de cultura específico e um sistema de crescimento diferente (LEX *biorreactor*), não foi possível reproduzir o rendimento da purificação das LdDHPSs obtidos durante o período de BEPE no laboratório do Dr. Wesley Van Voorhis (Universidade de Washington). Por isso, os experimentos seguintes foram realizados com as LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 purificadas em combinação, utilizando um tampão de lise acrescido de L-arginina 50 mM, L-ácido glutâmico 50 mM e detergente CHAPS 0,5%. Com isso, o rendimento da purificação das LmDHPSs foi de 0,9 mg de proteína por L de cultura, totalizando 22 mg de proteína purificada. Essa quantidade de proteína foi suficiente para realizar a padronização do ensaio *in vitro* baseado na detecção da fluorescência do NADH e as triagens de cocristalização.

Utilizando o leitor de placas disponível no Brasil (CQMED da UNICAMP), foi possível empregar o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH gerado pela reação parcial das DHPSS, para confirmar a inibição dos compostos MMV1674024 e MMV1732934 sobre a atividade da LmDHPSAB. Os valores de IC₅₀ obtidos para os compostos MMV1674024 e MMV1732934 contra a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 foram 17,3 e 131,3 µM, respectivamente. Esses valores foram maiores do que os IC₅₀ obtidos para esses compostos empregando o ensaio de luminescência NAD⁺/NADH-Glo. Apesar dos valores maiores, a inibição da atividade da LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 foi confirmada por um segundo tipo de ensaio e se manteve significativamente maior do que a inibição da atividade da HsDHPS. Ainda, empregando o ensaio baseado na detecção da fluorescência do NADH, foi

possível determinar que o composto MMV1674024 exerce uma inibição sobre a atividade da LmDHPSAB do tipo mista em relação ao NAD⁺ e à espermidina.

Finalmente, foram obtidos cristais para a LmDHPSA-cb018+LmDHPSB-cb010 apenas quando preparada na presença de NAD⁺ e do composto MMV1674024. Entretanto, esses cristais eram pequenos e não difrataram durante a coleta de dados de difração por raios X. Também foram realizadas tentativas de otimização das condições de cristalização que originaram cristais, variando-se as concentrações de todos os componentes da solução reservatório, na tentativa de obter cristais maiores. Todavia essas tentativas não foram bem-sucedidas. Considerando o tamanho das *Leishmania sp.* DHPSs (aproximadamente 200 kDa), futuros ensaios de Cryo-EM podem ser realizados para determinar a estrutura dessas proteínas.

6. REFERÊNCIAS

- AFANADOR, G. A.; TOMCHICK, D. R.; PHILLIPS, M. A. Trypanosomatid Deoxyhypusine Synthase Activity Is Dependent on Shared Active-Site Complementation between Pseudoenzyme Paralogs. **Structure**, v. 26, n. 11, p. 1499- 1512.e5, nov. 2018.
- AGNARELLI, A. et al. The Inhibitory Properties of a Novel, Selective LMTK3 Kinase Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 865, 3 jan. 2023.
- AKINOKUN, R. T. et al. The status of neglected tropical diseases amidst COVID-19 in Africa: Current evidence and recommendations. **Health Promotion Perspectives**, v. 11, n. 4, p. 430–433, 19 dez. 2021.
- AL JALALI, V.; ZEITLINGER, M. Systemic and Target-Site Pharmacokinetics of Antiparasitic Agents. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, n. 7, p. 827–847, jul. 2020.
- ALGIERI, C. et al. The inhibition of gadolinium ion (Gd³⁺) on the mitochondrial F1FO-ATPase is linked to the modulation of the mitochondrial permeability transition pore. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 250–258, ago. 2021.
- AMELIA, T. et al. Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 3, 26 jan. 2022.
- ANDERSON, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 9, p. 787–797, set. 2003.
- AROONSRI, A. et al. Validation of *Plasmodium falciparum* deoxyhypusine synthase as an antimalarial target. **PeerJ**, v. 7, p. e6713, 17 abr. 2019.
- AROONSRI, A. et al. Investigation of an Allosteric Deoxyhypusine Synthase Inhibitor in *P. falciparum*. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2463, 11 abr. 2022.
- AULD, D. S.; INGLESE, J. Interferences with Luciferase Reporter Enzymes. Em: MARKOSSIAN, S. et al. (Eds.). **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. [s.l: s.n.].
- BANDINO, A. et al. Deoxyhypusine synthase (DHPS) inhibitor GC7 induces p21/Rb-mediated inhibition of tumor cell growth and DHPS expression correlates with poor prognosis in neuroblastoma patients. **Cellular Oncology**, v. 37, n. 6, p. 387–398, dez. 2014.
- BANGERT, M. et al. The cross-cutting contribution of the end of neglected tropical diseases to the sustainable development goals. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 73, 4 dez. 2017.
- BARBA-ALIAGA, M.; ALEPUZ, P. Role of eIF5A in Mitochondrial Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1284, 24 jan. 2022.
- BENNE, R.; HERSHEY, J. W. B. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 9, p. 3078–3087, 1978.
- BILSLAND, E. et al. Yeast-Based High-Throughput Screens to Identify Novel Compounds Active against *Brugia malayi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004401, 26 jan. 2016.

BLAHA, G.; STANLEY, R. E.; STEITZ, T. A. Formation of the First Peptide Bond: The Structure of EF-P Bound to the 70 S Ribosome. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 966–970, 21 ago. 2009.

BLANEY, J. A very short history of structure-based design: how did we get here and where do we need to go? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 1, p. 13–14, 11 jan. 2012.

BOUROUROU, M. et al. Inhibition of eIF5A hypusination pathway as a new pharmacological target for stroke therapy. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 41, n. 5, p. 1080–1090, 2 maio 2021.

BROOKER, S. J. et al. Neglected tropical disease control in a world with COVID-19: an opportunity and a necessity for innovation. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 115, n. 3, p. 205–207, 6 mar. 2021.

BROWN, D. G.; SHOTTON, E. J. Diamond: shedding light on structure-based drug discovery. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 373, n. 2036, p. 20140468, 6 mar. 2015.

BRYAN, C. M. et al. High-throughput protein production and purification at the Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, n. 9, p. 1010–1014, 1 set. 2011.

BURGESS-BROWN, N. A. et al. Medium-Throughput Production of Recombinant Human Proteins: Protein Production in *E. coli*. Em: [s.l: s.n.]. p. 73–94.

BURLEY, S. K. Impact of structural biologists and the Protein Data Bank on small-molecule drug discovery and development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100559, jan. 2021.

BUTT, T. R. et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 43, n. 1, p. 1–9, set. 2005.

CARR, R. A. E. et al. Fragment-based lead discovery: leads by design. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 14, p. 987–992, jul. 2005.

CHATTERJEE, I. et al. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, n. 3, p. 264–276, 12 mar. 2006.

CHAWLA, B. et al. Identification and Characterization of a Novel Deoxyhypusine Synthase in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 453–463, jan. 2010.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 8 abr. 2010.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y.-C. Biochemistry and Function of Hypusine Formation on Eukaryotic Initiation Factor 5A. **Neurosignals**, v. 6, n. 3, p. 105–109, 1997.

CHEN, V. B. et al. *MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 1 jan. 2010.

CHEN, Z. P. et al. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Letters**, v. 105, n. 2, p. 233–239, ago. 1996.

CHOI, R. et al. Immobilized metal-affinity chromatography protein-recovery screening is predictive of crystallographic structure success. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, n. 9, p. 998–1005, set. 2011.

CHOI, R. et al. High-throughput screening of the ReFRAME, Pandemic Box, and COVID Box drug repurposing libraries against SARS-CoV-2 nsp15 endoribonuclease to identify small-molecule inhibitors of viral activity. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. e0250019, 22 abr. 2021.

CLEMENT, P. M. J. et al. The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. **International Journal of Cancer**, v. 100, n. 4, p. 491–498, 1 ago. 2002.

CLEMENT, P. M. J. et al. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. **FEBS Journal**, v. 273, n. 6, p. 1102–1114, mar. 2006.

CONGREVE, M. et al. A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery? **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 876–877, out. 2003.

CONGREVE, M. et al. Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 13, p. 3661–3680, jul. 2008.

CONI, S. et al. Blockade of EIF5A hypusination limits colorectal cancer growth by inhibiting MYC elongation. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 12, p. 1045, 10 dez. 2020.

CONS, B. D. et al. Electrostatic Complementarity in Structure-Based Drug Design: Miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 7476–7488, 9 jun. 2022.

COUGNON, M. et al. Inhibition of eIF5A hypusination reprogrammes metabolism and glucose handling in mouse kidney. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 4, p. 283, 17 abr. 2021.

COUÑAGO, R. M. et al. Structural characterization of human Vaccinia-Related Kinases (VRK) bound to small-molecule inhibitors identifies different P-loop conformations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7501, 8 dez. 2017.

CRAIG, J. K. et al. Mycobacterium Cytidylate Kinase Appears to Be an Undruggable Target. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 21, n. 7, p. 695–700, 1 ago. 2016.

DA CONCEIÇÃO, J. R. et al. Neglected tropical diseases and systemic racism especially in Brazil: from socio-economic aspects to the development of new drugs. **Acta Tropica**, v. 235, p. 106654, nov. 2022.

D'AGOSTINO, M. et al. Insights Into the Binding Mechanism of GC7 to Deoxyhypusine Synthase in *Sulfolobus solfataricus*: A Thermophilic Model for the Design of New Hypusination Inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 609942, 17 dez. 2020.

DAI, W. et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 368, n. 6497, p. 1331–1335, 19 jun. 2020.

DE OLIVEIRA, R. G. et al. Chagas Disease Drug Discovery in Latin America—A Mini Review of Antiparasitic Agents Explored Between 2010 and 2021. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 771143, 28 out. 2021.

DE SOUSA, N. F. et al. Selene-Ethylenelacticamides and N-Aryl-Propanamides as Broad-Spectrum Leishmanicidal Agents. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 136, 13 jan. 2023.

DEVER, T. E.; GUTIERREZ, E.; SHIN, B.-S. The hypusine-containing translation factor eIF5A. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 5, p. 413–425, 17 set. 2014.

DEVER, T. E.; IVANOV, I. P. Roles of polyamines in translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18719–18729, nov. 2018.

EHRENBERG, J. P. et al. Strategies supporting the prevention and control of neglected tropical diseases during and beyond the COVID-19 pandemic. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 86, dez. 2020.

EHRENBERG, J. P. et al. Efforts to mitigate the economic impact of the COVID-19 pandemic: potential entry points for neglected tropical diseases. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 2, dez. 2021.

EISENSTEIN, M. Overlooked and underfunded: neglected diseases exert a toll. **Nature**, v. 598, n. 7882, p. S20–S22, 28 out. 2021.

ELPHICK-POOLEY, T.; ENGELS, D. World NTD Day 2022 and a new Kigali Declaration to galvanise commitment to end neglected tropical diseases. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 11, n. 1, p. 2, 28 dez. 2022.

EL-SAYED, A.; KAMEL, M. Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 18, p. 22336–22352, jun. 2020.

EMSLEY, P. et al. Features and development of *Coot*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 1 abr. 2010.

FANG, X. et al. Recent Advances in Design of Fluorescence-Based Assays for High-Throughput Screening. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 482–504, 2 jan. 2019.

FATTORI, D.; SQUARCIA, A.; BARTOLI, S. Fragment-Based Approach to Drug??Lead Discovery: Overview and Advances in Various Techniques. **Drugs in R & D**, v. 9, n. 4, p. 217–227, 2008.

FAUNDES, V. et al. Impaired eIF5A function causes a Mendelian disorder that is partially rescued in model systems by spermidine. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 833, dez. 2021.

FERREIRA, L. L. G.; DE MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2278–2287, ago. 2022.

FICHES, G. N. et al. Polyamine biosynthesis and eIF5A hypusination are modulated by the DNA tumor virus KSHV and promote KSHV viral infection. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 4, p. e1010503, 29 abr. 2022.

FIORAVANTI, R. et al. Targeting histone acetylation/deacetylation in parasites: an update (2017–2020). **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 57, p. 65–74, ago. 2020.

FREEMAN-COOK, K. D.; HOFFMAN, R. L.; JOHNSON, T. W. Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 113–115, fev. 2013.

GILEADI, O. et al. High Throughput Production of Recombinant Human Proteins for Crystallography. Em: **Structural Proteomics**. [s.l: s.n.]. p. 221–246.

GLEESON, M. P. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 817–834, 1 fev. 2008.

GLEESON, M. P. et al. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 197–208, mar. 2011.

GOBERT, A. P. et al. Hypusination Orchestrates the Antimicrobial Response of Macrophages. **Cell Reports**, v. 33, n. 11, p. 108510, dez. 2020.

GOLOVANOV, A. P. et al. A Simple Method for Improving Protein Solubility and Long-Term Stability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 8933–8939, 1 jul. 2004.

GREMME, G. et al. Engineering a software tool for gene structure prediction in higher organisms. **Information and Software Technology**, v. 47, n. 15, p. 965–978, dez. 2005.

GRIFFITH, D. A. et al. Discovery of 1-[9-(4-Chlorophenyl)-8-(2-chlorophenyl)-9 H -purin-6-yl]-4-ethylaminopiperidine-4-carboxylic Acid Amide Hydrochloride (CP-945,598), a Novel, Potent, and Selective Cannabinoid Type 1 Receptor Antagonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 234–237, 22 jan. 2009.

GUTIERREZ, E. et al. eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. **Molecular Cell**, v. 51, n. 1, p. 35–45, jul. 2013.

HANAUSKE-ABEL, H. M. et al. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1221, n. 2, p. 115–124, mar. 1994.

HANIF, H. et al. Quercetin nano phytosome: as a novel anti-leishmania and anti-malarial natural product. **Journal of Parasitic Diseases**, 12 jan. 2023.

HAO, F. et al. EIF5A2 Is Highly Expressed in Anaplastic Thyroid Carcinoma and Is Associated With Tumor Growth by Modulating TGF- Signals. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 345–355, 1 set. 2020.

HAUBER, I. et al. Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p. 76–85, 3 jan. 2005.

HEDHAMMAR, M.; HOBBER, S. Zbasic—A novel purification tag for efficient protein recovery. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1–2, p. 22–28, ago. 2007.

HERSHEY, J. W. B.; SONENBERG, N.; MATHEWS, M. B. Principles of Translational Control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 9, p. a032607, set. 2019.

HEWITT, S. N. et al. Expression of proteins in Escherichia coli as fusions with maltose-binding protein to rescue non-expressed targets in a high-throughput protein-expression and purification pipeline. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, n. 9, p. 1006–1009, 1 set. 2011.

HEWITT, S. N. et al. Biochemical and structural characterization of selective allosteric inhibitors of the *Plasmodium falciparum* drug target, prolyl-tRNA-synthetase. **ACS Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 34–44, 13 jan. 2017.

HOMMES, D. et al. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 7–14, jan. 2002.

HOPKINS, A. L. et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 105–121, fev. 2014.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 430–431, maio 2004.

HOQUE, M. et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 90, dez. 2009.

HOTEZ, P. J. et al. World neglected tropical diseases day. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007999, 29 jan. 2020.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. The new COVID-19 poor and the neglected tropical diseases resurgence. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 10, s40249-020-00784–2, dez. 2021.

HOTEZ, P. J.; PECOUL, B. “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, p. e718, 25 maio 2010.

HUANG, S. et al. A novel class of selective non-nucleoside inhibitors of human DNA methyltransferase 3A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 40, p. 127908, maio 2021.

IMAM, S. et al. eIF5A inhibition influences T cell dynamics in the pancreatic microenvironment of the humanized mouse model of Type 1 Diabetes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1533, 7 dez. 2019.

IVANOV, I. P. et al. Polyamine Control of Translation Elongation Regulates Start Site Selection on Antizyme Inhibitor mRNA via Ribosome Queuing. **Molecular Cell**, v. 70, n. 2, p. 254–264.e6, abr. 2018.

JABEEN, I. et al. Structure–Activity Relationships, Ligand Efficiency, and Lipophilic Efficiency Profiles of Benzophenone-Type Inhibitors of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 3261–3273, 12 abr. 2012.

JACOBSEN, K. H. et al. A call for loiasis to be added to the WHO list of neglected tropical diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p. e299–e302, out. 2022.

JAIN, S. et al. Metabolic Pathways of Leishmania Parasite: Source of Pertinent Drug Targets and Potent Drug Candidates. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 1590, 30 jul. 2022.

JAKUS, J. et al. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13151–13159, jun. 1993.

JAMSHAD, H.; DIN, F. UD; KHAN, G. M. Nanotechnology based solutions for anti-leishmanial impediments: a detailed insight. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 106, dez. 2021.

JANI, J.; PAPPACHAN, A. A review on quality control agents of protein translation – The role of Trans-editing proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 199, p. 252–263, fev. 2022.

JASIULIONIS, M. G. et al. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, n. 1, p. 109–114, jan. 2007.

JASKOLSKI, M.; DAUTER, Z.; WLODAWER, A. A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. **FEBS Journal**, v. 281, n. 18, p. 3985–4009, set. 2014.

JEELANI, G.; NOZAKI, T. Eukaryotic translation initiation factor 5A and its posttranslational modifications play an important role in proliferation and potentially in differentiation of the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 2, p. e1008909, 16 fev. 2021.

JENKINS, Z. A.; HÅÅG, P. G.; JOHANSSON, H. E. Human EIF5A2 on Chromosome 3q25–q27 Is a Phylogenetically Conserved Vertebrate Variant of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A with Tissue-Specific Expression. **Genomics**, v. 71, n. 1, p. 101–109, jan. 2001.

JIANG, X.; LOAYZA-PUCH, F. Roles of eIF5A in the immunosurveillance of cellular senescence. **Cancer Biology & Medicine**, p. 1–5, 20 out. 2022.

JIN, Z. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, 11 jun. 2020.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 1 fev. 2010.

KAISER, A.; AGOSTINELLI, E. Hypusinated EIF5A as a feasible drug target for Advanced Medicinal Therapies in the treatment of pathogenic parasites and therapy-resistant tumors. **Amino Acids**, 9 jan. 2022.

KALTENEGER, E. et al. Development of an activity assay for characterizing deoxyhypusine synthase and its diverse reaction products. **FEBS Open Bio**, v. 11, n. 1, p. 10–25, 8 jan. 2021.

KAN, L. et al. Inhibition of α -glucosidases by tea polyphenols in rat intestinal extract and Caco-2 cells grown on Transwell. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130047, nov. 2021.

KAPUST, R. B.; WAUGH, D. S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. **Protein Science**, v. 8, n. 8, p. 1668–1674, 1999.

KEMPER, W. M.; BERRY, K. W.; MERRICK, W. C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2B α and M2B β . **The Journal of biological chemistry**, v. 251, n. 18, p. 5551–7, 25 set. 1976.

KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A. Ligand efficiency metrics considered harmful. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 28, n. 7, p. 699–710, jul. 2014.

KERSTING, D. et al. A suggested vital function for eIF5A and dhs genes during murine malaria blood-stage infection. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 8, p. 860–872, 23 ago. 2016.

KESERÜ, G. M.; MAKARA, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 3, p. 203–212, mar. 2009.

- KIM, H. I. et al. Pharmacological targeting of polyamine and hypusine biosynthesis reduces tumour activity of endometrial cancer. **Journal of Drug Targeting**, p. 1–11, 15 fev. 2022.
- KIM, Y. S. et al. Deoxyhypusine Hydroxylase Is an Fe(II)-dependent, Heat-repeat Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 19, p. 13217–13225, maio 2006.
- KLIER, H. et al. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Letters**, v. 334, n. 3, p. 360–364, 22 nov. 1993.
- KLOHE, K. et al. The 2017 Oslo conference report on neglected tropical diseases and emerging/re-emerging infectious diseases – focus on populations underserved. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 8, n. 1, p. 40, 28 dez. 2019.
- KOLANOWSKI, J. L.; LIU, F.; NEW, E. J. Fluorescent probes for the simultaneous detection of multiple analytes in biology. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 1, p. 195–208, 2018.
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774–797, set. 2007.
- KULKARNI, A. et al. Role of Polyamines and Hypusine in β Cells and Diabetes Pathogenesis. **Metabolites**, v. 12, n. 4, p. 344, 12 abr. 2022.
- KUNTZ, I. D. et al. The maximal affinity of ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 18, p. 9997–10002, 31 ago. 1999.
- KYRPIDES, N. C.; WOESE, C. R. Universally conserved translation initiation factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 224–228, 6 jan. 1998.
- LAGO, J. H. G.; DOMINGUES PASSERO, L. F. Recent Advances in Drug Discovery and Treatment of Neglected Diseases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 19, p. 1593–1594, jul. 2022.
- LAVALLE, E. R. et al. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. Em: [s.l: s.n.]. p. 322–340.
- LEE, C. H.; UM, P. Y.; PARK, M. H. Structure–function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. **Biochemical Journal**, v. 355, n. 3, p. 841–849, 1 maio 2001.
- LEE, Y. B.; FOLK, J. E. Branched-chain and unsaturated 1,7-Diaminoheptane derivatives as deoxyhypusine synthase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 253–270, mar. 1998.
- LEE, Y. B.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Diamine and Triamine Analogs and Derivatives as Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase: Synthesis and Biological Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 16, p. 3053–3061, 1 ago. 1995.
- LEESON, P. D. et al. Target-Based Evaluation of “Drug-Like” Properties and Ligand Efficiencies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 7210–7230, 10 jun. 2021.
- LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 11, p. 881–890, nov. 2007.
- LEIBLY, D. J. et al. Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e2482, 20 dez. 2012.

LI, H. et al. YAP/TAZ drives cell proliferation and tumour growth via a polyamine–eIF5A hypusination–LSD1 axis. **Nature Cell Biology**, 17 fev. 2022.

LI, T. et al. Fertility and Polarized Cell Growth Depends on eIF5A for Translation of Polyproline-Rich Formins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 197, n. 4, p. 1191–1200, 1 ago. 2014.

LIAO, D.-I. et al. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. **Structure**, v. 6, n. 1, p. 23–35, jan. 1998.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

LIU, K. et al. Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase against Malignant Melanoma: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 13356–13372, 23 set. 2021a.

LIU, W. et al. Silencing of lncRNA SNHG12 inhibits proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via targeting miR-766-5p/eIF5A axis. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 30, n. 6, p. 591–598, 20 maio 2021b.

LOU, B. et al. N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin by inhibiting activation of eukaryotic translation initiation factor 5A2 (eIF5A2) and preventing the epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 17, p. 2708–2717, out. 2013.

LU, B. Translational regulation by ribosome-associated quality control in neurodegenerative disease, cancer, and viral infection. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 14 set. 2022.

LUBAS, M. et al. eIF5A is required for autophagy by mediating ATG3 translation. **EMBO reports**, v. 19, n. 6, 30 jun. 2018.

MADDEN, T. L.; TATUSOV, R. L.; ZHANG, J. [9] Applications of network BLAST server. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1996. v. 266p. 131–141.

MAGDOLEN, V. et al. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 244, n. 6, p. 646–652, nov. 1994.

MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. **Discovery medicine**, v. 10, n. 50, p. 18–23, jul. 2010.

MANCONE, C. et al. Iron overload down-regulates the expression of the HIV-1 Rev cofactor eIF5A in infected T lymphocytes. **Proteome Science**, v. 15, n. 1, p. 18, 4 dez. 2017.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25795, 16 set. 2016.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1–3, p. 90–100, dez. 2009.

MANJUNATH, H. et al. Suppression of Ribosomal Pausing by eIF5A Is Necessary to Maintain the Fidelity of Start Codon Selection. **Cell Reports**, v. 29, n. 10, p. 3134–3146.e6, dez. 2019.

MARCHINGO, J. M.; CANTRELL, D. A. Protein synthesis, degradation, and energy metabolism in T cell immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 19, n. 3, p. 303–315, mar. 2022.

MARTELLA, M. et al. Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Hypusination Suppress p53 Translation and Alters the Association of eIF5A to the Ribosomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4583, 27 jun. 2020.

MARTÍNEZ-JUÁREZ, L. A. et al. Defeating neglected tropical diseases in our new world living with COVID-19. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, p. 204993612097197, jan. 2020.

MARTINEZ-ROCHA, A. L. et al. Posttranslational hypusination of the eukaryotic translation initiation factor-5A regulates *Fusarium graminearum* virulence. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24698, abr. 2016.

MARTON, L. J.; PEGG, A. E. Polyamines as Targets for Therapeutic Intervention. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 55–91, abr. 1995.

MATEYAK, M. K.; KINZY, T. G. Breaking the Silos of Protein Synthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 8, p. 587–588, ago. 2017.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. B. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 7, p. 836–844, jul. 2015.

MAVEYRAUD, L.; MOUREY, L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1030, 25 fev. 2020.

MCCOY, A. J. et al. *Phaser* crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 1 ago. 2007.

MCKAY, S. et al. Safely resuming neglected tropical disease control activities during COVID-19: Perspectives from Nigeria and Guinea. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009904, 20 dez. 2021.

MELIS, N. et al. Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 3, p. 811–822, mar. 2017.

MELNIKOV, S. et al. Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 18, p. 3570–3576, set. 2016.

MIGNANI, S. et al. Compound high-quality criteria: a new vision to guide the development of drugs, current situation. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 573–584, abr. 2016.

MIGNANI, S. et al. Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified? **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 605–615, mar. 2018.

MIGUEL, D. C. et al. The impact of COVID-19 on neglected parasitic diseases: what to expect? **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 8, p. 694–697, ago. 2021.

MINETTI, C. A.; REMETA, D. P. Forces Driving a Magic Bullet to Its Target: Revisiting the Role of Thermodynamics in Drug Design, Development, and Optimization. **Life**, v. 12, n. 9, p. 1438, 15 set. 2022.

MITTAL, N. et al. Cryptosporidium parvum has an active hypusine biosynthesis pathway. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 14–22, jun. 2014.

MORTENSON, P. N.; MURRAY, C. W. Assessing the lipophilicity of fragments and early hits. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 25, n. 7, p. 663–667, jul. 2011.

MURRAY, C. W.; REES, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. **Nature Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 187–192, jun. 2009.

MURSHUDOV, G. N. et al. *REFMAC 5* for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 355–367, 1 abr. 2011.

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2353–2362, 29 out. 2016.

NAPPER, A. D.; SIVENDRAN, S. Miniaturized High-Throughput Fluorescent Assay for Conversion of NAD(P)H to NAD(P). **Current Protocols in Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 81–97, jun. 2011.

NEELAGANDAN, N. et al. What determines eukaryotic translation elongation: recent molecular and quantitative analyses of protein synthesis. **Open Biology**, v. 10, n. 12, p. 200292, 9 dez. 2020.

NERO, T. L.; PARKER, M. W.; MORTON, C. J. Protein structure and computational drug discovery. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1367–1379, 19 out. 2018.

NGUYEN, S. et al. Allosteric Activation of Trypanosomatid Deoxyhypusine Synthase by a Catalytically Dead Paralog. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15256–15267, maio 2013.

NGUYEN, S. et al. Deoxyhypusine Modification of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Is Essential for Trypanosoma brucei Growth and for Expression of Polyprolyl-containing Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19987–19998, ago. 2015.

NING, L. et al. Eukaryotic translation initiation factor 5A in the pathogenesis of cancers (Review). **Oncology Letters**, v. 20, n. 4, p. 1–1, 3 ago. 2020.

NISHIMURA, K. et al. Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 3, p. 779–785, 1 fev. 2005.

NISHIMURA, K. et al. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. **Amino Acids**, v. 42, n. 2–3, p. 703–710, 18 fev. 2012.

OLIVERIO, S. et al. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2767–2776, dez. 2014.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Archaeal Genomics: An Overview. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 991–994, jun. 1997.

OLSEN, M. E. et al. Differential Mechanisms for the Involvement of Polyamines and Hypusinated eIF5A in Ebola Virus Gene Expression. **Journal of Virology**, v. 92, n. 20, 15 out. 2018.

OLSEN, M. E.; CONNOR, J. H. Hypusination of eIF5A as a Target for Antiviral Therapy. **DNA and Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 198–201, mar. 2017.

OSELUSI, S. O.; CHRISTOFFELS, A.; EGIEYEH, S. A. Cheminformatic Characterization of Natural Antimicrobial Products for the Development of New Lead Compounds. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3970, 29 jun. 2021.

OUZOUNIS, C. A.; KYRPIDES, N. C. The core histone fold: Limits to functional versatility. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 6, p. 541–542, dez. 1996.

PADGETT, L. R. et al. Deoxyhypusine synthase, an essential enzyme for hypusine biosynthesis, is required for proper exocrine pancreas development. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 5, 3 maio 2021.

PALEG, L. G.; STEWART, G. R.; BRADBEER, J. W. Proline and Glycine Betaine Influence Protein Solvation. **Plant Physiology**, v. 75, n. 4, p. 974–978, 1 ago. 1984.

PARK, J.-H. et al. Reversal of the Deoxyhypusine Synthesis Reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32683–32691, ago. 2003.

PARK, M. H. et al. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 45, p. 27827–32, 11 nov. 1994.

PARK, M. H. The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). **The Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 161–169, 1 fev. 2006.

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491–500, 8 fev. 2010.

PARK, M. H. et al. A new non-radioactive deoxyhypusine synthase assay adaptable to high throughput screening. **Amino Acids**, v. 49, n. 11, p. 1793–1804, 17 nov. 2017.

PARK, M. H. et al. Post-translational formation of hypusine in eIF5A: implications in human neurodevelopment. **Amino Acids**, v. 54, n. 4, p. 485–499, 17 abr. 2022.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine Is Essential for Eukaryotic Cell Proliferation. **Neurosignals**, v. 6, n. 3, p. 115–123, 1997.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18710–18718, nov. 2018.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 4, n. 2, p. 95–104, maio 1993.

PAUL, A.; SINGH, S. Visceral leishmaniasis in the COVID-19 pandemic era. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. trac100, 25 out. 2022.

PEGG, A. E. Unique Characteristics of the Parasite Polyamine Pathway. **Structure**, v. 26, n. 11, p. 1427–1429, nov. 2018.

PEI, J.; GRISHIN, N. V. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. **Bioinformatics**, v. 23, n. 7, p. 802–808, 1 abr. 2007.

PELECHANO, V.; ALEPUZ, P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, p. 7326–7338, 7 jul. 2017.

PEROLA, E. An Analysis of the Binding Efficiencies of Drugs and Their Leads in Successful Drug Discovery Programs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2986–2997, 8 abr. 2010.

PERUTZ, M. F.; ROSA, J.; SCHECHTER, A. Therapeutic agents for sickle cell disease. **Nature**, v. 275, n. 5679, p. 369–370, out. 1978.

PHILLIPS, M. A. Polyamines in protozoan pathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18746–18756, nov. 2018.

PHILLIPS, M.; RATHOD, P. Plasmodium Dihydroorotate Dehydrogenase: A Promising Target for Novel Anti-Malarial Chemotherapy. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 226–239, 1 jun. 2010.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. BUSCA VIRTUAL DE COMPOSTOS BIOATIVOS: CONCEITOS E APLICAÇÕES. **Química Nova**, 2018.

PLOWRIGHT, A. T. et al. Discovery of Agonists of Cannabinoid Receptor 1 with Restricted Central Nervous System Penetration Aimed for Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 220–240, 10 jan. 2013.

PULESTON, D. J. et al. Polyamines and eIF5A Hypusination Modulate Mitochondrial Respiration and Macrophage Activation. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 352–363.e8, ago. 2019.

RAMSAY, R.; TIPTON, K. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1192, 15 jul. 2017.

REES, D. C. et al. Fragment-based lead discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 660–672, ago. 2004.

REILAND, K. M.; ECKROAT, T. J. Selective butyrylcholinesterase inhibition by isatin dimers and 3-indolyl-3-hydroxy-2-oxindole dimers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 77, p. 129037, dez. 2022.

REYNOLDS, C. H.; TOUNGE, B. A.; BEMBENEK, S. D. Ligand Binding Efficiency: Trends, Physical Basis, and Implications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2432–2438, 1 abr. 2008.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 8965–8977, nov. 2020.

ROBBINS, R. D. et al. Inhibition of Deoxyhypusine Synthase Enhances Islet β Cell Function and Survival in the Setting of Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39943–39952, dez. 2010.

ROBERTSON, M. J.; MEYEROWITZ, J. G.; SKINIOTIS, G. Drug discovery in the era of cryo-electron microscopy. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 124–135, fev. 2022.

ROSSI, D. et al. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 2, p. 209–222, mar. 2014a.

ROSSI, D. et al. eIF5A has a function in the cotranslational translocation of proteins into the ER. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 645–653, 5 mar. 2014b.

SAHU, U.; KHARE, P. Interferon- γ : a key cytokine in leishmaniasis. Em: **Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 197–208.

SANDER, T. et al. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 2, p. 460–473, 23 fev. 2015.

SASAKI, K.; ABID, R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 384, n. 2, p. 151–154, 15 abr. 1996.

SAVITSKY, P. et al. High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 3–13, out. 2010.

SCARIOT, D. B. et al. Leishmaniasis and Chagas disease: Is there hope in nanotechnology to fight neglected tropical diseases? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1000972, 16 set. 2022.

SCHMIDT, C. et al. Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 4, p. 1944–1951, 29 fev. 2016.

SCHNIER, J. et al. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 6, p. 3105–3114, jun. 1991.

SCHREIER, M. H.; ERNI, B.; STAEHELIN, T. Initiation of mammalian protein synthesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 116, n. 4, p. 727–753, nov. 1977.

SCHRÖDER, M. et al. Linker-Region Modified Derivatives of the Deoxyhypusine Synthase Inhibitor CNI-1493 Suppress HIV-1 Replication. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 2, p. 91–103, fev. 2016.

SCHROEDER, M. et al. In silico Design, Synthesis, and Screening of Novel Deoxyhypusine Synthase Inhibitors Targeting HIV-1 Replication. **ChemMedChem**, v. 9, n. 5, p. 940–952, maio 2014.

SCHULLER, A. P. et al. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Molecular Cell**, v. 66, n. 2, p. 194–205.e5, abr. 2017.

SCHULLER, A. P.; GREEN, R. Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 8, p. 526–541, 14 ago. 2018.

SCHULTES, S. et al. Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 3, p. e157–e162, 2010.

SEOANE, R. et al. eIF5A is activated by virus infection or dsRNA and facilitates virus replication through modulation of interferon production. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 27 jul. 2022.

SHI, X.-P. et al. Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1310, n. 1, p. 119–126, jan. 1996.

SHUKLA, D.; TROUT, B. L. Understanding the Synergistic Effect of Arginine and Glutamic Acid Mixtures on Protein Solubility. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 41, p. 11831–11839, 20 out. 2011.

SIEGAL, G.; AB, E.; SCHULTZ, J. Integration of fragment screening and library design. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23–24, p. 1032–1039, dez. 2007.

SILVA, S. F. et al. Structural features and development of an assay platform of the parasite target deoxyhypusine synthase of *brugia malayi* and *leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1–31, 1 out. 2020.

SIMEONOV, A.; DAVIS, M. I. **Interference with Fluorescence and Absorbance**. [s.l: s.n.].

SINGH, L. R. et al. Glycine betaine may have opposite effects on protein stability at high and low pH values. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 6, p. 929–935, jun. 2009.

SOMMER, M.-N. et al. Screening Assay for the Identification of Deoxyhypusine Synthase Inhibitors. **SLAS Discovery**, v. 9, n. 5, p. 434–438, ago. 2004.

SONI, M.; PRATAP, J. V. Development of Novel Anti-Leishmanials: The Case for Structure-Based Approaches. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 950, 22 ago. 2022.

SOTO-VÁSQUEZ, M. R. et al. Antileishmanial Activity of *Clinanthus milagroanthus* S. Leiva & Meerow (Amaryllidaceae) Collected in Peru. **Plants**, v. 12, n. 2, p. 322, 10 jan. 2023.

SRIPA, B. et al. Status and perspective of asian neglected tropical diseases. **Acta Tropica**, v. 225, p. 106212, jan. 2022.

STOLS, L. et al. A New Vector for High-Throughput, Ligation-Independent Cloning Encoding a Tobacco Etch Virus Protease Cleavage Site. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 1, p. 8–15, jun. 2002.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

SUN, N. et al. Purification, composition and activity of bound polyphenols from mung bean coat dietary fiber. **Food Research International**, v. 162, p. 111997, dez. 2022.

SWARBRICK, C. M. D. et al. Structure, function, and regulation of thioesterases. **Progress in Lipid Research**, v. 79, p. 101036, jul. 2020.

TANAKA, Y. et al. Discovery of Novel Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 3215–3226, 26 mar. 2020a.

TANAKA, Y. et al. New Series of Potent Allosteric Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 8, p. 1645–1652, 13 ago. 2020b.

TAO, Y.; CHEN, K. Y. Purification of Deoxyhypusine Synthase from *Neurospora crassa* to Homogeneity by Substrate Elution Affinity Chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 1, p. 383–386, jan. 1995.

TARI, L. W. The Utility of Structural Biology in Drug Discovery. Em: TARI, L. W. (Ed.). **Structure-Based Drug Discovery**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 841p. 1–27.

TAUC, M. et al. The eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A1), the molecule, mechanisms and recent insights into the pathophysiological roles. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 219, 24 dez. 2021.

TEAGUE, S. J. et al. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 24, p. 3743–3748, 16 dez. 1999.

TERSEY, S. A. et al. Protective effects of polyamine depletion in mouse models of type 1 diabetes: implications for therapy. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 633–642, 12 mar. 2014.

THOMAS, S. E. et al. Structural Biology and the Design of New Therapeutics: From HIV and Cancer to Mycobacterial Infections. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 17, p. 2677–2693, ago. 2017.

THORNE, N.; AULD, D. S.; INGLESE, J. Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 315–324, jun. 2010.

TIAN, S. et al. The application of in silico drug-likeness predictions in pharmaceutical research. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 2–10, jun. 2015.

TONG, Y. et al. Crystal structure of human eIF5A1: Insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 75, n. 4, p. 1040–1045, jun. 2009.

TOSARINI, T. R. et al. Cloning, expression and purification of kinase domains of cacao PR-1 receptor-like kinases. **Protein Expression and Purification**, v. 146, p. 78–84, jun. 2018.

TURPAEV, K. T. Translation Factor eIF5A, Modification with Hypusine and Role in Regulation of Gene Expression. eIF5A as a Target for Pharmacological Interventions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 8, p. 863–873, 14 ago. 2018.

UMLAND, T. C. et al. A New Crystal Structure of Deoxyhypusine Synthase Reveals the Configuration of the Active Enzyme and of an Enzyme·NAD·Inhibitor Ternary Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28697–28705, jul. 2004.

URWYLER, S. Allosteric Modulation of Family C G-Protein-Coupled Receptors: from Molecular Insights to Therapeutic Perspectives. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 59–126, mar. 2011.

VALLIANATOU, T.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. The Impact of Physicochemical and Molecular Properties in Drug Design: Navigation in the “Drug-Like” Chemical Space. Em: VLAMOS, P.; ALEXIOU, A. (Eds.). **GeNeDis 2014**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 822p. 187–194.

VAN MONTFORT, R. L. M.; WORKMAN, P. Structure-based drug design: aiming for a perfect fit. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 431–437, 8 nov. 2017.

VU, V. V. et al. Human deoxyhypusine hydroxylase, an enzyme involved in regulating cell growth, activates O₂ with a nonheme diiron center. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 35, p. 14814–14819, set. 2009.

WALSH, L. et al. Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2021. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. acs.jmedchem.2c01827, 9 jan. 2023.

WĄTOR, E.; WILK, P.; GRUDNIK, P. Half way to hypusine—Structural basis for substrate recognition by human deoxyhypusine synthase. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2020.

WEEKS, S. D.; DRINKER, M.; LOLL, P. J. Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions. **Protein Expression and Purification**, v. 53, n. 1, p. 40–50, maio 2007.

WENG, H.-B.; CHEN, H.-X.; WANG, M.-W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 7, n. 1, p. 67, 18 dez. 2018.

WINGFIELD, P. T. N-Terminal Methionine Processing. **Current Protocols in Protein Science**, v. 88, n. 1, 3 abr. 2017.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP 4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, 1 abr. 2011.

WOLFF, E. C. et al. Deoxyhypusine Synthase from Rat Testis: Purification and Characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 15, p. 8660–8666, abr. 1995.

WOLFF, E. C. et al. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 341–350, 4 ago. 2007.

WOLFF, E. C.; FOLK, J. E.; PARK, M. H. Enzyme-Substrate Intermediate Formation at Lysine 329 of Human Deoxyhypusine Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15865–15871, jun. 1997.

WOLFF, E. C.; LEE, S. B.; PARK, M. H. Assay of deoxyhypusine synthase activity. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 720, p. 195–205, 2011.

WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Cleavage of spermidine as the first step in deoxyhypusine synthesis. The role of NAD. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 9, p. 4793–4799, 25 mar. 1990.

WOLFF, E. C.; WOLFF, J.; PARK, M. H. Deoxyhypusine Synthase Generates and Uses Bound NADH in a Transient Hydride Transfer Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9170–9177, mar. 2000.

WORIEDH, M. et al. Preventing Fusarium Head Blight of Wheat and Cob Rot of Maize by Inhibition of Fungal Deoxyhypusine Synthase. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 24, n. 5, p. 619–627, maio 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a sustainability framework for action against neglected tropical diseases 2021-2030**. Geneva: World Health Organization, 2021.

WU, P.; CLAUSEN, M. H.; NIELSEN, T. E. Allosteric small-molecule kinase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 156, p. 59–68, dez. 2015.

XU, B.; LIU, L.; SONG, G. Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 19 jan. 2022.

YAO, N. et al. Targeting the S2 Subsite Enables the Structure-Based Discovery of Novel Highly Selective Factor XIa Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 5, p. 4318–4334, 10 mar. 2022a.

YAO, T. et al. Oxidative stress-responsive apoptosis inducing protein (ORAIP) plays a critical role in doxorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. **International Journal of Cardiology**, v. 348, p. 119–124, fev. 2022b.

YUSOF, I.; SEGALL, M. D. Considering the impact drug-like properties have on the chance of success. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 13–14, p. 659–666, jul. 2013.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Pkc1 Acts Through Zds1 and Gic1 to Suppress Growth and Cell Polarity Defects of a Yeast eIF5A Mutant. **Genetics**, v. 171, n. 4, p. 1571–1581, 1 dez. 2005.

ZHANG, H. et al. Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. **Molecular Cell**, v. 76, n. 1, p. 110–125.e9, out. 2019.

ZHANG, J.-H.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENBURG, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, 2 abr. 1999.

ZHENG, X. et al. Overexpression of EIF5A2 is associated with poor survival and aggressive tumor biology in gallbladder cancer. **Histology and histopathology**, v. 35, n. 6, p. 579–587, jun. 2020.

ZIEGLER, P. et al. Evaluation of deoxyhypusine synthase inhibitors targeting BCR-ABL positive leukemias. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 6, p. 2274–2283, dez. 2012.

APÊNDICE

Figura Suplementar 1. Fluxo de trabalho realizado no Centro de Química Medicinal da UNICAMP.

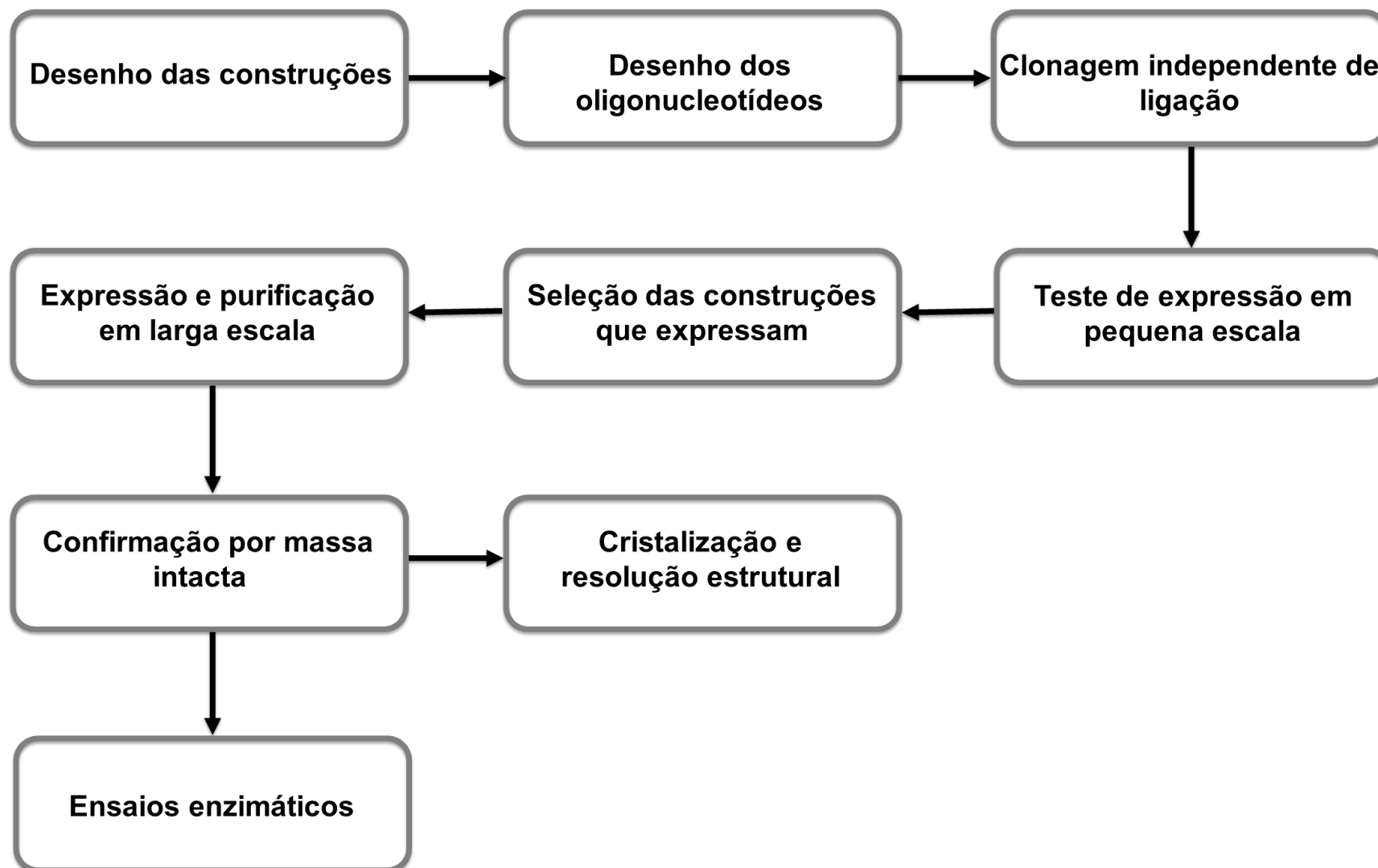


Figura Suplementar 2. Fluxo de trabalho realizado no laboratório do Dr. Van Voorhis na Universidade de Washington.

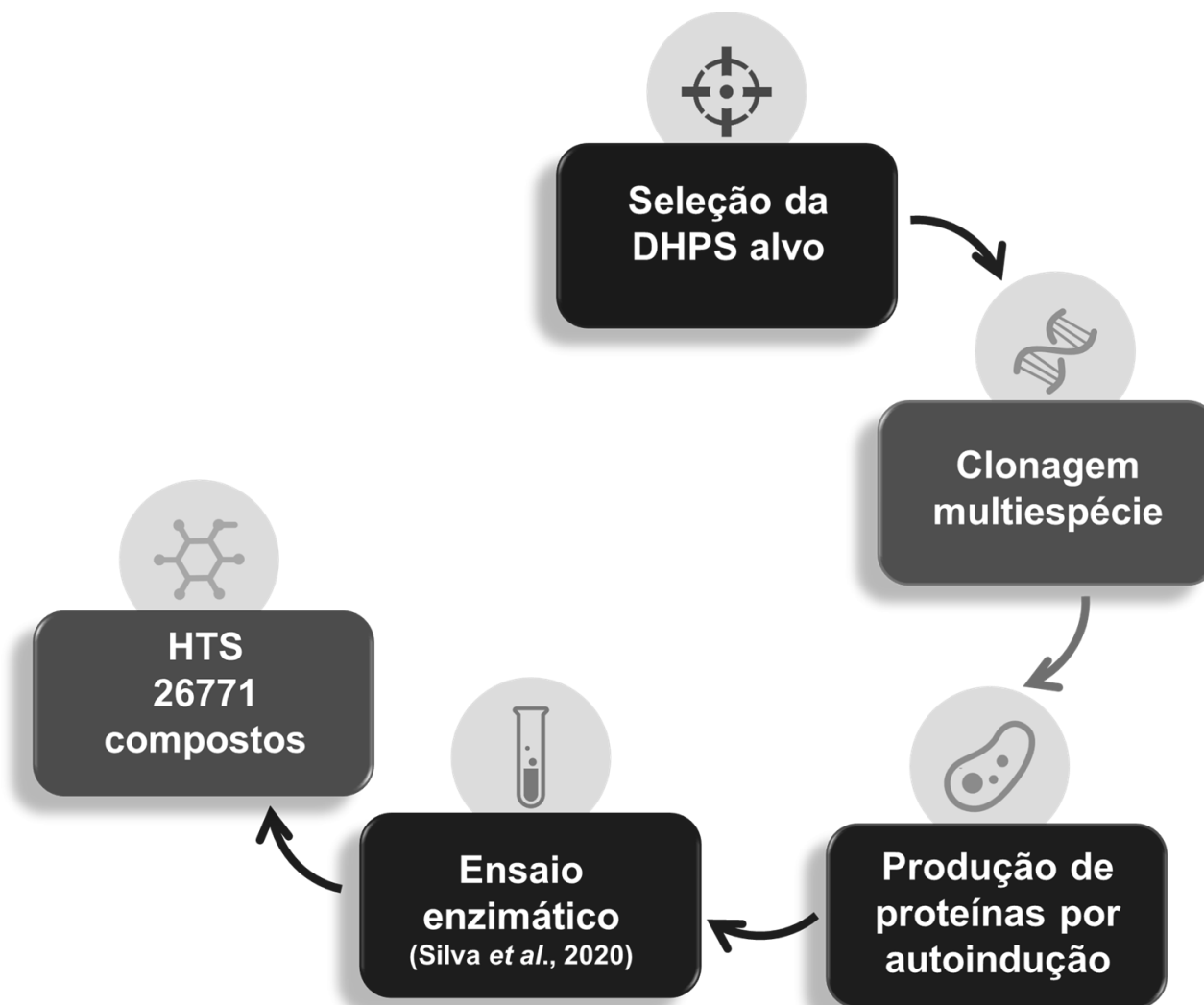
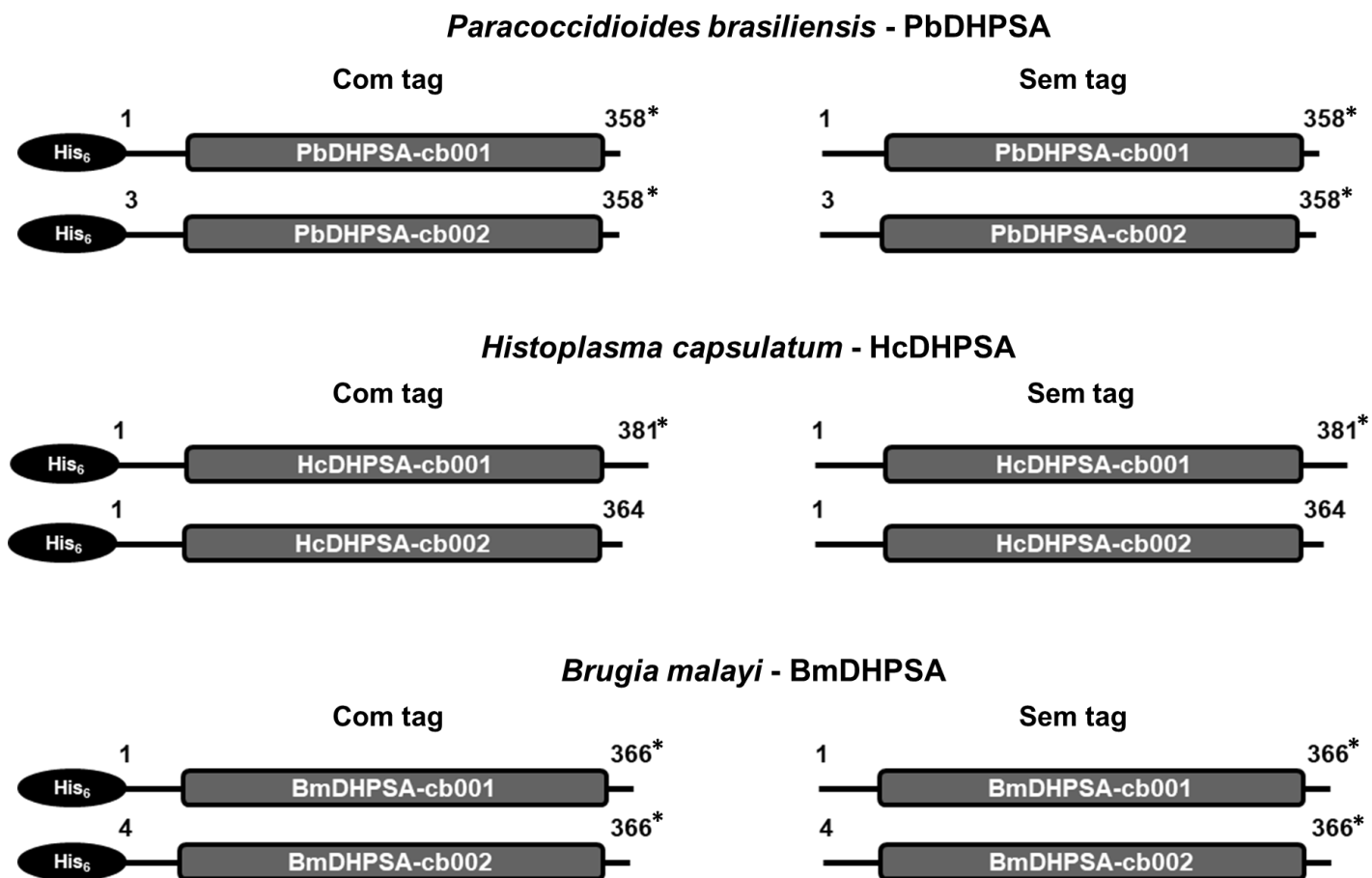


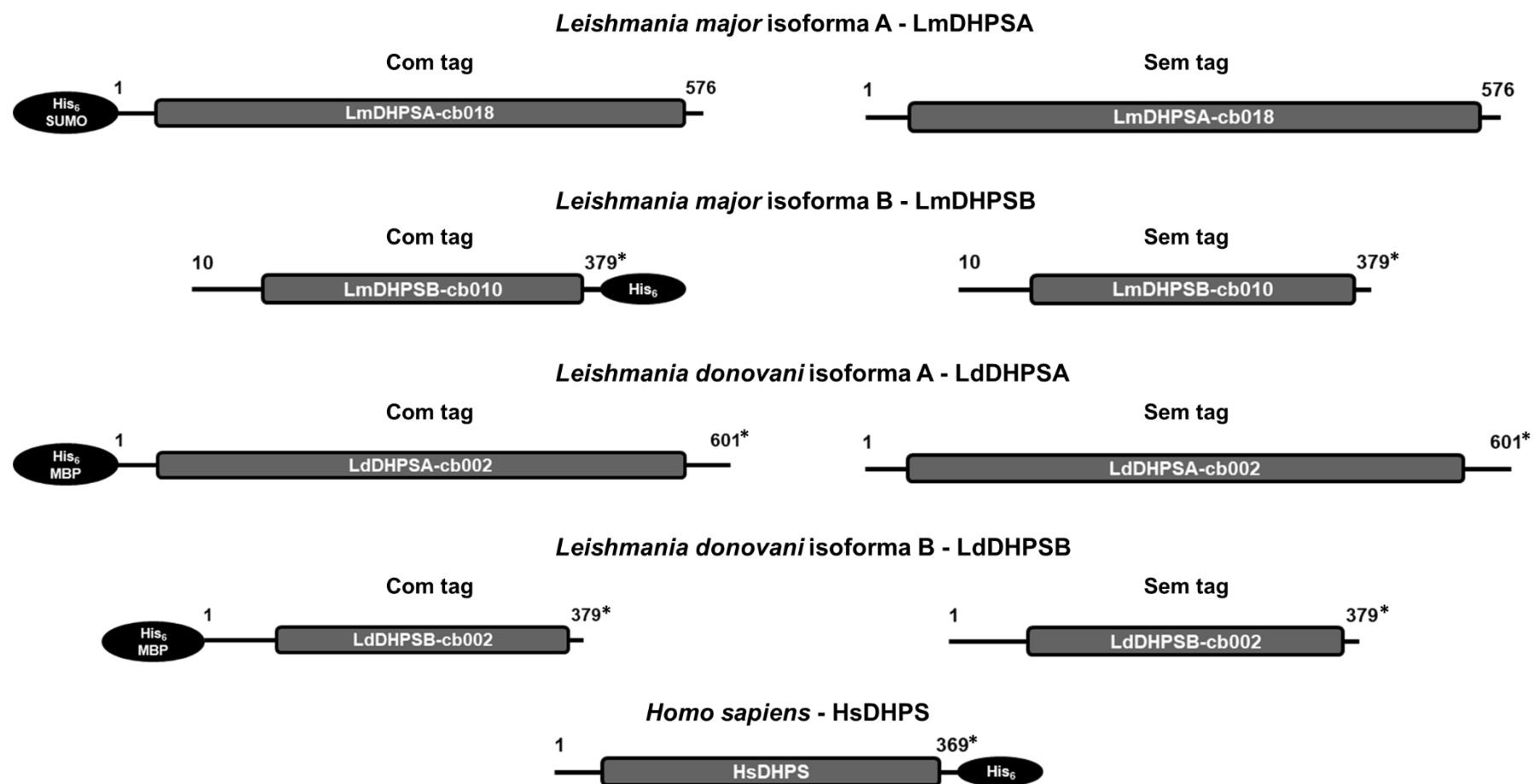
Figura Suplementar 3. Representação das principais construções utilizadas neste trabalho.



Os números no início e no final das construções indicam o primeiro e o último aminoácido das mesmas; o retângulo cinza representa o domínio DHPS

*: Último aminoácido da proteína selvagem

Figura Suplementar 3 (continuação). Representação das principais construções utilizadas neste trabalho.



Os números no início e no final das construções indicam o primeiro e o último aminoácido das mesmas; o retângulo cinza representa o domínio DHPS

*: Último aminoácido da proteína selvagem

Figura Suplementar 4. Construções utilizadas nos principais experimentos deste trabalho.

Proteína alvo	Purificação em larga escala	Confirmação por massa intacta	Obtenção de cristais	Determinação estrutural	Padronização do ensaio enzimático	High-throughput screening (HTS)
PbDHPSA	PbDHPSA-cb001 com tag	PbDHPSA-cb001 sem tag	-		PbDHPSA-cb001 sem tag	
	PbDHPSA-cb002 com tag		-			
HcDHPSA	HcDHPSA-cb001 com tag	HcDHPSA-cb001 sem tag	HcDHPSA-cb001 sem tag	HcDHPSA-cb001 sem tag	HcDHPSA-cb001 sem tag	
	HcDHPSA-cb002 com tag					
BmDHPSA	BmDHPSA-cb001 com tag	BmDHPSA-cb001 sem tag	BmDHPSA-cb001 sem tag	BmDHPSA-cb001 sem tag	BmDHPSA-cb001 sem tag	
	BmDHPSA-cb002 com tag					
HsDHPS	HsDHPS com tag	HsDHPS com tag			HsDHPS com tag	
LdDHPSA+B	LdDHPSA-cb002 com tag + LdDHPSB-cb002 com tag	LdDHPSA-cb002 sem tag + LdDHPSB-cb002 sem tag	-		LdDHPSA-cb002 sem tag + LdDHPSB-cb002 sem tag	LdDHPSA-cb002 sem tag + LdDHPSB-cb002 sem tag
	LmDHPSA-cb018 com tag + LmDHPSB-cb010 com tag	LmDHPSA-cb018 sem tag + LmDHPSB-cb010 sem tag	LmDHPSA-cb018 sem tag + LmDHPSB-cb010 sem tag	-	LmDHPSA-cb018 sem tag + LmDHPSB-cb010 sem tag	

-: Tentativas malsucedidas