

# *Revista da Graduação*

---

Vol. 5

No. 1

2012

5

---

**Seção: Faculdade de Biociências**

## **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA ADENINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE (APRT) DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

**Bruno Lopes Abbadi**

Este trabalho está publicado na Revista da Graduação.

ISSN 1983-1374

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/11400>

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BRUNO LOPES ABBADI

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA ADENINA  
FOSFORIBOSILTRANSFERASE (APRT) DE *Mycobacterium tuberculosis***

Porto Alegre

2011

BRUNO LOPES ABBADI

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA ADENINA  
FOSFORIBOSILTRANSFERASE (APRT) DE *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel do curso de Ciências Biológicas.

Porto Alegre

2011

BRUNO LOPES ABBADI

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA ADENINA  
FOSFORIBOSILTRANSFERASE (APRT) de *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel do curso de Ciências Biológicas.

Aprovada em 21 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Luiz Augusto Baso

---

Maurício Reis Bogo

---

Porto Alegre

2011

## RESUMO

A tuberculose humana é uma das doenças mais preocupantes da atualidade. A cada ano, esta patologia faz 1,7 milhões de vítimas em todo o mundo. Além disso, de acordo com o último levantamento da OMS, em 2009, 9,4 milhões de indivíduos desenvolveram a doença. Baseado nesses dados, é fundamental buscar novos alvos para combater o principal agente causador desta doença em humanos, o *Mycobacterium tuberculosis*. A busca por novos alvos pode permitir o desenvolvimento de drogas mais eficazes, que diminuam o tempo de tratamento da tuberculose e que ofereçam menos reações adversas. Uma proteína ainda não explorada no bacilo é a adenina fosforibosiltransferase (APRT). Esta enzima é responsável por catalisar uma reação entre PRPP e base adenina livre, para formar AMP e PP<sub>i</sub>. Sabe-se que esta enzima tem um papel bastante importante na via de salvamento de purinas, uma rota metabólica dentro do metabolismo de nucleotídeos. Ela já foi estudada em diversos organismos, incluindo seres humanos, a bactéria *Escherichia coli* e diferentes eucariotos basais como espécies do gênero *Leishmania*. Este projeto tem como objetivo caracterizar os processos bioquímicos básicos desta enzima. Para isso, o gene *apt* da cepa laboratorial H37Rv de *Mtb* precisa ser amplificado por PCR e clonado em vetores plasmidiais. A proteína então será superexpressa em células de *E. coli*, purificada por HPLC para remover os contaminantes e caracterizada por ensaios enzimáticos utilizando um espectrofotômetro.

**Palavras-chave.** Adenina fosforibosiltransferase. Tuberculose. Metabolismo de Purinas. *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

Human tuberculosis is one of the most preoccupying diseases nowadays. Each year, this pathology claims 1.7 million victims worldwide. In addition, according to the last WHO survey, in 2009, 9.4 million people developed the disease. Based on this data, it is important to search for new targets to combat the *Mycobacterium tuberculosis*, the main agent that causes this disease in humans. The search for new targets allows the development of more effective drugs, which decrease the treatment time of tuberculosis and offer fewer adverse reactions. A protein that has not yet been explored is adenine phosphoribosyltransferase (APRT). This enzyme is responsible for catalyzing a reaction between PRPP and free base adenine, to form AMP and PP<sub>i</sub>. It is known that this enzyme has an important role in purine salvage pathway, a metabolic way inside the nucleotides metabolism. This has been already studied in many organisms, including humans, the bacteria *Escherichia coli* and many basal eukaryotes, such as the species of the genus *Leishmania*. This project has the aim of characterizing the basic biochemical process of this enzyme. To do this, the *apt* gene from the *Mtb* H37Rv strain needs to be amplified by PCR and cloned into plasmidial vectors. Then, the protein has to be overexpressed into *E. coli* cells, purified to remove the contaminants and characterized by enzymatic assays using a spectrophotometer.

**Keywords.** Adenine phosphoribosyltransferase. Tuberculosis. Purine Metabolism. *Mycobacterium tuberculosis*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxa estimada de casos incidentes por país no ano de 2009. ....	9
Figura 2. Esquema geral da tuberculose. ....	10
Figura 3. Eventos da infecção pelo <i>Mtb</i> . ....	11
Figura 4. Proporção dos indivíduos adultos portadores da tuberculose atribuídos à infecção pelo HIV em cada país. ....	13
Figura 5. Estrutura química das cinco drogas de primeira-linha. ....	14
Figura 6. Estrutura química de três drogas de segunda-linha. ....	14
Figura 7. Esquema de como ocorrem o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos anti-TB. ....	17
Figura 8. Esquema representativo de como ocorre a catálise enzimática. ....	18
Figura 9. O nucleotídeo trifosfato de adenosina. ....	20
Figura 10. Via de salvamento de purinas do <i>Mtb</i> . ....	22
Figura 11. Reação enzimática realizada pelas enzimas APRTs. ....	24
Figura 12. Utilização de plasmídeos bacterianos para a expressão de proteínas. ....	29
Figura 13. Representação das colunas cromatográficas utilizadas na purificação de proteínas. ....	32

## LISTA DE SIGLAS

AMP - adenosina monofosfato

Anti-TB - anti-tuberculose

APRT - adenina fosforibosiltransferase

ATP - trifosfato de adenosina

CPBMF - Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional

DMSO - dimetilsulfóxido

dNTPs - desoxirribonucleotídeos

DOTS - do inglês *Directly Observed Treatment Short Course*

GMP - guanosina monofosfato

HIV - do inglês *human immunodeficiency virus*

IMP - inosina monofosfato

IPTG - do inglês *isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

$K_{cat}$  - constante catalítica

$K_m$  - constante de Michaelis-Menten

LB - meio de cultura Luria-Bertani

MDR-TB - multirresistência a drogas anti-tuberculose

*Mt*APRT - adenina fosforibosiltransferase de *Mycobacterium tuberculosis*

*Mtb* - *Mycobacterium tuberculosis*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PRPP - fosforibosilpirofosfato

PRTs - fosforibosiltransferases

TB - tuberculose

TDO - tratamento diretamente observado

XDR-TB - extensivamente resistente a drogas anti-tuberculose

WHO - do inglês *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 A tuberculose no mundo e no Brasil .....	8
1.2 O <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e suas interações com o hospedeiro humano .....	9
1.3 Tratamento da tuberculose humana .....	13
1.4 Resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aos fármacos anti-TB.....	15
1.5 Desenvolvimento de novos fármacos anti-TB .....	17
1.6 Via de salvamento de purinas como alvo para o desenvolvimento de drogas anti-TB.....	20
1.7 Adenina fosforibosiltransferase (APRT) .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 Objetivo geral .....	26
2.2 Objetivos específicos .....	26
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
3.1 Local e Duração .....	27
3.2 Desenho de <i>primers</i> e amplificação do gene <i>apt</i> .....	27
3.3 Clonagem e subclonagem do gene <i>apt</i> purificado em vetores plasmidiais .....	28
3.4 Determinação da identidade e integridade do gene <i>apt</i> por sequenciamento ....	29
3.5 Superexpressão da enzima APRT de <i>Mtb</i> em células de <i>E. coli</i> .....	30
3.6 Purificação da enzima APRT solúvel de <i>Mtb</i> .....	31
3.7 Quantificação da <i>MtAPRT</i> homogênea pelo método de Bradford .....	32
3.8 Teste de atividade enzimática e determinação das constantes cinéticas .....	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>
<b>APÊNDICE A - CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES</b> .....	<b>38</b>
<b>APÊNDICE B - ORÇAMENTO</b> .....	<b>39</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 A tuberculose no mundo e no Brasil

Embora a incidência da tuberculose humana ter diminuído no início do século 20, antes mesmo do surgimento das drogas anti-TB, hoje o número de pessoas doentes e a taxa de mortalidade desta patologia tem aumentado significativamente em todo mundo (1). Atualmente a tuberculose mata todos os anos 1,7 milhões de pessoas e, em 2009, o número total estimado de casos incidentes no mundo atingiu 9,4 milhões de indivíduos (equivalente a 137 casos a cada 100.000 habitantes) – um número muito maior que qualquer outro período da história; destes 9,4 milhões, aproximadamente 1,1 milhão (12%) de pessoas eram HIV-positivos (1, 2).

Alguns fatores são atribuídos ao retorno desta doença na população, como o aumento da resistência a drogas; a pandemia do HIV; o aumento de usuários de drogas injetáveis; as mudanças na estrutura social; o aumento de imigrantes de países com alta prevalência da doença para países desenvolvidos; o aumento da longevidade da população humana; a ampliação de ambientes com alta aglomeração de pessoas (prisões, hospitais, abrigos); e também a degradação dos sistemas de saúde (3).

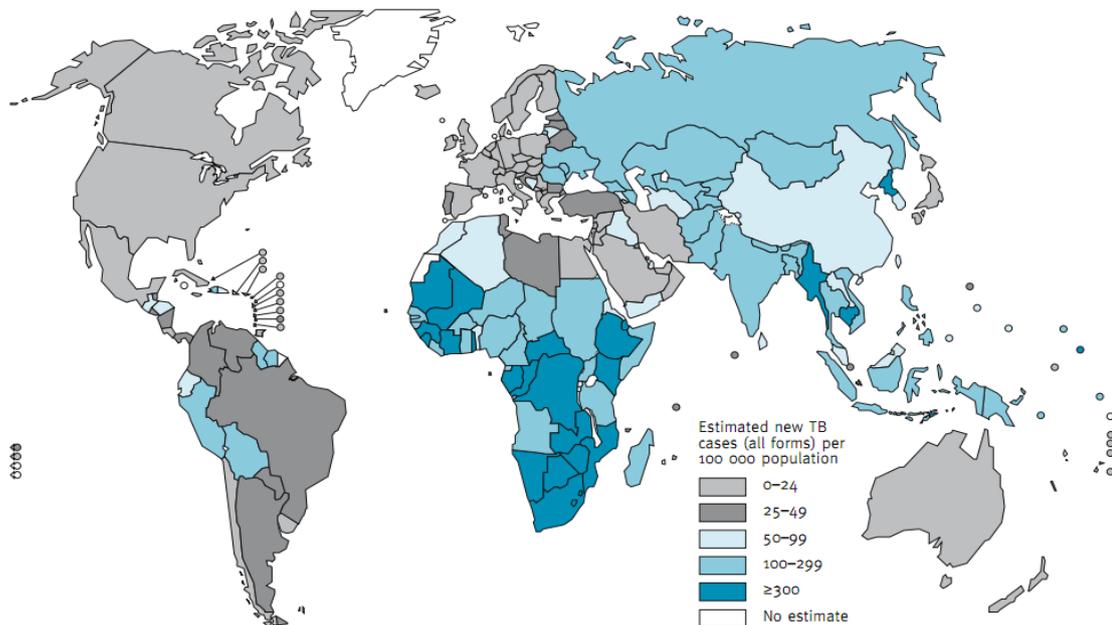
O aumento da população humana compensa a pequena diminuição da taxa de incidência da doença, ou seja, o número absoluto de casos de tuberculose continua aumentando todos os anos. A maior parte dos casos estimados em 2009 está localizada no continente asiático (55%) e africano (30%); a região leste do Mediterrâneo, a Europa, e as Américas possuem 7%, 4% e 3% dos casos respectivamente [Figura 1]. Índia, China, África do Sul, Nigéria e Indonésia formam o grupo dos cinco países com o maior número de casos incidentes no mundo; a Índia sozinha representa 21% de todos os casos de tuberculose no momento (aproximadamente 1/5 dos casos), e associada à China, ambas contam com 35% dos casos totais (2). Além disso, em 2008 foi estimado que 440 mil indivíduos apresentaram multirresistência a drogas anti-TB (MDR-TB). Novamente, China e Índia aparecem como os países com os maiores números de casos MDR-TB (50% dos casos mundiais) (1, 2).

O Brasil faz parte dos 22 países que correspondem a 80% dos casos mundiais da tuberculose, sendo também priorizado pela OMS no combate à doença. Em 2007,

72.194 novos casos foram notificados no país (aproximadamente 38 indivíduos por 100.000 habitantes); estes números colocam o Brasil na 19ª posição em relação ao número de casos. São Paulo é o estado com o maior número absoluto de ocorrências, enquanto que o Rio de Janeiro apresenta a maior incidência do país (4). Em 2009, aproximadamente 4.500 pessoas morreram desta doença no país (2, 4). De acordo com o Portal da Saúde do Ministério da Saúde brasileiro, o país reduziu de 73.673 para 70.601 no número de casos novos da tuberculose entre os anos de 2008 e 2010. No entanto, esta doença ainda é a 3ª causa de óbitos por doenças infecciosas entre os pacientes HIV-positivos no país (5).

A tuberculose humana é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis*, apesar de poder ser causada com menor frequência pelo *M. bovis* e *M. africanum*. Apesar de atingir países desenvolvidos, principalmente pelo advento do HIV, a tuberculose permanece uma doença de pobreza, associada à desnutrição e à superpopulação (1, 3).

**Figura 1. Taxa estimada de casos incidentes por país no ano de 2009.**



Fonte: WHO, 2010.

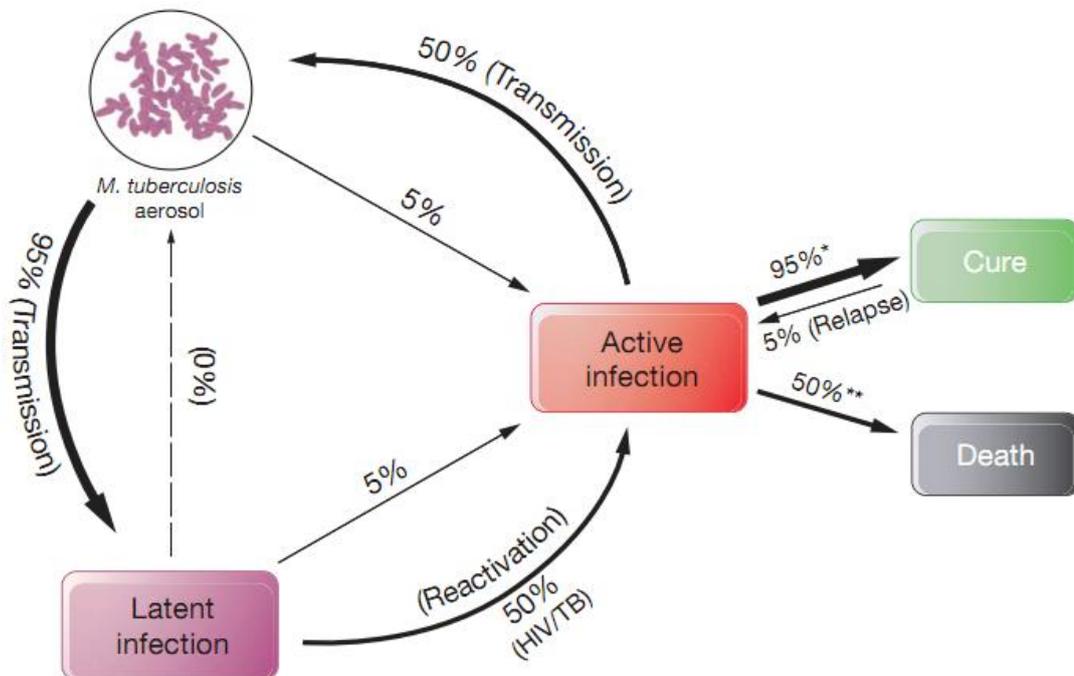
Nota: de acordo com a figura, o continente africano apresenta os países com maior taxa de incidência no mundo, seguido da Ásia.

## 1.2 O *Mycobacterium tuberculosis* e suas interações com o hospedeiro humano

O bacilo da tuberculose é um patógeno intracelular que utiliza os humanos como principais hospedeiros, apesar de infectar outras espécies animais. Esta micobactéria é aeróbica (crescendo satisfatoriamente em tecidos com alta concentração de oxigênio, como os pulmões), acidorresistente (devido ao ácido micólico, componente ceroso da parede celular), imóvel, não encapsulada e não formadora de esporos. Se comparada à bactéria *E. coli*, que se multiplica a cada 20 minutos, o tempo de duplicação do *M. tuberculosis* é bastante lento, variando de 15 a 20 horas (1).

As chances de desenvolver a tuberculose ativa, após inalar gotículas do ar contaminadas com o bacilo, são muito baixas – aproximadamente 5% (6). No entanto, sabe-se que aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo possuem a infecção latente da doença, na qual os indivíduos infectados pelo *Mtb* não apresentam danos teciduais ou sintomas da infecção, visto que seu sistema imune controla a replicação da bactéria. Apesar de não transmitirem o bacilo durante esta fase, os indivíduos com tuberculose latente representam uma reserva potencial da doença [Figura 2] (1).

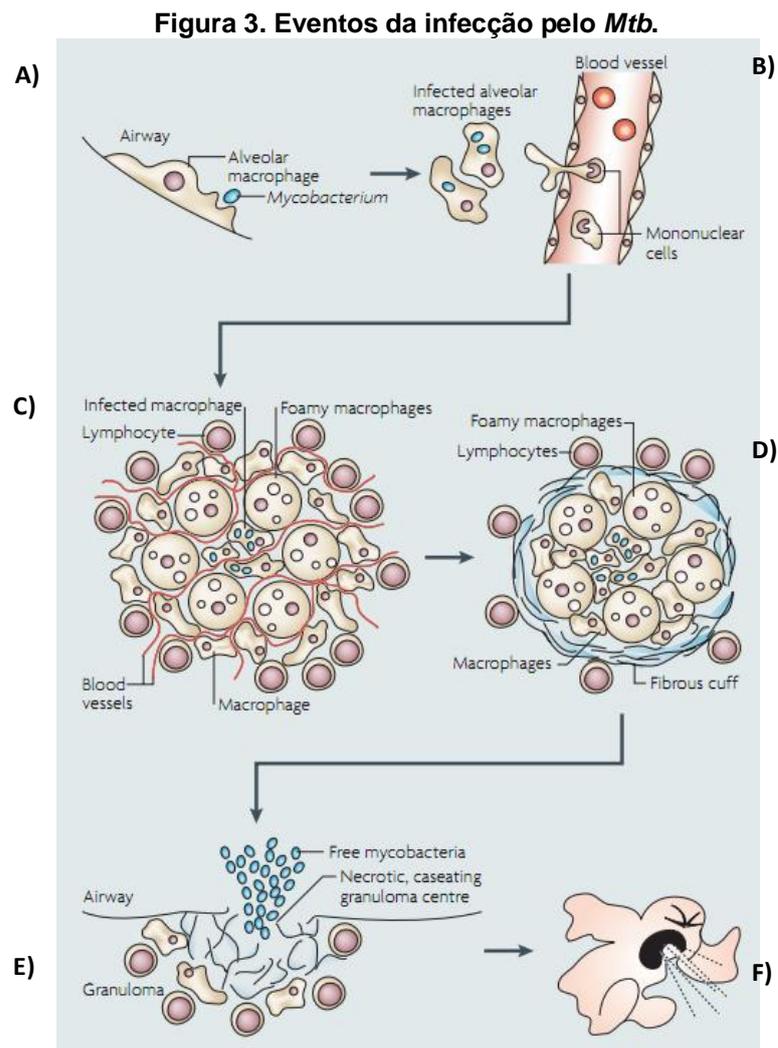
Figura 2. Esquema geral da tuberculose.



Fonte: Koul A, 2011.

Nota: enquanto que indivíduos saudáveis têm uma chance de 5% de desenvolver a doença ativa, portadores do HIV aumentam as chances para 50%. Além disso, o \* mostra que as taxas de cura da doença são altas (95%), quando o tratamento é seguido corretamente; se não tratada, o indivíduo tem uma alta probabilidade de falecer (50%) indicada pelos \*\*. Indivíduos previamente tratados, no entanto, podem ter uma reincidência da doença (5%).

O *Mtb* segue uma sequência de eventos bastante regular no hospedeiro humano, apesar de a infecção também depender da virulência da linhagem e da resistência do hospedeiro [Figura 3] (7, 8). Um indivíduo sadio é contaminado com o bacilo através da exalação de gotículas no ar (aerossol) por um paciente com a doença ativa, as quais podem permanecer em suspensão por várias horas na atmosfera; é necessária apenas uma única bactéria para que a infecção tenha início (7). Ao chegar aos pulmões, a bactéria é rapidamente fagocitada pelos macrófagos alveolares, que induzem uma pró-inflamação no local. Células mononucleares são então recrutadas, migrando da corrente sanguínea para o local da infecção. A presença de macrófagos infectados, circundados por macrófagos saudáveis e também por linfócitos, cria uma estrutura bastante característica da doença, o tubérculo ou granuloma (7).



Fonte: Russel DG, 2007.

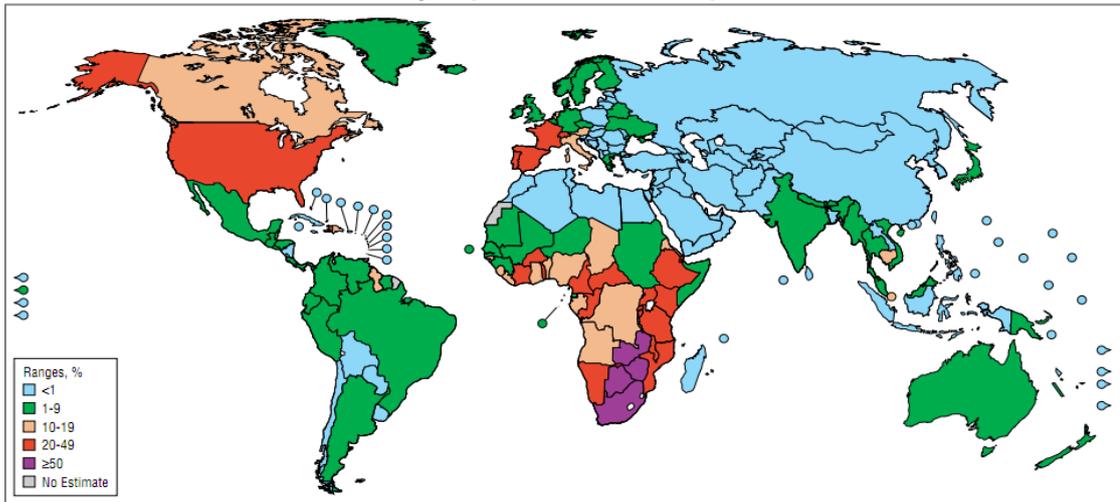
Nota: A) O bacilo entra no corpo do hospedeiro pelas vias aéreas e infecta macrófagos alveolares. B) Células mononucleadas são recrutadas pelos macrófagos para conter a infecção. C) e D) Formação do granuloma no pulmão do hospedeiro, constituído por macrófagos infectados, macrófagos saudáveis, linfócitos. E) Caso a infecção não seja controlada pelo sistema imune do hospedeiro, os macrófagos rompem-se e liberam as micobactérias. F) Um dos sintomas da doença é a tosse prolongada, a qual serve de porta de saída para o bacilo.

Apesar da formação do granuloma ser uma forma de proteção para o hospedeiro, as micobactérias conseguem sobreviver e se desenvolver dentro dos macrófagos alveolares (8). Aliás, estudos recentes apontaram que a formação do granuloma faz parte de um “programa de virulência” do patógeno, no qual a indução da formação desta estrutura traria vantagens ao próprio *Mtb*. O tubérculo oferece uma barreira às demais células do sistema imune do hospedeiro e às drogas anti-TB, além de fornecer o primeiro nicho intracelular para o desenvolvimento do patógeno (1).

Esta primeira fase da infecção é caracterizada por uma rápida replicação bacteriana dentro do granuloma, e seu término ocorre após duas ou três semanas, com o surgimento de linfócitos *Mtb*-específicos (9). Após esta fase, o sistema imune do hospedeiro controla a infecção, mantendo um número estável de micobactérias dentro dos granulomas altamente vascularizados. Nos indivíduos que apresentam progressão da doença, a vascularização no local da infecção diminui progressivamente, bem como o número de células que penetram o granuloma. Nos estágios finais da infecção, o granuloma torna-se hipóxico, induzindo a persistência não-replicativa do *Mtb*. Caso o sistema imune não consiga conter a infecção, os granulomas podem romper-se, liberando milhares de micobactérias viáveis na atmosfera, auxiliadas pela tosse do hospedeiro [Figura 3] (9).

Nos últimos anos, o *Mtb* tem encontrado um aliado na sua dispersão: o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Indivíduos HIV-positivos, além de terem um aumento no risco de reativar uma infecção latente pela micobactéria (chegando a 50% de chance), aumentam também o risco de uma progressão rápida da doença após uma nova infecção ou uma reinfecção pelo *Mtb*. A tuberculose é a patologia que mais causa mortes em adultos HIV-positivos de países em desenvolvimento e, à medida que o HIV se espalha, o *Mtb* também se dissemina [Figura 4] (10).

**Figura 4. Proporção dos indivíduos adultos portadores da tuberculose atribuídos à infecção pelo HIV em cada país.**



Fonte: Corbett EL, 2003.

Nota: de acordo com esta figura, a região sul da África apresenta a maior proporção de indivíduos HIV-positivos que também possuem tuberculose.

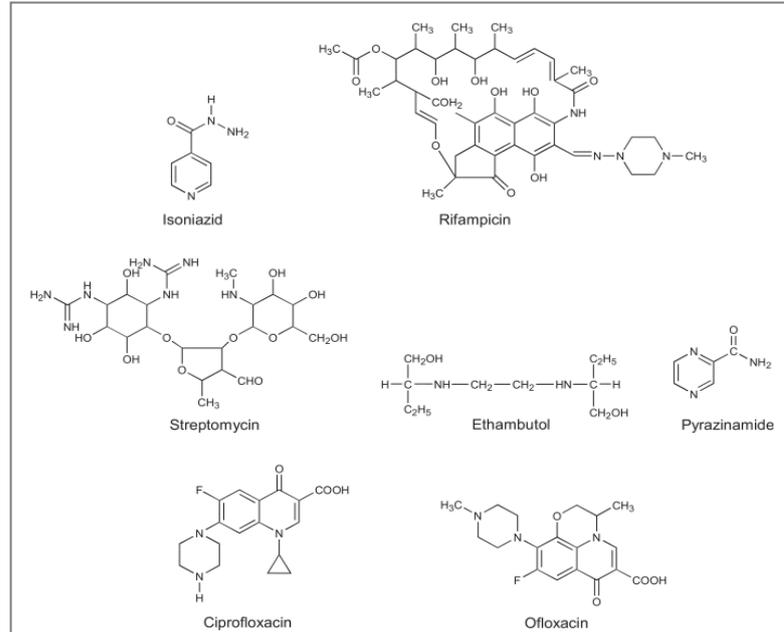
### 1.3 Tratamento da tuberculose humana

Segundo as recomendações da OMS, o tratamento da tuberculose deve ser feito de acordo com o histórico da doença no paciente, ou seja, os novos casos (pacientes não tratados previamente) possuem um tratamento diferente dos casos recidivantes (pacientes que já foram tratados) (1). Entretanto, ambos os tratamentos consistem no uso combinado de fármacos anti-TB que eliminem completamente a infecção pelo bacilo da tuberculose. Esta combinação de drogas evita o favorecimento de cepas resistentes a um medicamento, como, frequentemente, é o caso dos pacientes recidivantes.

O tratamento moderno da doença combina, primeiramente, as drogas isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida durante seis meses. Em certos casos, o paciente pode apresentar cepas resistentes à isoniazida, fazendo-se necessário o uso de outras drogas de primeira-linha, como a estreptomicina [Figura 5]. Estas drogas de primeira-linha têm uma alta eficácia no combate ao patógeno e oferecem baixa toxicidade ao paciente medicado (3, 6). Quando, porém, uma pessoa com tuberculose apresenta bacilos resistentes a alguns fármacos de primeira-linha, faz-se necessário administrar drogas de segunda-linha [Figura 6], como a etionamida, a cicloserina e o ácido para-aminosalicílico, as quais

apresentam menor eficácia no tratamento da doença e oferecem maior toxicidade ao paciente, em comparação às drogas de primeira-linha (3).

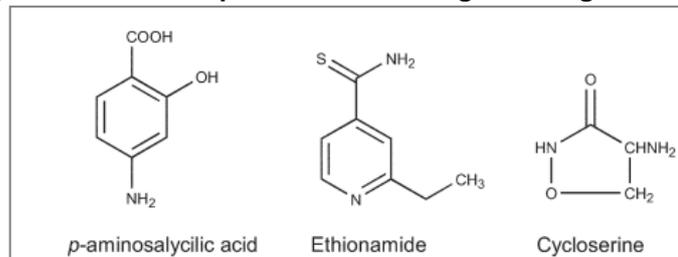
**Figura 5. Estrutura química das cinco drogas de primeira-linha.**



Fonte: Ducati RG, 2006.

Nota: estas drogas apresentam a maior eficácia no tratamento da doença, caso o indivíduo não possua cepas resistentes.

**Figura 6. Estrutura química de três drogas de segunda-linha.**



Fonte: Ducati RG, 2006.

Nota: estas drogas são mais caras e são menos eficazes se comparadas as de primeira-linha.

A OMS recomenda um tratamento para a tuberculose dividido em duas fases: a fase inicial (ou de ataque) e a fase de continuação (ou de manutenção). A fase inicial tem duração de aproximadamente dois meses, e consiste na administração de três ou mais drogas anti-TB de primeira-linha (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol), permitindo uma rápida eliminação dos bacilos presente no corpo e diminuindo as chances de sobrevivência de cepas resistentes a um determinado fármaco (11). A fase de continuação dá seguimento ao tratamento por mais quatro meses, porém com menos drogas sendo administradas (geralmente isoniazida e

rifampicina, caso não haja resistência a um destes medicamentos), permitindo que os bacilos restantes sejam eliminados totalmente (11). Este tratamento consegue curar mais que 95% das pessoas com tuberculose, caso o regime seja rigorosamente seguido (6).

Em casos de pacientes com cepas resistentes a, pelo menos, isoniazida e rifampicina, o tratamento torna-se mais complexo e demorado, visto que é necessário combinar de oito a dez drogas numa terapia com duração de 18 a 24 meses. Nos casos extremos de resistência, em que a cepa é resistente a medicamentos de primeira e de segunda-linha, o tratamento torna-se bem mais limitado, resultando em um número maior de óbitos (6).

Estes tratamentos seguem as recomendações feitas pela OMS, a qual lançou no seu Plano Global para Parar a Tuberculose (do inglês *The Global Plan to Stop TB*) a estratégia do TDO – Tratamento Diretamente Observado – (do inglês *DOTS – directly observed treatment short-course*). Esta estratégia procura diminuir o número de pacientes contaminados e o surgimento de cepas resistentes, através do acompanhamento regular dos doentes pelos profissionais da saúde para que assegurem o tratamento correto da doença (3). Entretanto, devido aos longos tratamentos, o TDO falha em algumas situações, principalmente na região de maior incidência da tuberculose - a África -, onde a taxa de cura não chega a 75% dos casos (12).

#### 1.4 Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos anti-TB

Nas duas últimas décadas, o mundo presenciou o recomeço da epidemia da tuberculose. Este crescimento no índice de pessoas doentes deve-se a diversos fatores, como a pandemia do HIV; o aumento de usuários de drogas injetáveis; o aumento da imigração de indivíduos de países emergentes para países desenvolvidos; o envelhecimento da população mundial; e, sobretudo, o aparecimento das cepas de *Mtb* resistentes às drogas existentes anti-TB (3).

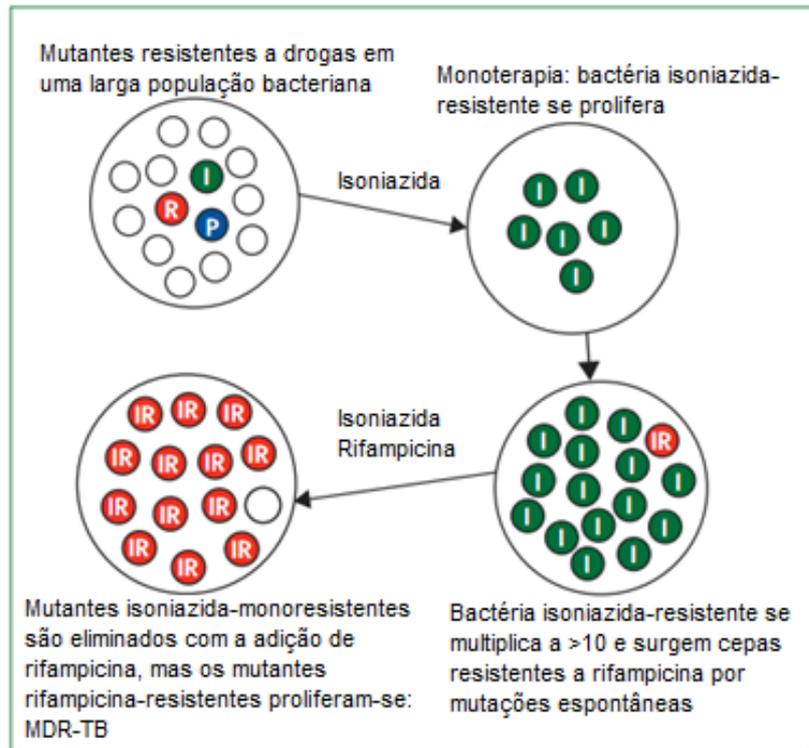
O bacilo causador da tuberculose humana tem uma resistência natural a muitos antibióticos e agentes quimioterápicos, principalmente devido a sua parede celular altamente hidrofóbica. Os únicos antibióticos atuais que conseguem combater a micobactéria são a isoniazida, o etambutol, aminoglicosídeos e rifamicinas, além das fluoroquinolonas (3). No entanto, devido às mutações

espontâneas que acontecem em diferentes genes do cromossomo da micobactéria, diversas cepas do bacilo apresentam resistência ou multirresistência aos medicamentos atuais (3, 13).

Algumas cepas de *Mtb* apresentam resistência à, pelo menos, isoniazida e rifampicina, as quais são responsáveis por causar a tuberculose multirresistente a drogas (MDR-TB). Outras cepas apresentam uma resistência ainda mais acentuada, as quais são resistentes a rifampicina e isoniazida, qualquer fluoroquinolona, e uma de três drogas injetáveis, como a capreomicina, a canamicina e a amicacina, causando a tuberculose extensivamente resistente a drogas (XDR-TB) (13). Estas cepas multirresistentes surgem, de forma espontânea, em pacientes com a tuberculose ativa, sendo selecionadas devido a uma pressão seletiva pelas drogas (13).

Três fatores contribuem positivamente para o aparecimento das cepas resistentes. O primeiro deles é o longo período de tratamento da doença, que dura aproximadamente seis meses. O segundo é os efeitos indesejáveis que os medicamentos podem trazer aos pacientes, mesmo aqueles considerados de primeira-linha, como a isoniazida. Por último, o desaparecimento precoce dos sintomas da doença, que ocorre após quatro ou seis semanas do início do tratamento (14). Juntos, estes fatores levam os pacientes doentes a acreditar que a doença tenha sido combatida, e, conseqüentemente, a abandonar o tratamento, apesar de os bacilos não terem sido totalmente eliminados. Caso algum bacilo sobreviva no corpo do paciente, este poderá dar origem às cepas resistentes aos fármacos (14) [Figura 7].

**Figura 7. Esquema de como ocorrem o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos anti-TB.**



Fonte: Adaptado de Gandhi NR, 2010.

Nota: I = isoniazida. R = rifampicina. P = pirazinamida. IR = rifampicina-resistente.

Atualmente o tratamento das cepas MDR-TB leva de 18 a 24 meses para ser concluído e requer uma combinação de oito a dez drogas, das quais apenas quatro foram desenvolvidas para tratar a tuberculose de fato (6). Já as cepas XDR-TB são mais difíceis de serem eliminadas, devido a sua vasta resistência aos antibióticos atuais. Além de não possuírem uma alta eficácia no combate à MDR-TB e à XDR-TB, os medicamentos utilizados para tratar as cepas resistentes trazem diversos efeitos colaterais aos pacientes, como nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade e disglucemia (6).

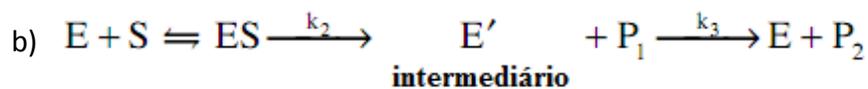
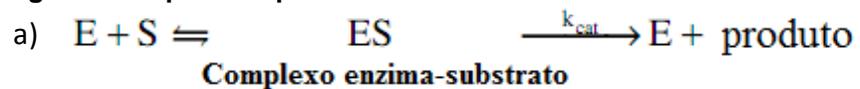
### 1.5 Desenvolvimento de novos fármacos anti-TB

As drogas que são usadas em tratamentos clínicos, em sua maioria, podem agir de duas formas diferentes: interferindo na interação entre um componente no corpo (agonista) e seu sítio de ação (receptor), como os receptores antagonistas; ou, interferindo no funcionamento de uma determinada enzima, importante para sobrevivência de um parasita causador de uma doença, por exemplo, como os

inibidores de enzimas, bastante visados atualmente para o desenvolvimento de fármacos (15).

As enzimas têm a propriedade de catalisar reações químicas, sem que elas próprias sejam alteradas. Elas são consideradas os catalisadores mais poderosos e seletivos já conhecidos. Para isso, uma enzima (E) precisa formar um complexo inicial (ES) com seus substratos (S) no seu próprio sítio ativo. Este complexo irá formar, através da catálise enzimática, um produto (P), que pode ser formado direta ou indiretamente, através de estágios intermediários (15, 16) [Figura 8].

**Figura 8. Esquema representativo de como ocorre a catálise enzimática.**



Fonte: Adaptado de Smith HJ, 2006.

Nota: catálise direta (a) e indireta (b). O símbolo  $k_{cat}$  indica a velocidade constante em que as moléculas de substrato são processadas por moléculas de enzima a cada segundo, enquanto que  $k_2$  e  $k_3$  indicam as taxas constantes da formação e quebra da molécula intermediária.

Células procarióticas e eucarióticas utilizam milhares de enzimas diferentes envolvidas nas mais diversas rotas metabólicas, cada uma catalisando uma determinada reação química e formando um metabólito final. Quando uma enzima para de funcionar, os substratos utilizados por ela podem acumular dentro da célula, e, conseqüentemente, os seus produtos deixam de ser produzidos. Isso acontece, por exemplo, quando inibidores enzimáticos são utilizados como fármacos para combater uma determinada doença. A interrupção de uma enzima diminui ou interrompe completamente a formação do seu produto, o que pode comprometer a sobrevivência do organismo afetado (15).

Uma das formas de se identificar um alvo enzimático para uma doença ou infecção é estudar as vias metabólicas do organismo de interesse nas quais esta enzima participa. Estes estudos visam o levantamento de dados sobre a enzima, como suas constantes cinéticas, sua forma tridimensional e sua seletividade, para que um inibidor enzimático específico possa ser desenhado para esta molécula (14, 17). Conhecer detalhadamente não só as velocidades das reações químicas de uma

enzima purificada com seus substratos, mas também com diferentes concentrações do produto, ou na presença de inibidores e ligantes reguladores, é de extrema importância para compreender a bioquímica de uma enzima (16). Muitos estudos atuais sobre tuberculose procuram identificar enzimas-alvo do *Mtb* que possam comprometer a sobrevivência do bacilo, caso um inibidor enzimático seja administrado (14, 17).

Na tentativa de controlar a expansão da epidemia da tuberculose no mundo, há uma urgência no desenvolvimento de novas drogas anti-TB. Estes novos fármacos devem cumprir alguns requisitos para que possam ser eficazes no tratamento da doença, como: diminuição do tempo de tratamento; capacidade de atingir cepas MDR e XDR; simplificação do tratamento, através da redução das pílulas diárias; e capacidade de ser coadministrados com drogas anti-HIV (6). No entanto, devido à economia desfavorável e à falta de incentivos governamentais, o desenvolvimento de novos fármacos ainda é um desafio para os pesquisadores. Durante os últimos 20 anos, aproximadamente 1.200 novas drogas foram aprovadas para serem comercializadas. Contudo, menos que 1% era destinado ao combate de doenças infecciosas encontradas predominantemente em países em desenvolvimento (18). A rifampicina, descoberta em 1963, foi a última droga aprovada para TB que apresentou um novo mecanismo de ação (6).

O aumento do crescimento das cepas MDR-TB em alguns países tem impulsionado as pesquisas relacionadas às drogas anti-TB. Isto porque, os pacientes que exibem resistência são tratados com drogas de segunda-linha, que além de serem mais caras, apresentam menor eficácia (18). No entanto, apesar de os medicamentos anti-TB serem necessários para combater a doença, novas drogas sozinhas não conseguirão resolver o problema, caso os programas governamentais não sejam modificados (18).

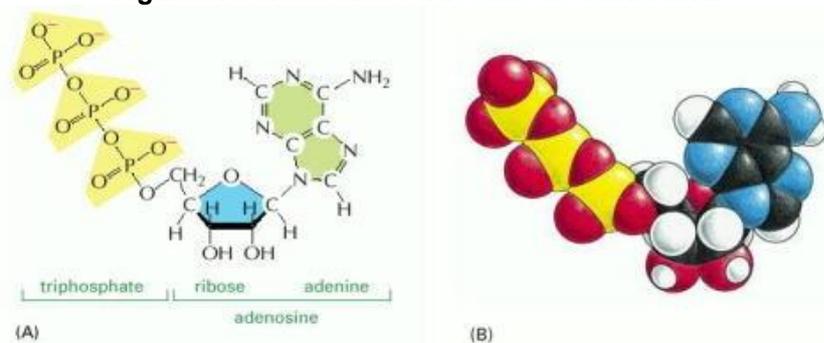
O sequenciamento do genoma do *Mtb* permitiu avanços na descoberta de novos alvos para combater a doença (6, 19). No entanto, o sucesso na identificação de novos candidatos a drogas, baseado no estudo do genoma, ainda é baixo, em parte pela dificuldade em identificar inibidores específicos (6). Além disso, os inibidores enzimáticos devem ser capazes de atravessar facilmente a parede celular altamente impermeável da micobactéria, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento de um fármaco (6).

## 1.6 Via de salvamento de purinas como alvo para o desenvolvimento de drogas anti-TB

O estudo da bioquímica básica de um organismo patogênico é o primeiro passo para o desenvolvimento de novas drogas contra uma determinada enfermidade (17). Isto porque, na maioria dos casos, é necessário que se faça uma comparação entre os componentes celulares do hospedeiro e do organismo invasor, para que seja evitada uma reação adversa do indivíduo tratado com a nova droga. Uma rota bioquímica bastante visada por muitos grupos de pesquisa é o metabolismo dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, devido a sua importância nos processos celulares na vida de todos os seres vivos (14, 17).

Os nucleotídeos são compostos formados por um anel que contém um nitrogênio (a base) ligado a um açúcar de cinco carbonos, o qual carrega um ou mais grupos fosfato. O açúcar pode ser tanto uma ribose, no caso dos ribonucleotídeos, quanto uma desoxirribose, no caso dos desoxinucleotídeos (16). As bases nitrogenadas que derivam de um anel com seis átomos são conhecidas por pirimidinas, como a citosina (C), a timina (T) e a uracila (U). As bases que possuem um segundo anel, de cinco membros, ligado ao anel de seis átomos, são conhecidas por purinas, como a guanina (G) e a adenina (A) (16). Os nucleotídeos desempenham diversas funções dentro da célula, tais como armazenar e disponibilizar a informação biológica; construir os ácidos nucleicos, como o ácido ribonucleico (RNA) e o ácido desoxirribonucleico (DNA); e atuar como carreadores de energia de curto prazo, como o trifosfato de adenosina (ATP) [Figura 9] (16, 17).

**Figura 9. O nucleotídeo trifosfato de adenosina.**



Fonte: Alberts B, 2010.

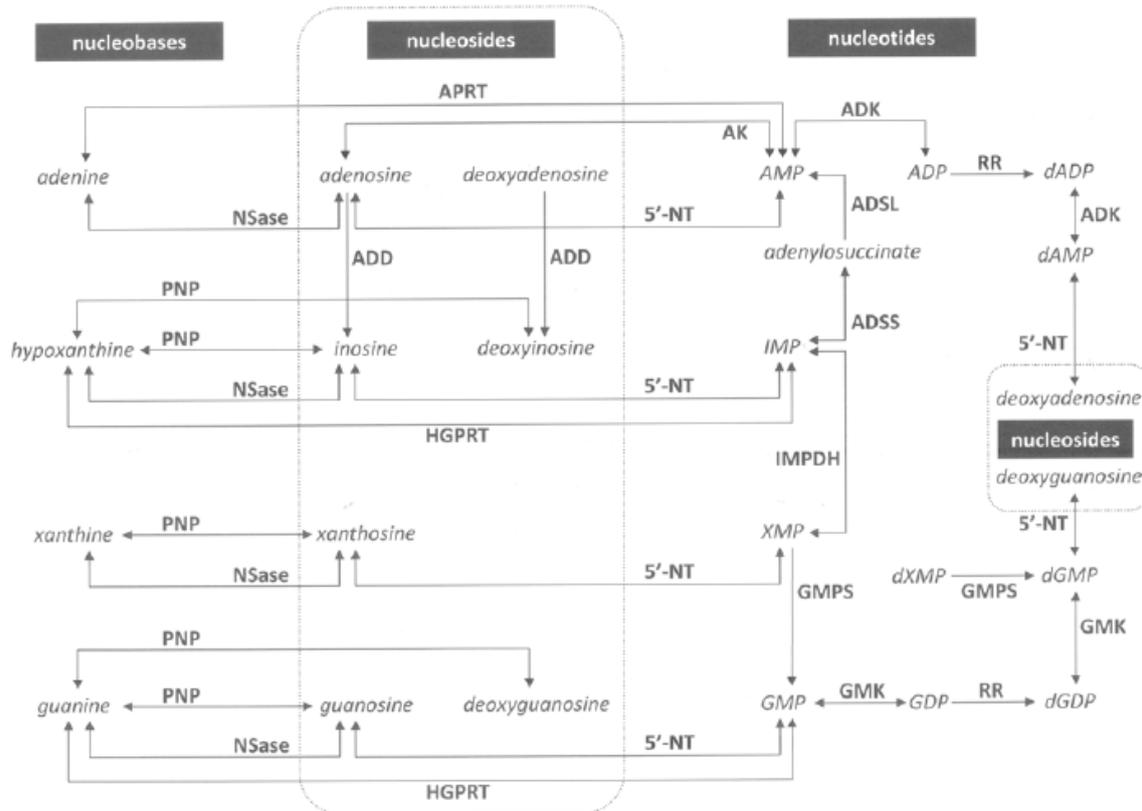
Nota: estrutura química (A) e representação tridimensional (B) da molécula de trifosfato de adenosina, um nucleotídeo usado como carreador de energia. Os nucleotídeos possuem na sua composição uma base nitrogenada e uma molécula de trifosfato ligado a uma pentose.

Em 1994, o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos EUA lançou um programa de incentivo à pesquisa de novas drogas anti-TB, o qual revelou diversos análogos de purinas que tinham seletividade contra componentes do bacilo da tuberculose (17). Este fato mostrou que as enzimas envolvidas no metabolismo das purinas podem servir de alvos para o desenvolvimento de novos fármacos com uma alta seletividade.

A formação dos nucleotídeos purínicos pode ocorrer através de uma rota bioquímica chamada de via de salvamento de purinas [Figura 10], na qual bases purínicas livres e nucleosídeos são convertidos em seus respectivos nucleotídeos; ou através da rota *de novo*, na qual os nucleotídeos são formados a partir de precursores simples. Os nucleotídeos AMP, GMP e IMP, por exemplo, podem ser formados a partir das bases livres adenina, guanina e hipoxantina, respectivamente, na rota de salvamento (14).

Sabe-se que o metabolismo de purinas está presente tanto em seres eucarióticos quanto em seres procarióticos, incluindo o *Mtb*, que expressa as enzimas de ambas as vias metabólicas (14). Não está bem claro como a micobactéria alterna entre as duas vias; porém, acredita-se que em situações de baixa energia disponível ou de rápida multiplicação, o bacilo utilize a via de salvamento para manter a disponibilidade de nucleotídeos (14). Além disso, sabe-se que o bacilo utiliza esta via quando absorve hipoxantina, guanina e adenina do meio externo, convertendo-os nos respectivos nucleotídeos (14).

‘Figura 10. Via de salvamento de purinas do *Mtb*.



Fonte: Ducati RG, 2011.

Nota: nesta via encontra-se a APRT, uma enzima importante na reciclagem das bases adeninas livres para formar AMP.

Informações relativas ao metabolismo de purinas do *Mtb* ainda são escassas, devido a pouca exploração desta via para o desenvolvimento de drogas. No entanto, o entendimento das enzimas envolvidas nesta rota pode levar à identificação de análogos de nucleosídeos, que poderiam diminuir a viabilidade do patógeno ou até mesmo eliminá-lo do hospedeiro (14). São exemplos das enzimas da via de salvamento de purinas a adenosina deaminase (EC 3.5.4.4, *add*, Rv3313c), a adenosina quinase (EC 2.7.1.20, *adoK*, Rv2202c), a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, Rv2232), a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.8, *htp*, Rv3624c), a adenina fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.1, *apt*, Rv2584c), a purina nucleosideofosforilase (EC 2.4.2.1, *deoD*, Rv3307), a purina nucleosidase (EC 3.2.2.1, *inH*, Rv3393), a inosina monofosfato dehidrogenase (EC 1.1.1.205, *guaB2*, Rv3411c), a adenilsucinato sintase (EC 6.3.4.4, *purA*, Rv0357c), a adenilossucinatoliase (EC 4.3.2.2, *purB*, Rv0777), a guanilato quinase (EC 2.7.4.8, *gmk*, Rv1389), a adenilato quinase (EC 2.7.4.3, *adk*, Rv0733) e a guanosina monofosfato sintase (EC 6.3.5.2, *guaA*, Rv3396c) (14) [Figura 10].

### 1.7 Adenina fosforibosiltransferase (APRT)

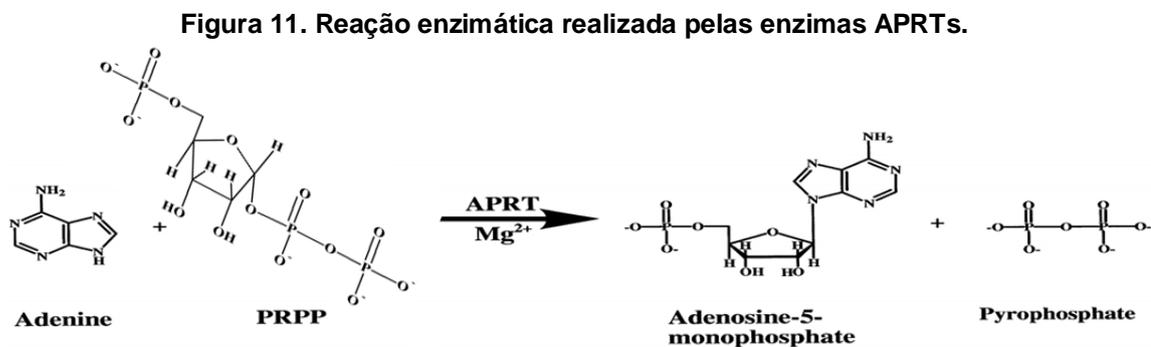
Em mamíferos e em outros organismos, existem enzimas que participam da via de salvamento de bases, reciclando bases purínicas pré-formadas para que sejam utilizadas no metabolismo celular destes seres. Esta via funciona principalmente durante períodos de rápido crescimento, como, por exemplo, na reprodução assexuada, na embriogênese e na proliferação tumoral (20, 21). Algumas destas enzimas fazem parte da família do tipo I das fosforibosiltransferases (PRTs), as quais realizam a catálise reversível da transferência de um grupo fosforibosil do composto fosforibosilpirofosfato (PRPP) para uma base purínica livre, como a adenina, a guanina, a hipoxantina e a xantina. Esta catálise requer um íon metálico divalente, geralmente  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , o qual se liga próximo ao sítio ativo das PRTs tipo I (20, 21). Sabe-se que o PRPP é o primeiro substrato a se ligar às fosforibosiltransferases, seguido da base livre, e que o primeiro produto a se desprender após a reação enzimática é o pirofosfato ( $PP_i$ ), antes do nucleotídeo formado (20).

As PRTs compartilham na sua estrutura uma região central composta por pelo menos cinco folhas- $\beta$  paralelas, cercadas por três ou mais hélices- $\alpha$ . Esta região central possui uma sequência conhecida como o motivo de ligação do PRPP  $\alpha$ -D-5'-fosforibosil-1-pirofosfato, o qual é responsável por ligar o anel da ribose e o 5'-fosfato do PRPP na enzima. Além disso, estas enzimas possuem um laço flexível dentro da sequência central, que fornece uma proteção ao sítio ativo durante a catálise (21). As PRTs I possuem também uma região estruturalmente variável, que faz o reconhecimento inicial da base e a definição da especificidade pelo substrato, chamada de "capuz". O sítio ativo destas enzimas fica entre a região central da enzima PRT e a região do capuz (21).

Uma das enzimas PRTs que contribui na via de salvamento de bases purínicas, através da síntese de adenosina monofosfato (AMP), é a adenina fosforibosiltransferase (14, 20). A APRT, também conhecida como AMP difosfosfato, AMP pirofosforilase ou transfosforibosidase, é uma enzima responsável por reciclar bases adeninas livres através da formação de AMP. Esta reação é reversível e depende da ligação do metal  $Mg^{2+}$  para acontecer, como ocorre nas demais PRTs [Figura 11] (22). Esta enzima é encontrada em diversos organismos vivos, como bactérias (*Escherichia coli*, *Mycoplasma mycoides*, *Mycobacterium tuberculosis*),

eucariotos basais (gênero *Leishmania*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Giardia lamblia*) e mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus pahari*), sendo que apenas as APRTs de *L. donovani*, *S. cerevisiae* e *G. lamblia* tiveram suas estruturas cristalográficas determinadas (22, 24).

As enzimas APRTs são subdivididas em dois grandes grupos: as APRTs-curtas (humana, *S. cerevisiae*, *E. coli*), as quais contêm na sua estrutura primária de 120 a 180 aminoácidos; e as APRTs-longas (*Leishmania* sp., *M. tuberculosis*), as quais possuem uma extensão C-terminal de 50 aminoácidos, totalizando 230 aminoácidos aproximadamente (14).



Fonte: Adaptado de Phillips CL, 1999.

Nota: os substratos da enzima são a adenina e o PRPP, enquanto que os produtos formados na catálise são o AMP e o PP<sub>i</sub>. Esta reação depende do Mg<sup>2+</sup> para acontecer.

Sabe-se que o bacilo da tuberculose utiliza tanto a via *de novo* quanto a via de salvamento de purinas no seu metabolismo, na qual a APRT participa. Contudo, acredita-se que em situações de baixa energia disponível ou de rápida multiplicação, o bacilo utilize as enzimas da via de salvamento para manter o fornecimento de nucleotídeos, principalmente quando há uma alta absorção de bases livres do meio externo (14). Esta via metabólica de *Mtb* ainda é pouco explorada com relação ao desenvolvimento de novas drogas anti-TB, visando principalmente o combate às cepas resistentes.

Com base nestas informações, torna-se importante o estudo de uma das enzimas ainda não explorada do bacilo, supostamente envolvida na via de salvamento de purinas: a APRT de *Mtb*. De acordo com a base de dados TubercuList, a *MtAPRT* (Rv2584c) é codificada a partir de um gene não-essencial *apt* com 672 pares de base. A enzima possui 223 aminoácidos, totalizando 23.155,60 Da de peso molecular, e um ponto isoelétrico (pI) de 10,13 (25). Baseado nas homologias das sequências com as APRTs de outros organismos e na

conservação da função desta enzima ao longo da evolução, a *MtAPRT* também deve catalisar a reação mostrada na Figura 11.

Visto que os estudos desta enzima visam o desenvolvimento de inibidores para a mesma, faz-se necessário comparar a *MtAPRT* com a APRT humana, com a finalidade de verificar principalmente a diferença entre elas. Seres humanos apresentam duas isoformas da enzima APRT, codificadas pelo mesmo gene *aprt*, o qual sofre um processo de *splicing*. Uma delas – a isoforma curta – apresenta 134 aminoácidos, enquanto que a outra – a isoforma longa – possui 180 aminoácidos. Sabe-se até o momento que estas duas enzimas apresentam 29% e 42% de identidade com a *MtAPRT*, respectivamente. Os estudos da APRT da micobactéria poderão revelar novas características desta enzima, a fim de se desenvolver um fármaco eficiente que não interaja com as proteínas do hospedeiro (14).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente a enzima adenina fosforibosiltransferase (APRT) de *Mycobacterium tuberculosis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de amplificação para o gene *apt* da cepa H37Rv de *Mtb*;
- Estabelecer protocolo de expressão e purificação da enzima *MtAPRT*;
- Determinar a identidade da proteína *MtAPRT* na sua forma homogênea;
- Testar a atividade enzimática da proteína *MtAPRT*;
- Obter as constantes cinéticas da enzima *MtAPRT*;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Local e Duração

Este projeto será desenvolvido no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS. O período de execução deste projeto é de dois anos (24 meses).

#### 3.2 Desenho de *primers* e amplificação do gene *apt*

Baseado na sequência genômica publicada da cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (19), um par de oligonucleotídeos de DNA (*primers*) será desenhado. Cada *primer* será complementar a região 3' de cada fita da dupla-hélice, correspondente ao gene *apt* de *Mtb* (Rv2584c) (25, 26). Além disso, os *primers* possuirão duas sequências de nucleotídeos *upstream*, que servirão como sítios de ligação para enzimas de restrição. O desenho dos oligonucleotídeos será feito com o software *Oligo Perfect™ Designer*, procurando-se manter uma alta especificidade e eficiência dos *primers* (27).

Estes oligonucleotídeos sintéticos serão usados numa Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), a qual permitirá uma amplificação rápida do gene *apt* (16, 28). Além dos *primers* sintéticos e do genoma do *Mtb*, serão necessários dNTPs, DMSO, MgCl<sub>2</sub> e a *Pfu* DNA Polimerase, que permite uma alta fidelidade na amplificação, devido, em parte, a sua atividade de exonuclease 3'→5' para autocorreção (29). A adição de determinados compostos, como o DMSO, pode aperfeiçoar a PCR, e, por isso, serão realizadas três reações distintas, variando-se a concentração deste composto entre 0, 5 e 10% (30, 31).

A amplificação do gene *apt* será confirmada com eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, e com o auxílio de um marcador de DNA de 1 kB (16, 28). Após este procedimento, a banda correspondente à amplificação (672 pb) será removida do gel e purificada, utilizando-se o *kit* comercial de purificação de gel para a extração de DNA *Quick Gel Extraction* (Invitrogen) (26).

### 3.3 Clonagem e subclonagem do gene *apt* purificado em vetores plasmidiais

Depois de estabelecer o protocolo de amplificação, o gene *apt* amplificado será ligado ao vetor plasmidial pCR-Blunt® (Invitrogen), com a finalidade de clonar esta sequência de DNA em células bacterianas, aumentando ainda mais o número de cópias do gene [Figura 12-A] (32, 33). Esta ligação será feita utilizando-se o *kit* de ligação do pCR-Blunt® (Invitrogen). O vetor recombinante (pCR-Blunt::*apt*) será inserido em células bacterianas de uma cepa de *Escherichia coli* eletrocompetente (DH10B) por eletroporação. Estas células transformadas serão primeiramente cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido em placa de petri, contendo o antibiótico canamicina, por aproximadamente 16 horas e sob uma temperatura de 37°C (26). O antibiótico canamicina será adicionado ao meio de cultura para impedir que as células sem o vetor recombinante se multipliquem, visto que o pCR-Blunt possui um gene de resistência a este antibiótico (32, 33).

Uma das colônias bacterianas formadas na placa será selecionada para ser cultivada em meio de cultura LB líquido em um *erlenmeyer*, também contendo o antibiótico canamicina. Estas células ficarão sob agitação em um *shaker* a uma temperatura de 37°C por aproximadamente 16 horas. Após este procedimento, as células recombinantes serão retiradas do meio de cultura, por centrifugação, e o plasmídeo recombinante será extraído através do *kit* de purificação *Qiaprep Spin Miniprep* (QIAgen) (32).

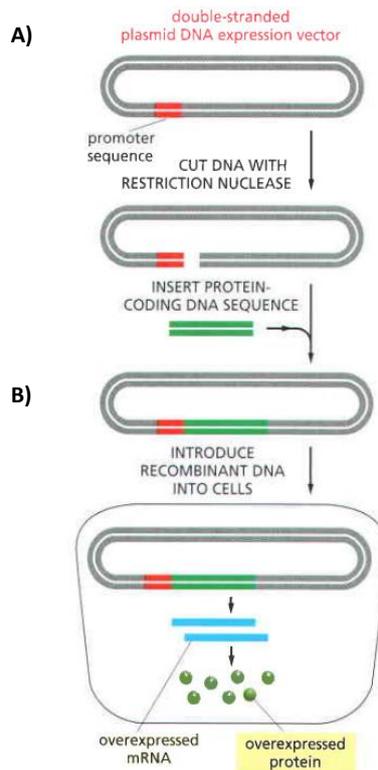
O vetor plasmidial contendo o gene será digerido pelas duas enzimas de restrição que possuem sítios de ligação no gene *apt*. Este procedimento irá desligar o vetor plasmidial do gene, para que ele possa ser ligado a um vetor plasmidial de expressão (subclonagem). Após a digestão pelas enzimas, o gene será separado do vetor através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio, e removido do gel, utilizando-se novamente o *kit* de purificação de gel *Quick Gel Extraction* (Invitrogen) (32).

O gene purificado será submetido a uma segunda ligação em um vetor plasmidial. Este segundo plasmídeo – pET-23a(+) (Novagen) - terá a função de expressar a proteína codificada pelo gene *apt* (26, 33). Os procedimentos necessários para realizar a ligação do gene ao vetor de expressão e para extrair o novo plasmídeo recombinante das células bacterianas são os mesmos descritos

anteriormente para o vetor de clonagem, com a exceção do antibiótico utilizado; diferentemente do primeiro vetor, o pET-23a(+) oferece resistência à ampicilina (26).

Uma amostra do plasmídeo purificado (pET-23a(+)::*apt*) será digerida com duas enzimas de restrição, para que seja confirmada a ligação do gene ao vetor plasmidial utilizando-se um gel de agarose 1% com brometo de etídio.

**Figura 12. Utilização de plasmídeos bacterianos para a expressão de proteínas.**



Fonte: Alberts B, 2008.

Nota: este esquema mostra de maneira simples como é feita a ligação de um gene recombinante num plasmídeo bacteriano. A) O plasmídeo precisa ser aberto com enzimas de restrição para criar extremidades coesivas, as quais vão se ligar à sequência do gene que também possui os sítios de ligação para as mesmas enzimas. B) O plasmídeo recombinante é inoculado em células de *E. coli*, para que a proteína seja superexpressa.

### 3.4 Determinação da identidade e integridade do gene *apt* por sequenciamento

A amostra contendo o pET-23a(+)::*apt* será quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro, visto que é necessária uma concentração mínima do vetor plasmidial recombinante para que sua sequência seja analisada. Após esta quantificação, uma alíquota será enviada ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para que seja realizado o sequenciamento automatizado de DNA por fluorescência (26). Este procedimento confirmará a

identidade e a integridade do gene clonado, verificando-se a ausência de mutações na sequência nucleotídica, para que os testes de expressão possam ser iniciados.

### 3.5 Superexpressão da enzima APRT de *Mtb* em células de *E. coli*

Após a confirmação da sequência gênica, serão iniciados os testes de expressão da enzima *MtAPRT*. Estes testes serão realizados em diferentes cepas de *E. coli* disponíveis no CPBMF, a fim de aumentar as chances de expressão da enzima. A *E. coli* é escolhida como hospedeira para a produção de proteínas heterólogas devido à sua fácil manipulação, rápido crescimento e ao fato de que muitas proteínas estranhas são bem toleradas e podem ser superexpressas pela bactéria (32).

As células de uma determinada cepa de *E. coli* serão submetidas à eletroporação, para que incorporem o plasmídeo recombinante pET23a(+):*apt* [Figura 12-B]. Este vetor utiliza promotores induzidos pelo composto IPTG (do inglês *isopropyl-β-D-thiogalactoside*), os quais expressam proteínas em níveis que superam 30% da massa total das proteínas bacterianas (32). Estas células serão primeiramente incubadas em dois *erlenmeyers* contendo meio LB líquido, os quais ficarão sob agitação em *shaker* (180 rpm), à 37°C, até que atinjam uma OD entre 0,4 e 0,6 (26, 33). Após atingirem a densidade esperada, será adicionado a um dos *erlenmeyers* o composto IPTG, que terá a função de induzir a expressão dos genes plasmidiais. As células do segundo *erlenmeyer* não serão induzidas por IPTG, visto que em alguns casos há superexpressão da proteína sem a necessidade deste composto tóxico às células (26, 33). As células ficarão sob agitação por aproximadamente 24h. Serão realizadas, pelo menos, cinco coletas em diferentes períodos (3, 6, 9, 12 e 24h), para verificar em quais momentos há superexpressão da enzima. Estas alíquotas serão armazenadas a -20°C. Um controle negativo do teste será feito conjuntamente, no qual célula da mesma cepa escolhida para o teste serão eletroporadas para incorporarem um plasmídeo sem o gene *apt* (33).

Após todas as coletas terem sido concluídas, as células serão rompidas por ultrassom e centrifugadas, para separar as frações solúveis e insolúveis da amostra. A confirmação da superexpressão da *MtAPRT* (23,1 kDa) será feita pela separação por tamanho por eletroforese vertical em SDS-PAGE de ambas as frações, no qual também será verificado se a proteína está na porção solúvel ou insolúvel (16, 26,

33). Para que sejam iniciados os procedimentos da purificação da proteína, é essencial que a mesma não esteja agrupada em corpos de inclusão (34). Após a confirmação da superexpressão da *MtAPRT*, a banda correspondente à proteína será recortada do gel e será submetida a um protocolo de purificação do gel para ser analisada em espectrometria de massa. Este procedimento permitirá confirmar a identidade desta banda, através da comparação dos peptídeos que formam esta proteína com a sequência da base de dados (35).

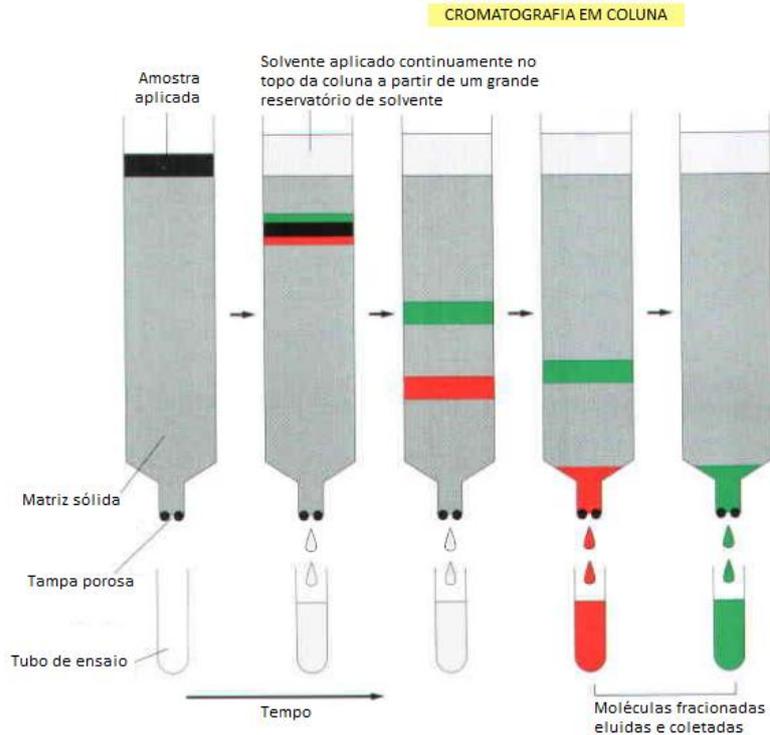
### 3.6 Purificação da enzima APRT solúvel de *Mtb*

Depois de estabelecer o protocolo de expressão para a *MtAPRT* na fração solúvel, serão iniciados os testes de purificação desta enzima. Para isso, as células serão cultivadas em maior escala. Após todos os procedimentos para o crescimento celular e para a superexpressão da *MtAPRT*, as células serão rompidas por ultrassom e centrifugadas, para que a fração solúvel seja separada da fração insolúvel (26, 36).

A amostra contendo a *MtAPRT* será submetida à técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) usando o sistema *Äkta Purifier (GE Healthcare)*. Serão testadas as colunas [Figura 13] disponíveis no CPBMF, as quais contêm uma matriz sólido porosa por onde a amostra irá passar (16, 36). Esta técnica permite a separação da proteína dos demais contaminantes pela sua carga (cromatografia de troca iônica), sua hidrofobicidade (cromatografia hidrofóbica), seu tamanho (cromatografia de filtração em gel) ou sua capacidade de se ligar a determinadas moléculas em particular (cromatografia de afinidade) (16, 36).

A amostra eluída de cada coluna será analisada em SDS-PAGE, para que seja estabelecido o protocolo de purificação da *MtAPRT* na sua forma homogênea e ativa.

**Figura 13. Representação das colunas cromatográficas utilizadas na purificação de proteínas.**



Fonte: Adaptado de Alberts B, 2010.

Nota: as colunas cromatográficas permitem a remoção de diversos contaminantes, liberando apenas a proteína purificada. Cada coluna possui uma característica diferente, de maneira que seja possível escolher a forma como a coluna vai interagir com a proteína.

### 3.7 Quantificação da *MtAPRT* homogênea pelo método de Bradford

A quantificação da enzima *MtAPRT* será feita com o *kit Bio-Rad Protein Assay* (BIORAD), baseado no método de Bradford e com o auxílio de um espectrofotômetro (26, 37). Este método utiliza BSA para gerar uma curva padrão, a qual será usada para quantificar a amostra contendo a enzima. Este procedimento fornecerá o valor da concentração de proteína homogênea obtida da purificação, que será usado nos cálculos dos ensaios enzimáticos.

### 3.8 Teste de atividade enzimática e determinação das constantes cinéticas

Os ensaios enzimáticos serão realizados de acordo com a reação descrita pela literatura para as enzimas APRTs [Figura 11]. Em uma cubeta de quartzo (caminho ótico de 1 cm) serão adicionados os substratos PRPP e a base adenina livre, além de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ). O tampão utilizado na reação será o Tris-HCl, pH 7,5, mantido a uma temperatura de 37°C. O volume final desta reação

será de 0,5 ml. Por último será adicionada a *MtAPRT* homogênea, a qual dará início à reação. O espectrofotômetro UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu) e o software SIGMAPlot 9.0 serão utilizados para medir a conversão de adenina em AMP num comprimento de onda de 256 nm ( $\Delta\epsilon = 2.13 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (22, 23).

Os ensaios enzimáticos fornecerão os parâmetros cinéticos aparentes do estado-estacionário, como o  $K_m$  para a adenina e para o PRPP, que indica a concentração de substrato que permite que a reação alcance a metade de sua velocidade máxima (um indicador da afinidade da enzima pelos seus substratos), e a  $V_{m\acute{a}x}$ , o qual mostra a velocidade máxima que a enzima pode atingir para converter seus substratos em produtos. Os ensaios serão realizados variando-se a concentração de um dos substratos (adenina ou PRPP) e fixando a concentração saturante do outro. O  $K_m$  é numericamente igual à concentração do substrato [S] quando a velocidade está na metade do máximo alcançável ( $V = 0,5 V_{m\acute{a}x}$ ) (16, 38).

A constante de inibição ( $K_i$ ) para o produto AMP contra o PRPP será encontrada através de uma reação em que se mantém a adenina constante numa concentração não saturante, enquanto que se varia a concentração do PRPP e do AMP. Para determinar o  $K_i$  e o tipo de inibição contra a adenina, mantém-se o PRPP constante numa concentração não saturante, enquanto que se varia a concentração da adenina e do AMP. Para realizar este tipo de reação, a concentração da enzima deve ser mantida constante (38).

A estabilidade térmica da enzima também será determinada. Para isso, a *MtAPRT* purificada será aquecida na ausência de substratos de 5 a 10 minutos, resfriada no gelo e posteriormente ensaiada com seus respectivos substratos numa temperatura de 37°C (38). Além disso, a enzima será colocada a diferentes temperaturas (-80°C, -20°C, temperatura ambiente) em diferentes períodos de tempo (1 dia, 1 semana, 1 mês) para que se verifique se a mesma apresenta alterações na sua atividade, o que permitirá definir a forma de armazenamento.

Para medir a efetividade de uma determinada enzima, é possível usar a comparação da relação  $k_{cat}/K_m$  para a mesma enzima com seus diferentes substratos como parâmetro. O  $k_{cat}$  indica uma velocidade constante que tem valor igual ao número de moléculas de substrato processadas por moléculas de enzima a cada segundo e, para descobri-lo, será necessário dividir o valor encontrado para  $V_{m\acute{a}x}$  pela concentração de enzima usada na reação (15, 16).

Através da obtenção destas constantes cinéticas será possível determinar as características bioquímicas da *MtAPRT in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *The Lancet*. 2011;378:57-72.
2. Global tuberculosis control: WHO report 2010 [Base de dados da internet]. WHO. 2010 [citado em 22/09/2011]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf).
3. Ducati RG, Ruffino-Neto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Rio de Janeiro: Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;697-714.
4. Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2011;284.
5. Ministério da Saúde. Brasil reduz casos novos de tuberculose. 2011 [citado em 2011 28/09/2011]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=12351](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=12351).
6. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011;483-90.
7. Russel, DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Micro*. 2007;5(1):39-47.
8. Madigan M, Martinko JM, Dunlap PV, Clarck DP. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
9. Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science*. 2010;852-6.
10. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Ravibhione MC, et al. The Growing Burden of Tuberculosis: Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic. *Arch of Inter Med*. 2003;163(9):1009-21.
11. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 2007;687.
12. Sharma SK, Liu JJ. Progress of DOTS in global tuberculosis control. *Lancet*. 2006;951-2.
13. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, Van Soolingen D, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*. 2010; 375.
14. Ducati RG, Breda A, Basso LA, Santos DS. Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem*. 2011;1258-75.
15. Smith HJ, Simons C. Enzymes and their inhibition. *Drug development. Biochemistry*. 2006;71(5):582-.

16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Water P. *Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
17. Parker WB, Long MC. Purine Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a Target for Drug Development. *Curr Phar Des*. 2007;13(6):599-608.
18. O'brien RJ, Nunn PP. The Need for New Drugs against Tuberculosis: Obstacles, Opportunities and Next Steps. *Amer Jour of Resp and Crit Care Med*. 2001;163(5):1055-8.
19. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
20. Craig SP, Eakin AE. Purine Phosphoribosyltransferases. *Journal of Biol Chem*. 2000;275(27):20231-4.
21. Phillips CL, Ullman B, Brennan RG, Hill CP. Crystal structures of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. *EMBO J*. 1999;18(13):3533-45.
22. Bashor C, Denu JM, Brennan RG, Ullman B. Kinetic Mechanism of Adenine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. *Biochemistry*. 2002;41.
23. Sin IL, Finch LR. Adenine Phosphoribosyltransferase in *Mycoplasma mycoides* and *Escherichia coli*. *The Jour of Bact*. 1972;112(1):439-44.
24. Silva M, Silva CHTP, Iulek J, Oliva G, Thiemann OH. Crystal structure of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania tarentolae*: potential implications for APRT catalytic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1696(1):31-9.
25. TubercuList World-Wide Web Server [Base de dados na internet]. 2008 [citado em 24/08/2011]. Disponível em: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>.
26. Biazus G, Schneider CZ, Palma MS, Basso LA, Santos DS. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Cloning, expression, and biochemical characterization. *Prot Expres and Purif*. 2009; 66(2):185-90.
27. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *Genome Research*. 1993;3(3):S30-S7.
28. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3th. 2001.
29. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(18):3546-51.
30. Frackman S, Kobs G, Storts S, Storts D. Betaine and DMSO Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*. 1998.

31. Bachmann B, Luke W, Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(5):1309.
32. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3th. 2001.
33. Silva RG, Carvalho LP, Oliveira JS, Pinto CA, Mendes MA, Palma MS, et al. Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase. *Protein Expr Purif.* 2003;158-64.
34. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* 2005;303-10.
35. Edwards NJ. Protein identification from tandem mass spectra by database searching. *Methods Mol Biol.* 201;694:119-38.
36. Amersham Biosciences. *Protein Purification: Handbook 2001.* [citado em 30/09/11]. Disponível em: <http://www.genomics.bham.ac.uk/Documents/ProteinPurification.pdf>.
37. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;248-54.
38. Alfonzo JD, Sahota A, Taylor MW. Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1997;173-82.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

Ano	2012												2013												
Meses	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	
Atividades																									
Revisão Bibliográfica																									
Desenho de primers e amplificação do gene <i>apt</i>																									
Clonagem e subclonagem																									
Sequenciamento do gene																									
Superexpressão da APRT																									
Purificação da APRT																									
Quantificação da proteína																									
Sequenciamento da APRT																									
Testes enzimáticos																									
Análise dos Resultados																									
Redação do Artigo Científico																									
Divulgação dos Resultados																									

## APÊNDICE B - ORÇAMENTO

Material Geral:

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Falcon (15 mL)	1	168,00
Falcon (50 mL)	1	175,00
Caixa de Luva	4	750,00
Ponteira Gilson (1000 µL)	500 U	593,00
Ponteira Gilson (200 µL)	500 U	593,00
Ponteira Gilson (10 µL)	500 U	593,00
Corante para gel de proteína	2 L	48,00
Descorante para gel de proteína	2 L	30
Solução secante para gel de proteína	2 L	18,00
Clorofina	5 L	10,00
Álcool 70°	5 L	44,00
Kit Bradford	1	416,00
Kit Miniprep	1	428,00
Célula Eletrocompetente	-	1500,00
Marcador de proteína	1	190,00
Marcador de DNA	1	184,00
<b>TOTAL (2 anos) =</b>		<b>R\$ 5.740,00</b>

Materiais para a amplificação do gene *apt*:

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Primer 1 Forward	1	168,00
Primer 2 Reverse	1	175,00
dNTPs	4	750,00
Pfu DNA Polimerase	500 U	593,00
<b>TOTAL =</b>		<b>R\$ 1.686,00</b>

## Materiais para a clonagem e subclonagem:

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Enzima de Restrição 1	20 U	265,00
Enzima de Restrição 2	10 U	178,00
Vetor pCR-Blunt	5 reações	550,00
Vetor pET23a(+)	6 reações	427,00
Célula eletrocompetente	-	1500,00
<b>TOTAL =</b>		<b>R\$ 2.920,00</b>

## Materiais para a eletroforese de gel agarose e acrilamida:

Descrição	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Agarose	1 frasco (500 g)	1860,00	1860,00
Poliacrilamida	1 frasco (500 g)	230,00	230,00
Temed	1 frasco (50 mL)	430,00	430,00
APS	1 frasco (100 g)	33,80	33,80
Tris	1 frasco (1000 g)	762,00	762,00

Ácido Bórico	1 frasco (1000 g)	217,00	217,00
EDTA	1 frasco (500 g)	138,00	138,00
<b>TOTAL</b> (para 5 ensaios com cada gel: poliacrilamida e agarose) =			<b>R\$ 3.670,80</b>

Materiais para os testes de expressão da APRT:

Descrição	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
SOC Invitrogen	1 mL	2,77	2,77
Cubeta de Eletroporador	2 unidades	3,50	7,00
Placa de Petri	4	0,30	1,20
Meio de Cultura Luria-Bertani	200 mL	3,50	3,50
Antibióticos	-	-	-
IPTG 1 M	10 µL	59,41 / mL	2,63
SDS-PAGE	4 unidades	25,00	100,00
<b>TOTAL</b> (para 1 Teste de Expressão) =			<b>R\$ 117,10</b>
<b>TOTAL</b> (para 6 meses, considerando 3 por mês) =			<b>R\$ 2.107,80</b>
<b>TOTAL</b> (para 1 Eletroporação) =			<b>R\$ 14,47</b>
<b>TOTAL</b> (para 6 meses, considerando 3 por mês) =			<b>R\$ 260,46</b>
<b>TOTAL</b> =			<b>R\$ 2.499,83</b>

Materiais para a purificação da APRT:

Descrição	Quantidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Eletroporação	1	14,47	14,47
Meio de Cultura Luria-Bertani	4 L	11,64 / L	46,56

Antibióticos	para 4 L	13,17 / L	52,68
IPTG 1 M	400 µL	59,41 / mL	23,76
Tampão de Purificação	12 L	25,90 / L	310,80
SDS-PAGE	6 unidades	25,00	150,00
<b>TOTAL (para 1 purificação) =</b>			<b>R\$ 598,27</b>
<b>TOTAL (para 4 meses, considerando 1 por mês) =</b>			<b>R\$ 2.393,08</b>

Materiais para os testes enzimáticos:

Descrição	Quantidade	Valor Total (R\$)
Base Adenina	1 g	59,60
PRPP	50 mg	150,00
<b>TOTAL =</b>		<b>R\$ 209,60</b>

<b>Custo Total Estimado do Projeto =</b>	<b>R\$ 19.191,31</b>
--	----------------------