

LEILANE FERREIRA TEIXEIRA

**SERINE-ARGININE PROTEIN KINASES (SRPKs) COMO POTENCIAL ALVO
DE FÁRMACOS EM *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GÉRIAS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T266s
2018
Teixeira, Leilane Ferreira, 1994-
*Serine-arginine protein kinases (SRPKs) como potencial
alvo de fármacos em Leishmania braziliensis* / Leilane Ferreira
Teixeira. – Viçosa, MG, 2018.
vii, 99 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 75-87.

1. Enzimas. 2. Leishmaniose. 3. Farmacologia veterinária.
4. Inibidores. 5. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

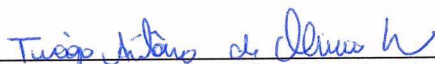
CDD 22. ed. 572.7

LEILANE FERREIRA TEIXEIRA

**SERINE-ARGININE PROTEIN KINASES (SRPKs) COMO POTENCIAL ALVO
DE FÁRMACOS EM *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

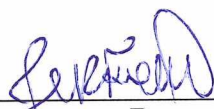
APROVADA: 31 de julho de 2018.



Tiago Antônio de Oliveira Mendes



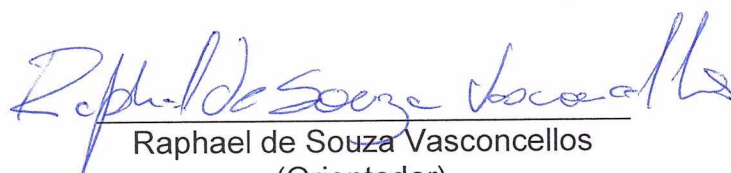
Róbson Ricardo Teixeira



Juliana Lopes Rangel Fietto
(Coorientadora)



Gustavo Costa Bressan
(Coorientador)



Raphael de Souza Vasconcellos
(Orientador)

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	4
2.1. Leishmanioses.....	4
2.2. Ciclo de vida do parasito.....	10
2.3. Formas de tratamento.....	12
2.4. Terapia combinada ou multidrogas.....	14
2.5. SRPK como potencial alvo de fármacos em Leishmania.....	16
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. Metodologia	21
4.1. Busca em bancos de dados por SRPKs e proteínas SR em Leishmania braziliensis.....	21
4.2. Cultura de células	22
4.3. Curva de crescimento de L. braziliensis M2904	22
4.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	22
4.5. Clonagem das sequências gênicas que codificam a possível SRPK (LbSRPK) e a possível proteína SR (LbSR) de L. braziliensis em vetor de expressão	23
4.6. Expressão das proteínas recombinantes em Escherichia coli	24
4.7. Purificação das proteínas	25
4.8. Construção dos modelos tridimensionais das proteínas e ensaios de docking molecular com a LbSRPK truncada.....	26
4.9. Análise de propriedades físico-químicas dos compostos	28
4.10. Detecção da viabilidade celular	29
4.11. IC ₅₀ dos compostos SRVIC22 e SRVIC32 em macrófagos RAW 264.7 e em promastigotas	30
4.12. Avaliação, in vitro, do efeito dos compostos combinados.....	31
4.12.1. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos	31
4.12.2. Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas	32

4.12.3. Avaliação da atividade leishmanicida em ensaios de infecção in vitro	32
4.13. Análise da expressão da possível SRPK em <i>L. braziliensis</i> por qPCR	34
4.14. Análises estatísticas	35
4.15. Experimento in vivo.....	35
4.15.1. Modelo animal.....	35
4.15.2. Grupos experimentais e análise estatística.....	36
4.15.3. Avaliação da toxicidade dos compostos.....	37
5. Resultados e discussão.....	38
5.1. Busca em bancos de dados.....	38
5.2. Curva de crescimento de <i>L. braziliensis</i> M2904	42
5.3. Clonagem das sequências que codificam a LbSRPK e a LbSR em vetor de expressão	43
5.4. Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	46
5.5. Purificação das proteínas	50
5.6. Construção dos modelos tridimensionais das proteínas.....	56
5.7. Ensaio de docking molecular com a LbSRPKt e análises físico-químicas dos compostos	58
5.8. IC50 dos análogos SRVIC22 e SRVIC32 em macrófagos RAW 264.7 e promastigotas	62
5.9. Avaliação, in vitro, do efeito dos compostos combinados.....	63
5.10. Análise da expressão da LbSRPK por qPCR	65
5.11. Avaliação da toxicidade dos análogos SRVIC22 e SRVIC32 in vivo	67
6. Conclusões	72
7. Perspectivas	74
8. Referências Bibliográficas	75
Anexo 1	88
Anexo 2	89
Anexo 3	90
Anexo 4	91
Anexo 5	93

RESUMO

TEIXEIRA, Leilane Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Serine-arginine protein kinases (SRPKs) como potencial alvo de fármacos em *Leishmania braziliensis***. Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos. Coorientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto e Gustavo Costa Bressan.

As leishmanioses representam uma das sete doenças tropicais mais importantes, sendo um grave problema de saúde mundial. As terapias disponíveis são problemáticas, tornando-se de grande interesse a identificação e validação de novos alvos, para desenvolvimento de terapias mais seletivas e eficazes. As serine-arginine protein kinases (SRPKs) se destacam como alvos promissores. SRPKs participam de processos celulares importantes, como o processamento do mRNA, onde atuam regulando as proteínas SR (fatores de splicing). Diante disto, este trabalho teve como objetivo identificar possíveis SRPKs e proteínas SR em *Leishmania braziliensis* através de análises bioinformáticas, clonar as sequências que codificam tais proteínas, expressar e purificar as proteínas recombinantes, bem como avaliar o efeito leishmanicida de compostos desenhados para atuarem como inibidores de SRPKs. As análises de bioinformática identificaram pelo menos uma possível SRPK e uma possível proteína SR em *L. braziliensis*. As sequências que codificam as proteínas foram clonadas em vetor pET-28a para expressão em *Escherichia coli* e tiveram sua expressão padronizada. Com a purificação por afinidade, as proteínas foram parcialmente purificadas, observando-se a necessidade do uso de outras técnicas para se obter um grau de pureza mais elevado. Através do docking vimos que o SRVIC22 e SRVIC32 podem interagir com a proteína no seu sítio de ligação de ATP e, embora não apresentem os maiores valores de docking score, algumas características físico-químicas ajudam a explicar sua melhor atividade *in vitro*. Quando utilizados em conjunto os compostos não foram tóxicos para os macrófagos e foram capazes de reduzir a infecção, *in vitro*, de macrófagos por *L. braziliensis*. O tratamento com o composto SRVIC32 ou com a combinação dos compostos (SRVIC22+SRVIC32) também levaram à uma

alteração no nível de expressão da possível SRPK. A avaliação da toxicidade dos compostos in vivo mostrou que, embora as análises bioquímicas do sangue não apresentassem alteração, na maior dose utilizada foram observadas algumas alterações histológicas no fígado. A obtenção das proteínas purificadas permitirá a realização de ensaios para caracterização bioquímica, que poderão confirmar se são uma SRPK e uma proteína SR genuínas, e para a validação da SRPK como alvo terapêutico. Dentre os compostos, o SRVIC32 se mostrou um candidato mais promissor, podendo ser melhor explorado na busca por novas terapias contra a leishmaniose.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Leilane Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Serine-arginine protein kinases (SRPKs) as potencial drugs targets in *Leishmania braziliensis***. Adviser: Raphael de Souza Vasconcellos. Co-advisers: Juliana Lopes Rangel Fietto and Gustavo Costa Bressan.

Leishmaniasis are one of the seven more important tropical diseases, it been a serious health problem worldwide. The available therapies are problematic, so is interesting the identification and validation of new targets for new therapies more selective and effective. The serine-arginine protein kinases (SRPKs) stand out as promising targets. SRPKs are involved in important cellular process such as mRNA processing, where they acting regulating SR proteins (splicing factors). Therefore, this work aimed the identification of possible SRPKs and SR proteins in *Leishmania braziliensis* by the bioinformatics analysis, cloning the sequences that code that proteins, and express and purify the recombinants proteins, as well as evaluate the leishmanicidal effect of compounds designed to act as SRPKs inhibitors. Bioinformatics analysis identified at least one possible SRPK and one possible SR protein in *L. braziliensis*. These sequences were cloned in pET-28a vectors to express in *Escherichia coli* and had their expressions standardized. With affinity purification the proteins were partially purified, observing the need to use others techniques to obtain a higher purity degree. By docking we found that, SRVIC22 and SRVIC32 can interact with the protein in ATP ligation site and although they do not present the higher values of docking score, some physical-chemical characteristics help to explain they better in vitro activity. When we used the compounds together, there wasn't cytotoxicity in macrophages, but they were be able to reduce in vitro infection of macrophages by *L. braziliensis*. The treatment only with SRVIC32 or with the compounds together (SRVIC22+SRVIC32) also led to alteration in an expression degree of possible SRPK. The in vivo toxicity evaluation of compounds showed that, although the blood biochemistry analysis didn't presented alteration, with the higher dose used were observed some histologic alterations on liver. The obtaining of purified

proteins will permit make biochemistry characterization assays, which may confirm if those proteins are really SRPK and SR protein and to validate SRPK as therapeutic target. Between the compounds, the SRVIC32 showed a promisor candidate, being able better explored on search by new therapies against leishmaniasis.

1. Introdução

As leishmanioses, doenças difundidas em áreas tropicais e subtropicais, são encontradas em cerca de 98 países da Europa, África, Ásia e América. Entretanto, mais de 90% dos novos casos ocorrem em apenas 13 países (Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria) (Steverding, 2017). Dentre estes, o Brasil se destaca como um dos países com maior número de novos casos reportados, anualmente, das duas formas principais da doença, a leishmaniose cutânea e a visceral (World Health, 2015).

Causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, um parasito intracelular, as leishmanioses representam uma das sete doenças tropicais mais importantes e são consideradas um grave problema de saúde mundial, devido ao seu amplo espectro de manifestações clínicas (Torres-Guerrero et al., 2017). A forma mais severa da doença, a leishmaniose visceral, é potencialmente fatal quando não tratada, o que depende também do estado imunológico do indivíduo, já que esta forma da doença tem sido comumente encontrada associada a diferentes condições imunossupressoras, como na co-infecção com o vírus HIV e em indivíduos transplantados, com problemas reumatológicos, hematológicos ou oncológicos (van Griensven et al., 2014).

As leishmanioses apresentam algumas opções de tratamento, como antimoniais pentavalentes (Pentostam[®] e Glucantime[®]), anfotericina B em formulações lipídicas ou não, isetionato de pentamidina, miltefosina e paromicina (Cruz et al., 2009; Mohammadzadeh et al., 2013; Monge-Maillo et al., 2013; McGwire et al., 2014). As terapias disponíveis estão distantes de serem ideais, isto por causa de suas toxicidades extensas, o que leva à uma série de efeitos colaterais, como arritmias cardíacas, taquicardia e fibrilação ventricular, mialgia, artralgia, dentre outros. Além disto, apresentam baixa eficácia, via de administração parenteral, altos custos e necessidade de grande número de doses, o que torna o tratamento muito longo (Zulfiqar et al., 2017). Um outro problema é a incidência crescente de resistência dos parasitos aos fármacos utilizados no tratamento (Sundar et al., 2015; Sundar et al., 2016; Zulfiqar et al.,

2017). Diante disto, é de essencial importância o desenvolvimento de novos medicamentos, que possam substituir ou complementar as terapias disponíveis atualmente, despertando o interesse na identificação e validação de novos alvos para os fármacos (Naula et al., 2005; Tiunan et al., 2011; Negro et al., 2017).

As proteínas cinases representam alvos promissores de fármacos, uma vez que participam da regulação de diferentes processos celulares importantes, como controle da transcrição, progressão do ciclo celular e diferenciação, despertando grande interesse como alvo para o tratamento de doenças como Alzheimer, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer (Naula et al., 2005). Dentro desta classe de enzimas, a família das serine-arginine protein kinases (SRPKs) atuam fosforilando proteínas SR, fatores de splicing importantes para o correto processamento do pré-mRNA. Desta forma, elas têm sido associadas a funções chave, como regulação do processamento do RNA e do processo de importação nuclear. Além disto, em eucariotos superiores, as SRPKs têm sido relacionadas a diversos outros processos, como espermiogênese, progressão do ciclo celular e reorganização da cromatina (Ghosh et al., 2011; Giannakouros et al., 2011).

Embora o processamento do RNA em tripanossomatídeos seja realizado, principalmente, por meio de trans-splicing enquanto eucariotos superiores realizam cis-splicing, alguns elementos importantes são conservados, como as proteínas SR. Já foram identificadas em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* proteínas SR e estas se mostraram capazes de promover reações de cis-splicing *in vitro*, confirmando a existência de similaridades funcionais entre as proteínas dos tripanossomatídeos e de organismos eucarióticos superiores (Ismaili et al., 1999; Portal et al., 2003a). Além disto, no trans-splicing, as proteínas SR estão envolvidas na comunicação entre os sítios de splicing 3' e 5', possibilitando a montagem de um trans-spliceossomo cataliticamente ativo (Sanford et al., 1999; Furuyama et al., 2002; Gupta et al., 2014). Assim como nos eucariotos superiores, nestes organismos, a atividade das proteínas SR é modulada por meio da sua fosforilação, sendo observada a presença de proteínas SRPKs que desempenham este papel. Os ciclos de fosforilação/desfosforilação das proteínas SR são cruciais para o correto

recrutamento da maquinaria de splicing e ocorrência do processamento do mRNA (Portal et al., 2003b; Parsons et al., 2005).

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa, apresentados na tese de Onofre (2017), mostraram a avaliação da atividade leishmanicida de uma série de análogos (SRVIC15 a SRVIC36) (Siqueira et al., 2017) sintetizados a partir do N-(2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (SRPIN340), inibidor conhecido de SRPKs humanas (Fukuhara et al., 2006; Morooka, et al., 2015). Foi mostrado que dois dos análogos, o 2-cloro-N-(2-(dietilamina)-5-(trifluorometil)fenil)nicotinamida (SRVIC22) e o N-(2-(ciclohexilamina)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (SRVIC32) possuem atividade leishmanicida em modelos de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. Após o tratamento da infecção com os compostos, foi observada uma sobrevivência de *L. braziliensis* de 61,83% ($\pm 11,68\%$) para o tratamento com o SRVIC22 e de 51,03% ($\pm 13,24\%$) com o SRVIC32 (Onofre, 2017).

Diante disto, este trabalho teve como objetivo identificar a presença de SRPKs e proteínas SR em *L. braziliensis*, parasito pertencente à mesma família do Trypanosoma, bem como clonar as sequências que codificam tais proteínas, expressar e purificar as proteínas recombinantes, visando a realização de futuros ensaios de caracterização bioquímica. Buscamos, também, avaliar a SRPK como possível alvo dos compostos SRVIC22 e SRVIC32 assim como testar o efeito leishmanicida destes compostos quando utilizados em conjunto.

2. Revisão de literatura

2.1. Leishmanioses

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são umas das principais doenças negligenciadas, com cerca de 350 milhões de pessoas residindo em áreas consideradas de risco de contágio. Estima-se que cerca de 700 mil a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorram anualmente, sendo 50.000 a 90.000 casos de leishmaniose visceral e mais de 600.000 casos de leishmaniose cutânea (World Health, 2018). Embora esteja concentrada em países pobres e em desenvolvimento, como os pertencentes à América Latina, sudeste da Ásia e leste da África, também é considerada endêmica em países da Europa Mediterrânea (World Health, 2010; Pace, 2014).

As leishmanioses visceral, cutânea e muco-cutânea têm se tornado um problema crescente no estado de Minas Gerais. Dados do DATASUS de 2017 mostram que nos últimos 3 anos foram 1713 casos de internação por leishmanioses, sendo Belo Horizonte e Montes Claros as cidades que registraram o maior número de internações, 391 e 435, respectivamente. Nesse período o Governo de Minas Gerais gastou mais de um milhão de reais no atendimento a esses pacientes. Dados do DATASUS também mostram que, somente em Minas Gerais, os casos de leishmanioses aumentaram 49% de julho de 2015 a julho de 2017. Essas informações destacam a importância de medidas mais eficazes no controle e tratamento das leishmanioses (Ministério da Saúde, 2017).

As leishmanioses compõem a terceira doença parasitária mais comum, ficando atrás apenas da toxoplasmose e da criptosporidiose. Além disso, a doença pode ser agravada pela co-infecção com o vírus HIV, se destacando como uma infecção oportunista nas regiões onde as duas doenças são endêmicas (Shafiei et al., 2014; Akbari et al., 2017).

As doenças são causada por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, mesma família à qual pertence o Trypanosoma cruzi, causador da Doença de Chagas, outra doença considerada negligenciada

(World Health, 2010). Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos aos humanos por meio da picada de fêmeas infectadas de flebotomos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Pace, 2014; Steverding, 2017; Torres-Guerrero et al., 2017). O gênero *Leishmania* é, ainda, dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com as diferenças nos sítios de desenvolvimento dos parasitos no intestino do inseto vetor (World Health, 2010; Pace, 2014). Dentro de cada subgênero são encontradas diferentes espécies do parasito, patogênicas ou não-patogênicas aos humanos (**Figura 1, pág. 7**).

A infecção parasitária apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas com diferentes graus de severidade que dependem tanto da espécie de *Leishmania* envolvida (**Tabela 1, pág. 8**) quanto da resposta imune do hospedeiro (Pace, 2014; Torres-Guerrero et al., 2017).

As leishmanioses cutânea e visceral são as duas formas principais da doença, dependendo do tipo de célula fagocitária invadida. Na leishmaniose cutânea os parasitos infectam, principalmente, macrófagos presentes na pele, mas podem também infectar monócitos, células dendríticas e neutrófilos recrutados para o local da infecção. Já na leishmaniose visceral, os parasitos se difundem pela corrente sanguínea e infectam células do sistema reticuloendotelial (sistema fagocitário mononuclear) do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e intestino (Scott et al., 2016; Akbari et al., 2017; Steverding, 2017).

A forma cutânea da leishmaniose é a mais comum, apresentando um maior número de novos casos anualmente. A doença pode estar localizada em um único local na pele ou produzir lesões difusas, passando a receber o nome de leishmaniose cutânea difusa. Além disto, após a lesão inicial na pele, a doença pode se difundir, atingindo regiões de mucosa, como boca, nariz e orelha, sendo chamada de leishmaniose mucocutânea (Akbari et al., 2017; Steverding, 2017). A leishmaniose visceral ou calazar é a forma mais severa da doença, sendo fatal em mais de 95% dos casos quando não é tratada. Seus sintomas incluem febre irregular, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, algumas vezes hepatoesplenomegalia e anemia (Steverding, 2017). Há ainda uma outra forma, a leishmaniose dérmica pós-calazar, que é

considerada uma complicação da leishmaniose visceral. Geralmente aparece de seis meses a 1 ano após uma aparente cura da leishmaniose visceral, podendo ocorrer também mais cedo ou até mesmo simultaneamente à visceral e é caracterizada pela ocorrência de lesões maculares, papulares, nodulares ou uma mistura destes tipos por todo o corpo, sendo a face o sítio mais comum de ocorrência (Zijlstra et al., 2003; Rabi Das et al., 2017).

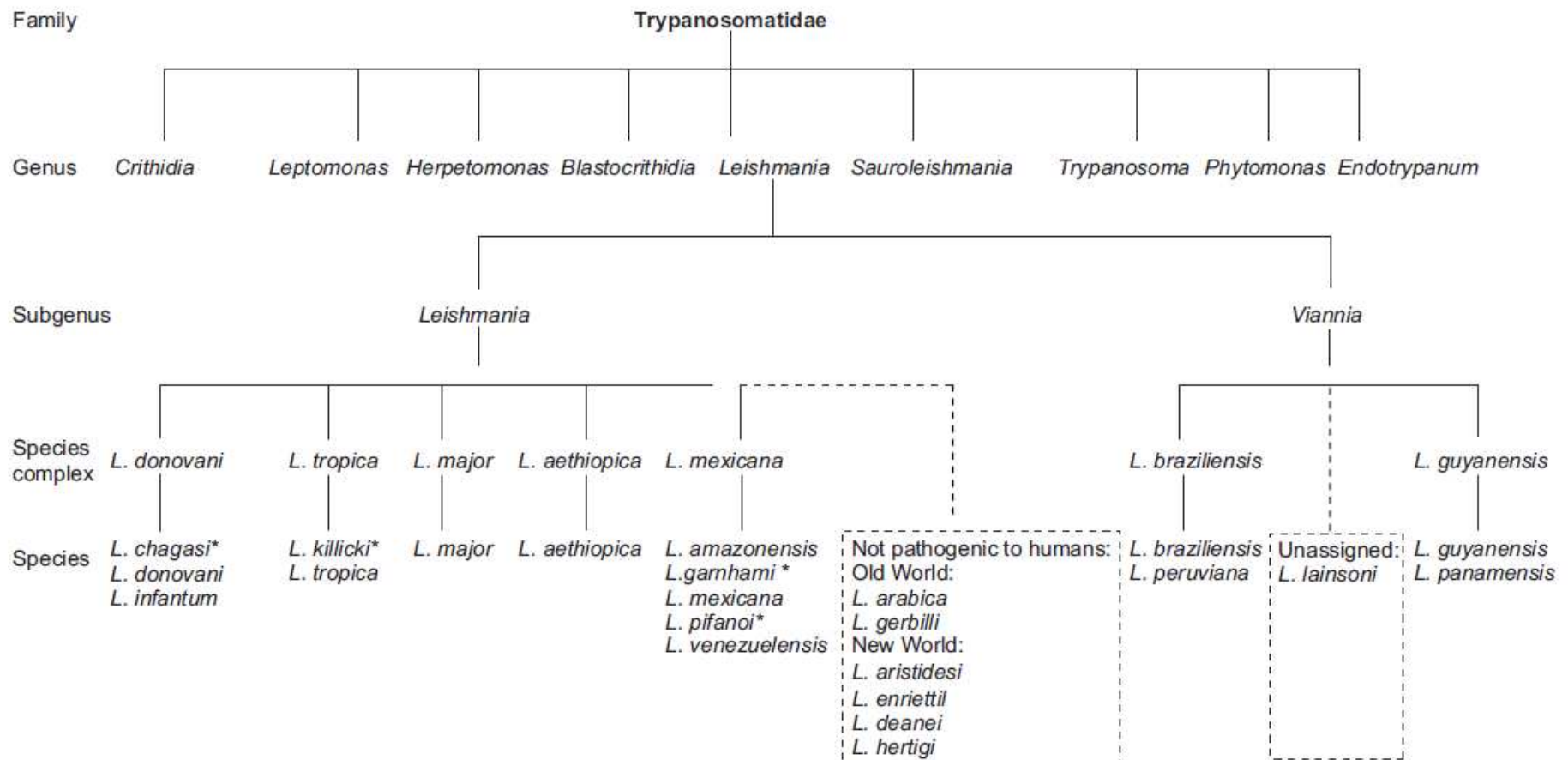


Figura 1. Taxonomia da família Trypanosomatidae. Espécies com * estão com status sob discussão (*L. chagasi* no Novo Mundo é a mesma espécie que *L. infantum*, por exemplo). As linhas pontilhadas demarcam espécies não patogênicas aos seres humanos e a caixa de linhas pontilhadas uma espécie de *Leishmania* que não foi atribuída a nenhum complexo de espécies (World Health, 2010).

Tabela 1. Espécies de Leishmania que causam doenças em humanos. Adaptado e modificado de: (Steverding, 2017).

Subgênero	Espécie	Velho/Novo Mundo	Forma da doença	Distribuição
Leishmania	L. aethiopica	VM	LC, LCD	Leste da África
	L. amazonensis	NM	LC, LCD, LMC	América do Sul
	L. donovani	VM	LV, LDPK	África Central, Sul da Ásia, Índia, China, Oriente Médio
	L. infantum	VM, NM	LV, LC	Países Mediterrâneos, Sudeste da Europa, Ásia Central, Américas, Oriente Médio
	L. major	VM	LC	Regiões Norte e Central da África, Oriente Médio, Ásia Central
	L. mexicana	NM	LC, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru
	L. tropica	VM	LC, LV	Regiões Norte e Central da África, Oriente Médio, Ásia Central, Índia
	L. venezuelensis	NM	LC	Norte da América do Sul, Venezuela
	L. waltoni	NM	LCD	República Dominicana
	Viannia	L. braziliensis	NM	LC, LMC
L. guyanensis		NM	LC, LMC	Norte da América do Sul
L. lainsoni		NM	LC	Brasil, Bolívia, Peru
L. lindenbergi		NM	LC	Brasil
L. naiffi		NM	LC	Brasil, Guiana Francesa
L. panamensis		NM	LC, LMC	Américas Central e do Sul
L. peruviana		NM	LC, LMC	Peru, Bolívia
L. shawi		NM	LC	Brasil

Siglas: VM = Velho Mundo; NM = Novo Mundo; LC = Leishmaniose cutânea; LCD = Leishmaniose cutânea difusa; LMC = Leishmaniose mucocutânea; LV = Leishmaniose visceral; LDPK = Leishmaniose dérmica pós-calazar.

O Brasil se destaca tanto no cenário da leishmaniose cutânea quanto da visceral (**Figura 2**), sendo um dos países com maior número de novos casos reportados, anualmente, das duas formas da doença (World Health, 2015).

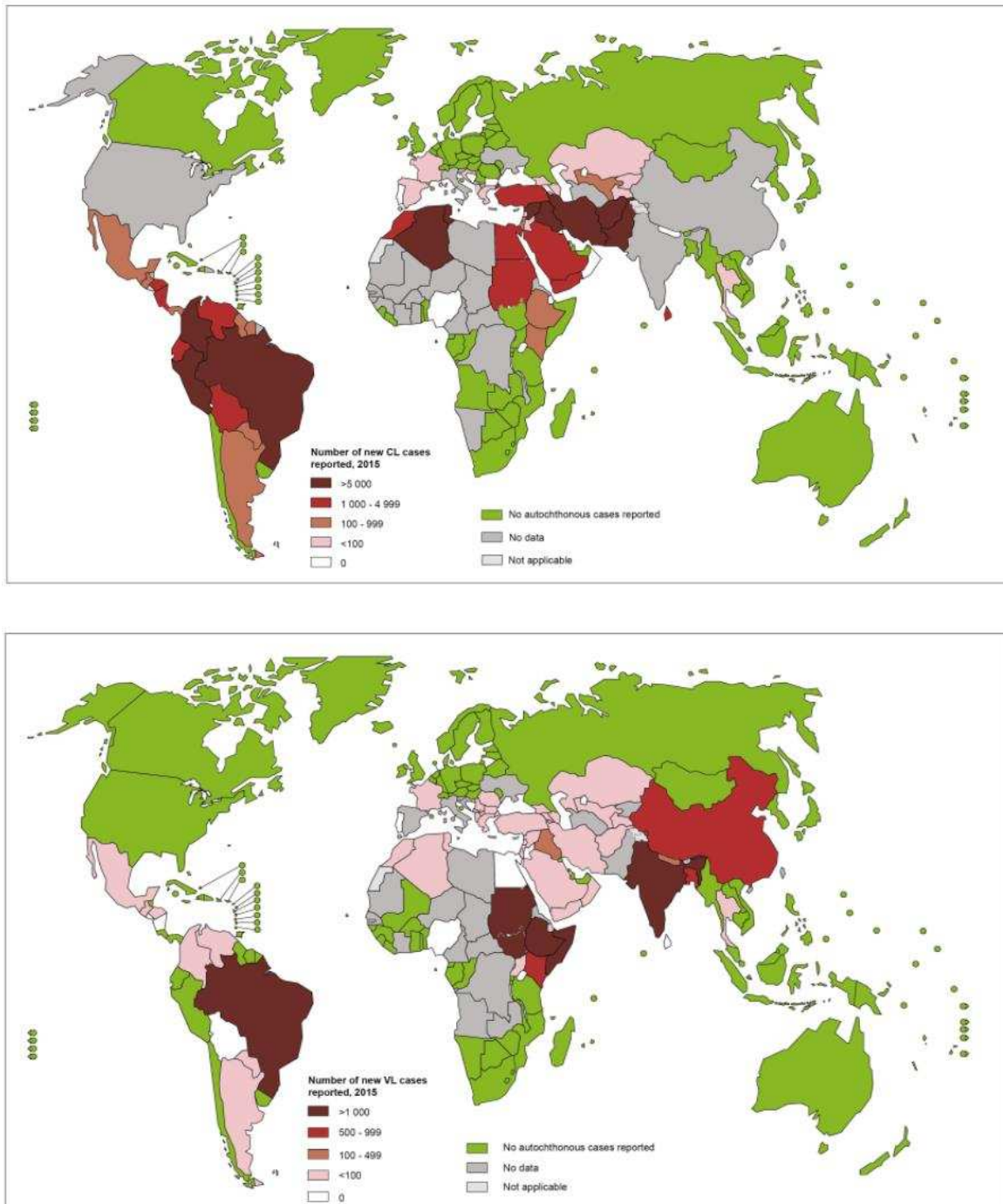


Figura 2. Distribuição mundial da leishmaniose. Gráfico superior: Status da endemidade mundial da leishmaniose cutânea em 2015. Gráfico inferior: Status da endemidade mundial da leishmaniose visceral em 2015 (World Health, 2015).

Mais de 90% dos casos globais reportados de leishmaniose visceral ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (Alvar et al., 2012). Dentro da América Latina cerca de 97% dos casos reportados de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, onde mais de 70.000 notificações oficiais e mais de 3.800 mortes foram registradas nas últimas três décadas (Martins-Melo et al., 2014; Lara-Silva Fde et al., 2015). A leishmaniose cutânea é distribuída de forma mais ampla, com aproximadamente um terço dos casos reportados ocorrendo em cada uma destas três regiões – Américas, bacia Mediterrânea e do Oriente Médio até a Ásia Central. Os dez países com maior estimativa de casos, o Afeganistão, a Argélia, a Colômbia, o Brasil, o Irã, a Síria, a Etiópia, o Sudão do Norte, a Costa Rica e o Peru, representam entre 70 e 75% da incidência global estimada desta forma da doença (Alvar et al., 2012).

2.2. Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida de *Leishmania* é completo em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado (flebotomíneos). Desta forma, durante seu desenvolvimento, o parasito deve se adaptar aos diferentes ambientes dos hospedeiros, o que inclui a adaptação a diferentes temperaturas e pH, bem como ao ambiente citotóxico dos hospedeiros. Para isto, o parasito sofre uma série de modificações tanto morfológicas (**Figura 3, pág. 11**) quanto bioquímicas, garantindo sua sobrevivência intracelular (Leta et al., 2014; Veras et al., 2016).

O ciclo (**Figura 4, pág. 12**) se inicia quando o flebotomíneo injeta a forma infecciosa (promastigota metacíclica) de sua probóscide em um vertebrado não infectado durante o repasto sanguíneo. Estas formas promastigotas são, então, fagocitadas por macrófagos do hospedeiro ou outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Dentro destas células, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, que podem sobreviver e replicar dentro dos fagolisossomos via fissão binária. Esta replicação causa a ruptura da célula hospedeira seguida da infecção de outros fagócitos (Leta et al., 2014; Nagle et al., 2014; Veras et al., 2016).

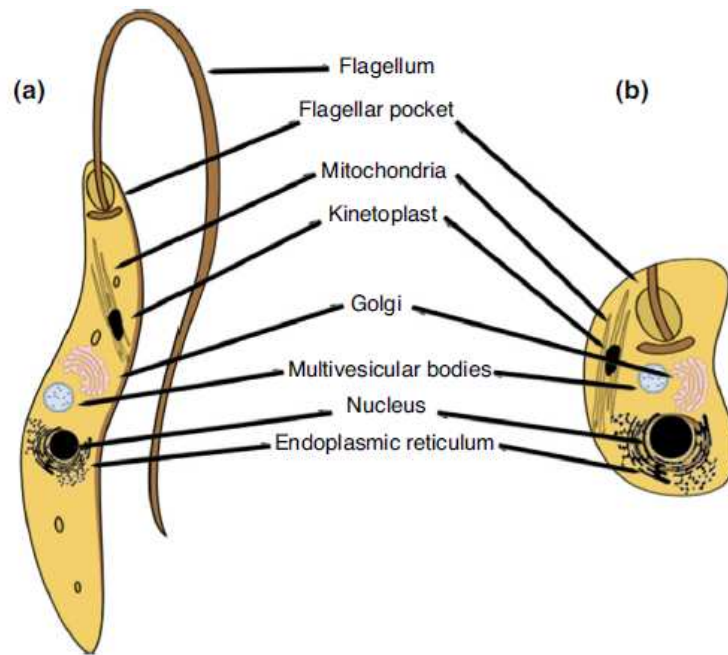


Figura 3. Morfologia dos parasitos. a) Forma promastigota e b) forma amastigota. As formas promastigotas são alongadas e possuem flagelo, que é usado para propulsão do parasito e sua fixação aos microvilos no intestino do flebotomíneo. Já as formas amastigotas são arredondadas e não possuem flagelo (Zulfiqar et al., 2017).

Os fagócitos infectados podem ser, então, ingeridos por outros flebotomíneos durante o repasto sanguíneo e, dentro deles, se diferenciam em promastigotas procíclicas, que se replicam dentro do intestino médio do inseto. As formas procíclicas se diferenciam, posteriormente, em promastigotas metacíclicas (forma infecciosa) e migram para a probóscide do flebotomíneo, que reinicia o ciclo ao picar um novo hospedeiro vertebrado (Leta et al., 2014; Veras et al., 2016).

A transmissão da doença pode ser zoonótica, de animais como cachorros e roedores para humanos, ou antroponótica, de humanos infectados para humanos não-infectados (Leta et al., 2014). A transmissão antroponótica é menos comum, sendo descrita apenas para algumas espécies de *Leishmania*, como a *L. tropica* e *L. donovani*, e em alguns países do Oriente Médio, como Paquistão, Afeganistão, Irã e Síria, e na Índia (Maroli et al., 2009; Reithinger et al., 2010; Noazin et al., 2013; Zamir et al., 2016; Kaushal et al., 2017).

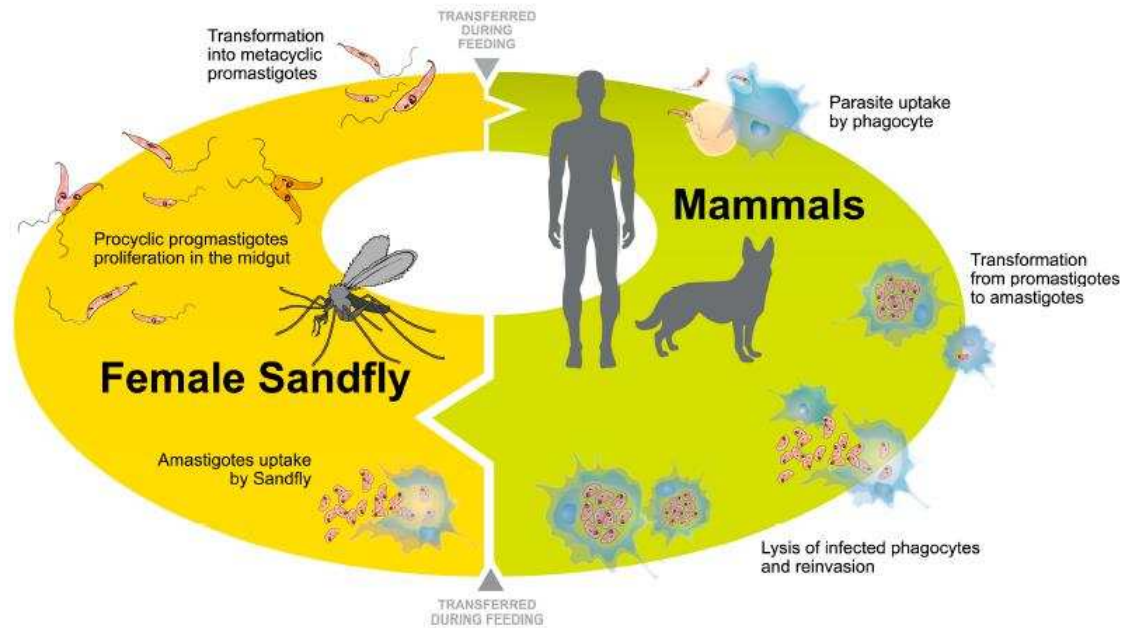


Figura 4. Representação esquemática do ciclo de vida digenético da Leishmania (Veras et al., 2016).

2.3. Formas de tratamento

Os tratamentos disponíveis para as leishmanioses estão, ainda, muito distantes do ideal, principalmente por causa da extensa toxicidade dos fármacos, eficácia reduzida, via de administração (parenteral), necessidade de grande número de doses, altos custos e incidência de resistência (Akbari et al., 2017; Zulfiqar et al., 2017). Além disso, a eficácia de algumas das substâncias que apresentam atividade leishmanicida depende da espécie, dos sintomas causados e da região geográfica do parasito (Zulfiqar et al., 2017).

Por mais de 60 anos, a primeira linha de fármacos contra as leishmanioses, cutânea e visceral, foram os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio, nome comercial Pentostam® e antimoniato de meglumina, nome comercial Glucantime®), administrados em doses de 20 mg/Kg do peso corporal por um tempo de 28-30 dias (Monge-Maillo et al., 2013; McGwire et al., 2014; Sundar et al., 2015; Sundar et al., 2016). Embora o parasito também seja susceptível aos antimoniais pentavalentes, estes são considerados pró-fármacos, que serão convertidos, posteriormente, em antimoniais trivalentes

(forma ativa do fármaco). Não se sabe ao certo as rotas de entrada dos antimoniais tanto em *Leishmania* quanto em macrófagos, mas supõe-se que o transportador de aquaporina 1 seja o responsável pelo transporte em amastigotas e, em adição, ocorre a entrada via transportadores de fosfato. Ambas as formas de antimoniais levam à fragmentação do DNA do parasito, interferem na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (levando à depleção do ATP intracelular) e aumentam o efluxo de tióis intracelulares (Cruz et al., 2009; Singh et al., 2012).

Apesar de ser eficaz, na maioria dos casos, contra o parasito, esses fármacos causam diversos efeitos colaterais ao paciente, como arritmias cardíacas, intervalo QTc – parâmetro que representa a duração da contração cardíaca – prolongado no eletrocardiograma (prolongamento $>0,5s$ é indicativo de arritmias cardíacas graves e fatais), batimentos ventriculares prematuros, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular. Outros efeitos comuns são mialgia, artralgia e elevação dos níveis de enzimas hepáticas e pancreáticas. Além disso, recentemente, tem-se observado uma crescente incidência de resistência em regiões endêmicas da Índia e Nepal (Sundar et al., 2015; Sundar et al., 2016).

A anfotericina B, usada predominantemente na terapia antifúngica para o tratamento de infecções sistêmicas, tem sido utilizada como a segunda linha de fármacos contra as leishmanioses desde a década de 60, quando teve sua atividade leishmanicida demonstrada para o tratamento da leishmaniose mucocutânea (Cruz et al., 2009; Negro et al., 2017). O crescimento da incidência de resistência aos antimoniais pentavalentes resultou no aumento do interesse pela anfotericina B (Cruz et al., 2009). O fármaco tem sido comumente usado para o tratamento da leishmaniose visceral refratária na Índia, com doses de 0,75 a 1,0 mg/Kg por 15 a 20 infusões intravenosas e também é recomendada para o tratamento da leishmaniose dérmica pós-calazar no subcontinente indiano, com doses de 1,0 mg/Kg/dia, sendo necessárias até 60 a 80 doses durante 4 meses (Sundar et al., 2015).

A anfotericina B tem uma alta e seletiva afinidade pelo ergosterol, esteroide mais abundante em *Leishmania* e fungos do que nas membranas das células de mamíferos. A toxicidade deste medicamento está associada à sua capacidade de se ligar a estes esteroides e induzir a formação de poros aquosos

na membrana celular interrompendo a integridade osmótica e provocando a lise da célula (Cruz et al., 2009; Singh et al., 2012; Negrao et al., 2017). Entretanto, está associada a diversos efeitos adversos, incluindo nefrotoxicidade, hipocalemia e miocardite, necessitando, assim, de monitoramento e hospitalização por 4 a 5 semanas, o que aumenta o custo da terapia (Sundar et al., 2015). Além disso, a utilização da anfotericina B livre é dificultada devido a sua baixa solubilidade em água, absorção reduzida no trato gastrointestinal e baixa biodisponibilidade (Cruz et al., 2009).

Para minimizar os efeitos adversos da anfotericina B, diferentes formulações lipídicas têm sido utilizadas como veículo de entrega, possibilitando uma menor exposição do fármaco livre aos órgãos (Sundar et al., 2015). Três formulações têm sido extensivamente testadas, sendo elas a anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B e anfotericina B em dispersão coloidal (Singh et al., 2012; Sundar et al., 2015). A tolerância ao medicamento é melhorada e os efeitos adversos, incluindo a nefrotoxicidade, são minimizados, permitindo a entrega de maiores doses em períodos de tempo mais curtos (Sundar et al., 2015). Entretanto, a produção em escala industrial é complexa, elevando o valor do medicamento (Cruz et al., 2009; Sundar et al., 2016).

No caso das primeiras linhas de defesa falharem, outros fármacos estão disponíveis para o tratamento das doenças, como cetoconazol e fluconazol, que assim como a anfotericina B são antifúngicos, paromicina e pentamidina, descritos também como antibióticos e miltefosina, originalmente desenvolvida como agente anticâncer (Cruz et al., 2009; Kedzierski et al., 2009; Singh et al., 2012; Sundar et al., 2015).

2.4. Terapia combinada ou multidrogas

A resistência crescente dos parasitos aos fármacos utilizados no tratamento da doença sugere que a monoterapia usada atualmente precisa ser revisada. Uma alternativa de tratamento que tem se destacado é a terapia multidrogas, que visa promover o aumento da atividade com o uso de compostos com atividades aditivas ou sinérgicas, atuando em diferentes alvos, menor

duração do tratamento e menor quantidade de doses, diminuindo, assim, o custo, as chances de efeitos colaterais tóxicos e prevenindo a emergência de resistência (Sundar et al., 2015; Sundar et al., 2016). Outro fator importante para proteção mútua usando a terapia combinada é o tempo de meia-vida dos fármacos. O ideal é a utilização de um fármaco muito potente com um tempo de meia-vida curto em combinação com um segundo que tenha uma meia-vida mais extensa, para remover os parasitos restantes (Zulfiqar et al., 2017).

O uso do estibogluconato de sódio combinado com a paromicina foi implementado pela OMS como forma de tratamento padrão, no leste da África, após um estudo multicêntrico randomizado bem-sucedido (Zulfiqar et al., 2017). Neste estudo foi feita uma comparação entre a eficácia dos tratamentos com os fármacos individuais e com uma combinação deles (20 mg/Kg/dia de estibogluconato de sódio mais 15 mg/Kg/dia de paromicina durante 17 dias), onde mostrou-se que o tratamento combinado é mais eficaz que o tratamento individual com paromicina por 28 dias e tem eficácia similar ao tratamento individual com estibogluconato de sódio por 30 dias, demonstrando, assim, a adequação da terapia combinada (Musa et al., 2012; Kimutai et al., 2017).

Tratamentos sequenciais com miltefosina e anfotericina B lipossomal também se mostraram altamente eficazes no estado de Bihar, na Índia (Zulfiqar et al., 2017). O tratamento com uma única dose de anfotericina B lipossomal seguida da miltefosina por 10 dias mostrou uma eficácia de 98% enquanto a da anfotericina individual foi de 91%. Desta forma, se usadas sequencialmente, contribuem para a redução do tempo de tratamento com miltefosina e/ou diminuição da dose necessária de anfotericina B lipossomal, sendo uma terapia mais viável (Sundar et al., 2008).

Combinações entre anfotericina B lipossomal, paromicina e miltefosina também vem sendo testadas. O tratamento padrão com anfotericina B lipossomal foi comparado com três combinações dos fármacos: 1) injeção única de 5 mg/Kg de anfotericina B lipossomal + 50 mg de miltefosina durante 7 dias; 2) injeção única de 5 mg/Kg de anfotericina B lipossomal + 11 mg/Kg de paromicina por 10 dias; e 3) 11 mg/Kg de paromicina + 50 mg de miltefosina durante 10 dias. Todas as combinações resultaram em aproximadamente 97%

de eficácia, superando o tratamento padrão com a anfotericina B lipossomal (91%) (Sundar et al., 2011; Rahman et al., 2017; Zulfiqar et al., 2017).

De um modo geral, as terapias combinadas são opções bem toleradas e eficazes no tratamento das doenças e, estão associadas a um menor tempo de hospitalização, tornando o tratamento mais viável e acessível (Sundar et al., 2016).

2.5. SRPK como potencial alvo de fármacos em Leishmania

Uma vez que o tratamento das leishmanioses é um problema crescente, principalmente devido à incidência de resistência, o desenvolvimento de novos medicamentos que possam substituir ou complementar as alternativas terapêuticas disponíveis atualmente é de grande importância (Tiuman et al., 2011; Negrao et al., 2017). Diante disto, vem crescendo o número de pesquisas voltadas para a identificação e validação de novos alvos de fármacos (Naula et al., 2005). Uma classe de enzimas que vem se destacando como alvo promissor é a das proteínas cinases (Naula et al., 2005; de Azevedo et al., 2009; Sinha et al., 2016). Estas proteínas regulam diversos processos celulares, como controle da transcrição, progressão do ciclo celular e diferenciação e, por causa disto, despertaram bastante atenção como potenciais alvos de fármacos para o tratamento de uma ampla gama de doenças e síndromes, como a doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares e o câncer (Naula et al., 2005).

Análises do genoma de três tripanossomatídeos (*Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*) mostraram que eles codificam, respectivamente, 179, 156 e 171 proteínas cinases, bem como possuem 17, 20 e 19 genes que codificam proteínas atípicas (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005; Parsons et al., 2005). Muitas destas proteínas cinases têm se mostrado importantes para proliferação e/ou viabilidade do parasito em estágios do seu ciclo de vida que são relevantes clinicamente. Além disto, as proteínas dos tripanossomatídeos apresentam diferenças significativas de sequência em relação às suas homólogas de mamíferos, o que as tornam

alvos potenciais para desenvolvimento de fármacos seletivos (Naula et al., 2005).

Dentro do genoma dos tripanossomatídeos, o grupo de cinases CMGC é um dos melhores representados em comparação com seres humanos (45 em *L. major* e 61 em seres humanos). Duas famílias de proteínas pertencentes a este grupo, as SRPKs e CLKs (cinases semelhantes a CDC – proteínas do ciclo celular), atuam fosforilando motivos ricos em serina/arginina em proteínas SR, que atuam no processamento do RNA e splicing em muitos organismos superiores, sendo de grande interesse no estudo da regulação gênica dos parasitos (Parsons et al., 2005).

O splicing do pré-mRNA, em mamíferos, ocorre no spliceossomo, complexo macromolecular composto das cinco pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) U1, U2, U4, U5 e U6 e mais de 100 proteínas auxiliares (Schellenberg et al., 2008; Ghosh et al., 2011). Dentre essas proteínas a família das proteínas SR, fatores de splicing não-snRNP, é essencial para o controle de vários aspectos do splicing bem como de outros eventos do processamento do RNA. Elas interagem com componentes da maquinaria de splicing no início da montagem do spliceossomo, ajudam a estabelecer os locais de junção 5' e 3', atuam no recrutamento de U4/U5·U6 e estimulam a segunda etapa catalítica do splicing (Wahl et al., 2009; Ghosh et al., 2011). Além disto, tem sido mostrado que as proteínas SR desempenham papéis em eventos pós-splicing, como exportação do mRNA, regulação da tradução e estabilidade genômica (Huang et al., 2004; Sanford et al., 2004; Xiao et al., 2007).

As proteínas SR contêm um ou dois motivos de reconhecimento ao RNA e uma região rica em repetições serina/arginina, o domínio SR (Risso et al., 2012; Jeong, 2017). A fosforilação de resíduos de serina do domínio SR desempenha um papel fundamental na atividade e localização das proteínas SR, e é regulada, principalmente, pela família das SRPKs, proteínas cinase que atuam fosforilando, especificamente, repetições SR conservadas (Ghosh et al., 2011; Chan et al., 2013; Howard et al., 2015). Esta fosforilação aumenta a especificidade de ligação ao RNA, é importante para interações específicas proteína-proteína dentro do pré-spliceossomo, previne a auto agregação das

proteínas SR e promove a dissociação das proteínas SR dos speckles nucleares, regulando etapas cruciais do recrutamento dos fatores de splicing (Giannakouros et al., 2011; Zhou et al., 2013; Howard et al., 2015). Diante disto, as SRPKs têm sido implicadas em várias funções chave, como regulação do processamento do RNA e importação nuclear. Elas têm sido relacionadas, ainda, a vários outros processos, como espermiogênese, progressão do ciclo celular e reorganização da cromatina (Giannakouros et al., 2011).

O processamento do pré-mRNA em tripanossomatídeos difere dos eucariotos superiores. Em eucariotos superiores a remoção dos íntrons seguida da junção de éxons, dentro de uma mesma sequência, se dá com a remoção de uma estrutura em forma de laço através de duas reações de transesterificação, sendo o processo conhecido como cis-splicing (De Conti et al., 2013; Pan et al., 2015). Já em tripanossomatídeos, os transcritos de pré-mRNA policistrônicos são processados em mRNAs maduros monocistrônicos num processo conhecido por trans-splicing. Neste processo, um pequeno éxon (chamado SL) é doado de uma molécula de RNA especializada e conectado na extremidade 5' do pré-mRNA, se tornando o primeiro éxon da sequência em questão. Haverá a liberação de uma estrutura em formato de Y, envolvendo, assim como no cis-splicing, duas reações de transesterificação (Gunzl, 2010; Lasda et al., 2011). Os éxons SL serão unidos a vários pré-mRNAs, e, conseqüentemente, haverá a produção de diferentes mRNAs maduros contendo uma sequência comum na extremidade 5' (Lasda et al., 2011).

Embora existam tais diferenças, alguns elementos são conservados entre estes organismos. Tripanossomatídeos também possuem as cinco snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6 que participam da montagem do spliceossomo, bem como proteínas auxiliares (Liang et al., 2003). Além disto, componentes não-snRNPs importantes, como as proteínas SR, são encontradas em organismos que realizam trans-splicing. As proteínas SR são necessárias em pelo menos duas etapas da reação de trans-splicing, sendo importantes tanto antes quanto depois da associação da snRNP U2 ao sítio de splicing 3'. A fosforilação do domínio SR é importante nesta etapa de associação, visto que a desfosforilação deste domínio leva ao bloqueio da associação de U2 ao sítio de splicing 3' do pré-mRNA. Esta fosforilação é, ainda, importante para o prosseguimento da reação

de splicing, após a associação de U2, auxiliando no recrutamento do sítio de splicing 5', presente no SL RNP. Desta forma, no trans-splicing, as proteínas SR estão envolvidas na comunicação entre os sítios de splicing 3' e 5', possibilitando a montagem de um trans-spliceossomo cataliticamente ativo (Sanford et al., 1999; Furuyama et al., 2002; Gupta et al., 2014).

Proteínas SR já foram descritas em *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, sendo chamadas de TcSR e TSR1, respectivamente (Ismaili et al., 1999; Portal et al., 2003a). As proteínas SR de *Trypanosoma* são, também, capazes de promover reações de cis-splicing in vitro, confirmando a existência de similaridades funcionais entre as proteínas dos tripanossomatídeos e de organismos eucarióticos superiores (Portal et al., 2003a). Assim como em eucariotos superiores as proteínas SR em tripanossomatídeos têm sua atividade regulada por ciclos de fosforilação/desfosforilação, que são cruciais para o correto recrutamento da maquinaria de splicing e ocorrência de tal processo. Já foi identificada, em *T. cruzi*, a presença de uma SRPK, chamada de TcSRPK, e demonstrado que ela interage com TcSR e outros fatores de splicing da família SR, como ASF/SF2 (*Homo sapiens*), modulando a atividade destas proteínas através da fosforilação.

A SRPK de *T. cruzi* apresenta um alto nível de conservação funcional com as demais proteínas desta família, sugerindo que o controle da maquinaria de processamento do pré-mRNA pode ser independente do tipo de splicing realizado pelos organismos (Portal et al., 2003b).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Estudar uma possível SRPK e uma possível proteína SR em *L. braziliensis* bem como avaliar a atividade leishmanicida de compostos sintéticos análogos ao SRPIN340, um inibidor conhecido de SRPKs.

3.2. Objetivos Específicos

- Buscar em bancos de dados sequências, em *L. braziliensis*, homólogas às SRPKs e às proteínas SR já conhecidas;
- Clonar em vetor de expressão pET-28a as sequências gênicas que codificam a possível SRPK e a possível proteína SR de *L. braziliensis*;
- Expressar as proteínas recombinantes e desenvolver protocolos de purificação para as mesmas;
- Construir o modelo tridimensional das proteínas e realizar ensaios de docking da possível SRPK de *L. braziliensis* com os prováveis inibidores;
- Analisar propriedades físico-químicas dos compostos;
- Determinar o IC₅₀ dos compostos SRVIC22 e SRVIC32 em macrófagos e em *L. braziliensis*;
- Avaliar possível sinergismo entre os compostos SRVIC22 e SRVIC32 através da análise da citotoxicidade em macrófagos e do potencial leishmanicida em promastigotas e em ensaio de infecção *in vitro*;
- Verificar alterações no nível de expressão da possível SRPK nas formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* e no tratamento da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* com os compostos;
- Avaliar a toxicidade dos compostos SRVIC22 e SRVIC32 *in vivo*.

4. Metodologia

4.1. Busca em bancos de dados por SRPKs e proteínas SR em *Leishmania braziliensis*

As sequências das SRPKs de *Homo sapiens* (NCBI ID: NP_003128.3, NP_872634.1 e NP_055185.2) (Gui et al., 1994a; Gui et al., 1994b; Kuroyanagi et al., 1998; Wang et al., 1998; Nakagawa et al., 2005), *Plasmodium falciparum* 3D7 (NCBI ID: XP_001351098.1) (Dixit et al., 2010) e *Trypanosoma cruzi* (NCBI ID: AAM50042.1) (Portal et al., 2003b) foram utilizadas como referências para busca de possíveis SRPKs em *L. braziliensis*. As sequências de três das proteínas SR de *Homo sapiens* (NCBI ID: NP_008855.1, NP_001182356.1 e NP_006266.2) (Mayeda et al., 1992; Zahler et al., 1992; Screatton et al., 1995) e das proteínas SR de *Plasmodium falciparum* (NCBI ID: XP_001351730.2) (Eshar et al., 2012), *Trypanosoma cruzi* (NCBI ID: AF204399.1) (Portal et al., 2003a) e *Trypanosoma brucei* (NCBI ID: AJ007905.1) (Ismaili et al., 1999) foram utilizadas como referências para a busca de possíveis proteínas SR em *L. braziliensis*.

A busca foi realizada utilizando o Blastp, ferramenta de busca com base em alinhamentos locais, dentro do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e do TritrypDB (The Kinetoplastid Genomics Resource).

As sequências preditas como SRPKs foram validadas utilizando o Pfam (Finn et al., 2016), programa que permite a identificação dos domínios presentes nas proteínas. Apenas as sequências que continham duas regiões de domínio cinase (Pfam ID: PF00069.23) separadas por uma região espaçadora, que é uma característica desta família de proteínas cinase (Ding et al., 2006; Ghosh et al., 2011; Giannakouros et al., 2011), foram mantidas para prosseguimento das análises. Posteriormente, as sequências mantidas foram alinhadas, utilizando o Clustal Omega, com as sequências usadas como referência, para verificação de regiões conservadas e variáveis, uma vez que as SRPKs são caracterizadas por possuírem um domínio cinase bem conservado enquanto a região espaçadora é variável (Ghosh et al., 2011). As sequências preditas como proteínas SR também foram validadas utilizando o Pfam, no qual foram selecionadas apenas as

proteínas que possuíam a porção C-terminal rica em repetições Ser/Arg (domínio RS) e que continham motivos de reconhecimento de RNA (Pfam ID: PF00076.21), que são características das proteínas SR (Zhou et al., 2013; Howard et al., 2015).

4.2. Cultura de células

Leishmania braziliensis da cepa M2904 foram cultivadas em meio Grace's (Gibco®) suplementado com glutamina (2 mM), penicilina (0,02 mg/mL) e soro fetal bovino (10%), pH 6,5, e mantidas em estufa a 25 °C. Macrófagos muri no da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma®) suplementado com bicarbonato de sódio (2 mg/mL), HEPES (25 mM), glutamina (2 mM), penicilina (0,02 mg/mL), gentamicina (20 µg/mL) e soro fetal bovino (10%), pH 7,2, e mantidos em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂.

4.3. Curva de crescimento de *L. braziliensis* M2904

Para avaliação do crescimento dos parasitos, no dia 0 foram colocados em três garrafas de cultivo 10 mL de meio Grace's suplementado e 1x10⁵ células/mL, sendo as garrafas mantidas em estufa a 25 °C. As três garrafas foram então contadas 3 vezes por dia durante um período de 10 dias. Para realizar a contagem, as células foram homogeneizadas, na própria garrafa, e uma alíquota foi coletada e diluída em formalina 4% (v/v) para contagem em câmara de Neubauer.

4.4. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para extração do RNA total de *L. braziliensis* foram utilizadas 5–10x10⁶ células crescidas em suspensão, em fase estacionária de crescimento. A

extração do RNA total foi realizada com o reagente TRIzol™ (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando 1 µg de RNA total em um volume final de reação de 20 µL com o primer oligo (dT) nas condições de reação recomendadas pelo FIREScript RT cDNA synthesis KIT (Solis Biodyne). Após o término da síntese, a concentração e a qualidade do cDNA obtido foram avaliadas usando NanoDrop (Thermo Scientific™).

4.5. Clonagem das sequências gênicas que codificam a possível SRPK (LbSRPK) e a possível proteína SR (LbSR) de *L. braziliensis* em vetor de expressão

A partir do cDNA obtido as sequências de interesse foram amplificadas via PCR utilizando o GoTaq® Green Master Mix (Promega) e primers específicos (**Tabela 2**) para as sequências. Para cada reação foram utilizados 1 µg de cDNA e 500 nM de cada primer (forward e reverse). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e os fragmentos dos tamanhos de interesse recuperados do gel e purificados com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com o recomendado pelo fabricante.

Tabela 2. Primers utilizados nas clonagens das regiões codificantes da LbSRPK e da LbSR.

	LbSRPK	LbSR
Foward Primer	5' catatggggaagtcaaagaagcac 3'	5' catatgccggcctcggcga 3'
Reverse Primer	5' gaattcctagtcagtgccgctcgtc 3'	5' ctcgagtagtctctttgctttcctt 3'

Os fragmentos de interesse foram, inicialmente, inseridos no vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega) seguindo as condições de reação recomendadas. Para subclonagem em vetor de expressão, os fragmentos de interesse foram removidos do pGEM-T easy utilizando as enzimas de restrição

NdeI e EcoRI (Fermentas) para a LbSRPK e NdeI e XhoI (Fermentas) para a LbSR, sendo o vetor pET-28a também digerido com as mesmas enzimas. As reações de digestão foram incubadas a 37 °C por 2 horas e 30 minutos para clivagem e, posteriormente, a 80 °C por 20 minutos para inativação das enzimas de restrição. Em seguida, todo o volume das reações foi aplicado em gel de agarose 1% (m/v) e os fragmentos separados por eletroforese. Os fragmentos dos tamanhos de interesse foram recuperados do gel e purificados com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) de acordo com o recomendado pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram, então, inseridos no vetor pET-28a utilizando o Rapid DNA Ligation Kit® (Thermo Scientific), seguindo as condições de reação recomendadas. Este vetor foi responsável por inserir nas proteínas uma cauda constituída de seis resíduos de histidina na extremidade N-terminal, importante para etapas posteriores.

A confirmação das clonagens foi feita por digestão, utilizando as enzimas de restrição acima citadas, por PCR usando os primers específicos para as sequências de interesse e por sequenciamento.

4.6. Expressão das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Os plasmídeos recombinantes foram inseridos na cepa de *E. coli* BL21 (DE3) RIL por transformação utilizando o método de choque térmico. As bactérias transformadas foram cultivadas em 6 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico canamicina (50 µg/mL) a 37 °C e rotação de 180 rpm por 16 horas. Em seguida, o pré-inóculo de 6 mL foi vertido em 300 mL de meio LB líquido e cultivado a 37 °C/180 rpm até atingir densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO600) entre 0,6-0,8. Para indução da expressão das proteínas foi adicionado o isopropil-β-D-tiogalactosídeo - IPTG (Sigma®), sendo testadas diferentes concentrações deste indutor (0,10 e 0,25 mM), temperaturas (30 °C e 37 °C) e tempos de indução (0 a 5 h), a fim de se obter os melhores parâmetros para a produção das proteínas. Alíquotas de 50 mL foram coletadas de cada condição testada e centrifugadas a 4 °C e 2.000 x g por 10 minutos. Os pellets resultantes foram armazenados a -80 °C para posterior uso.

Os pellets foram então ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM imidazol e 5% glicerol, pH 7,5) contendo 1 µg/mL dos inibidores de protease leupeptina, aprotinina e pepstatina além de 30 µg/mL de lisozima. Após banho de gelo de 30 minutos cada lisado foi submetido à sonicação por 5 minutos (10 pulsos de 30 segundos com amplitude 20 e intervalos de 30 segundos entre os pulsos). Em seguida foram centrifugados a 4°C e 12.500 x g por 30 minutos, levando à separação das frações solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi coletada e os pellets correspondentes às frações insolúveis foram ressuspensos com o tampão de lise acrescido de 8 M de ureia. As amostras ressuspensas foram novamente centrifugadas a 4 °C e 12.500 x g por 30 minutos, sendo coletadas as frações insolúveis ao final do processo.

As frações solúveis e insolúveis foram, então, avaliadas por SDS-PAGE 10% para a LbSRPK e 12% para a LbSR e western blotting (usando anticorpo primário anti-cauda de histidina) para se comprovar a produção das proteínas e avaliar em qual fração elas se encontram e quais parâmetros geraram um maior rendimento.

4.7. Purificação das proteínas

As proteínas foram produzidas em maior escala utilizando os melhores parâmetros de temperatura, tempo e concentração de IPTG pré-estabelecidos. As bactérias foram lisadas, como descrito anteriormente, e as frações solúveis filtradas em membrana de 0,45 µm. Posteriormente, cada filtrado foi aplicado em uma coluna de cromatografia de afinidade HiTrap® Chelating (GE Healthcare) acoplada ao sistema cromatográfico ÄKTA™ Purifier (GE Healthcare Life Sciences). As colunas foram pré-equilibradas com o tampão A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM imidazol e 5% glicerol, pH 7,5) antes da aplicação das amostras. As amostras foram aplicadas e as colunas lavadas com o tampão A até que a medida da absorbância a 280 nm estabilizasse. A eluição das proteínas de interesse foi feita utilizando um gradiente de 0-100% do tampão B (50 mM

Tris-HCl, 100 mM NaCl, 300 mM imidazol e 5% glicerol, pH 7,5). As frações coletadas para cada proteína foram analisadas por SDS-PAGE 10% para a LbSRPK e 12% para a LbSR e western blotting (usando anticorpo primário anti-cauda de histidina).

A partir da primeira purificação realizando a eluição num gradiente do tampão B foi possível determinar com quais concentrações de imidazol as proteínas permaneciam retidas na coluna ou eram eluídas, permitindo assim, que nas purificações posteriores a eluição das proteínas fosse feita em steps. Para eluição da LbSRPK um step de 30% do tampão B e depois 100% do tampão B. E para a LbSR um step de 50% e posteriormente 100% do tampão B para eluição. As frações coletadas para cada proteína foram analisadas por SDS-PAGE 10% para a LbSRPK e 12% para a LbSR. As principais frações, que continham as proteínas, foram dialisadas e quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para a proteína SR foi feito, ainda, um western blotting utilizando o anticorpo primário anti-proteínas SR (1H4) (Thermo Scientific). Foram analisadas amostras de lisado de *L. braziliensis* bem como a LbSR purificada.

4.8. Construção dos modelos tridimensionais das proteínas e ensaios de docking molecular com a LbSRPK truncada

A predição das estruturas tridimensionais das proteínas foi feita com o programa Phyre² (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0), utilizando o modo intensivo, que cria um modelo tridimensional completo para a sequência através da combinação dos múltiplos modelos gerados pela comparação com diferentes proteínas do banco de dados (Kelley et al., 2015). Posteriormente, foi feita a minimização de energia dos modelos obtidos utilizando o YASARA Energy Minimization Server, programa que executa simulações de dinâmica molecular dos modelos em um solvente explícito (Krieger et al., 2009). A minimização de energia é feita para suavizar as diferenças estruturais existentes entre o modelo gerado e os moldes utilizados

para predição, o que pode envolver não apenas o rearranjo de loops como também desvios de elementos de estrutura secundária e reempacotamento de resíduos (Krieger et al., 2009).

Os modelos finais foram validados utilizando diferentes programas. O RAMPAGE - Ramachandran Plot Assessment avalia a qualidade do gráfico de Ramachandram, definindo a porcentagem dos resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis (Lovell et al., 2003).

O Procheck avalia os parâmetros estereoquímicos do modelo, analisando características como comprimento de ligação, ângulo de ligação, ângulos de torção da cadeia principal e da cadeia lateral, dentre outros (Laskowski et al., 1996).

O ProSA-web - Protein Structure Analysis analisa a qualidade geral do modelo através de um z-score. O programa apresenta um gráfico com os z-scores de proteínas com estrutura determinada e depositada no PDB (Protein Data Bank) e que possuem um tamanho similar à proteína modelada e verifica se o z-score apresentado pelo modelo está dentro da faixa de z-scores encontrados para as demais proteínas. Além disto, avalia a qualidade do modelo de acordo com as energias dos resíduos em função de suas posições na sequência de aminoácidos, sendo que, em geral, os valores positivos correspondem a partes problemáticas ou errôneas da estrutura (Sippl, 1993; Wiederstein et al., 2007).

O Verify3D avalia a qualidade do modelo usando perfis tridimensionais, analisando a compatibilidade do modelo (3D) com sua própria sequência de aminoácidos (1D), baseado na localização e ambiente de cada resíduo. Através da comparação com um banco de dados, cada resíduo recebe uma pontuação média no perfil 3D-1D, com os scores variando de -1, considerada uma pontuação ruim e +1, uma boa pontuação, sendo que mais de 80% dos resíduos deve apresentar score maior ou igual a 0,2 no perfil 3D-1D (Bowie et al., 1991; Luthy et al., 1992).

O ERRAT analisa regiões das estruturas das proteínas que foram determinadas correta ou incorretamente com base em características de interação atômica. Diferentes tipos de átomos estão distribuídos de forma não

randômica em relação uns aos outros em proteínas, e desta forma, erros na construção dos modelos podem levar à uma distribuição mais randômica desses átomos, o que pode ser distinguido da forma de distribuição correta por métodos estatísticos. Os átomos são classificados em três categorias, gerando seis combinações diferentes de interações pareadas não-covalentes e uma função de erro quadrática é usada para caracterizar o conjunto das interações par a par. Com isto, o programa identifica regiões de erro na estrutura da proteína através da análise da estatística das interações atômicas par a par (Colovos et al., 1993).

Para a realização dos dockings moleculares foi construído um modelo tridimensional para a proteína LbSRPK, no qual foram removidas da sequência da proteína as regiões mais desordenadas, que interferiam na análise dos ligantes. Foram removidos os resíduos de aminoácidos de 1-123, 311-348 e 558-742, que correspondem às regiões N-terminal, espaçadora e C-terminal, respectivamente. O modelo da proteína truncada (LbSRPKt) foi construído e validado conforme descrito acima.

O modelo tridimensional da LbSRPKt foi utilizado para os dockings moleculares com o SRPIN340 e uma série de análogos (SRVIC15 a SRVIC36) deste composto, sintetizados e cedidos, gentilmente, pelo professor Róbson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química da UFV. A macromolécula e os ligantes foram preparados utilizando o Autodock e, em seguida, os dockings foram feitos usando o AutoDock Vina (Trott et al., 2010). Para visualização das estruturas e análise dos sítios de ligação foi utilizado o PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC (Seeliger et al., 2010).

4.9. Análise de propriedades físico-químicas dos compostos

A polarizabilidade e a área de superfície de Van der Waals do SRPIN340 e seus análogos foram analisadas utilizando o MarvinSketch 18.13.0 (ChemAxon), seguindo os parâmetros pré-estabelecidos pelo programa. A polarizabilidade representa a capacidade que um átomo ou molécula possui de ter sua distribuição eletrônica distorcida por um campo elétrico externo. Quanto

maior a polarizabilidade maior a tendência em alterar a densidade eletrônica, gerando dipolos momentâneos, o que torna esta propriedade molecular importante para ocorrência de interações intermoleculares. O cálculo da polarizabilidade é feito pelo programa utilizando dois métodos, um baseado nos parâmetros atômicos de Miller et al. (1979) e o outro nos parâmetros de Jensen (2002) (Miller et al., 1979; Jensen, L., 2002).

O método de cálculo da superfície de Van der Waals é baseado em Ferrara et al. (2001). A análise se baseia no método probabilístico de Wodak e Janin, com modificações. Este método expressa a área de superfície acessível como uma função das distâncias entre pares de átomos ou resíduos na estrutura proteica assumindo que esses átomos ou resíduos são distribuídos randomicamente no espaço, mas não penetram um no outro (Wodak et al., 1980). As modificações permitem aplicá-lo ao cálculo de áreas de superfície atômicas, sendo o cálculo uma função do emparelhamento de posições atômicas e raios, o que o torna bastante rápido (Hasel et al., 1988; Ferrara et al., 2001).

4.10. Detecção da viabilidade celular

A viabilidade celular foi quantificada a partir da redução da resazurina (Alamar Blue) (Mikus et al., 2000; O'Brien et al., 2000; Rampersad, 2012; Kulshrestha et al., 2013). Após o tratamento com os compostos foram adicionados 20 µL da resazurina por poço na placa de 96 poços e esta foi novamente incubada na condição experimental em questão. A cada hora, durante 3 horas foram realizadas leituras colorimétricas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A redução da resazurina foi, então, calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Redução} = [A_{570} - (A_{600} \times R0)]$$

A_{570} representa a absorvância da resazurina em 570 nm, A_{600} representa a absorvância da resazurina em 600 nm e R0 é um fator de correção obtido da seguinte fórmula:

$$R0 = \text{Meio}_{570} / \text{Meio}_{600}$$

Meio₅₇₀ representa a absorvância da resazurina em 570 nm de poços que contém apenas meio de cultura e Meio₆₀₀ a absorvância em 600 nm dos mesmos poços.

Poços com células sem tratamento foram considerados como tendo viabilidade máxima (100%) e os demais foram transformados em porcentagem baseado nos valores obtidos para estes poços controle.

4.11. IC₅₀ dos compostos SRVIC22 e SRVIC32 em macrófagos RAW 264.7 e em promastigotas

Dados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa mostraram que dois compostos, dentre uma série de 22 análogos do SRPIN340 (N-(2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida), possuem atividade leishmanicida em modelos de infecção de macrófagos por *Leishmania braziliensis* (Onofre, 2017). Esses compostos, 2-cloro-N-(2-(dietilamina)-5-(trifluorometil)fenil)nicotinamida (SRVIC22) e N-(2-(ciclohexilamina)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (SRVIC32), foram sintetizados como descrito em Siqueira (2017) e cedidos pelo professor Róbson Ricardo Teixeira, do Departamento de Química da UFV.

Para a determinação do IC₅₀ dos compostos em macrófagos foram adicionadas $0,5 \times 10^5$ células de macrófagos em 92 dos 96 poços de uma microplaca e nos 4 poços restantes foi adicionado apenas meio RPMI suplementado, em um volume final de 200 μ L. A microplaca foi incubada por 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂, para permitir a adesão das células. Após o tempo de incubação todo o meio foi removido e os poços foram lavados por três vezes com 100 μ L de RPMI base (sem soro fetal bovino) para a remoção das células que não se aderiram. Os 4 poços nos quais não foram adicionadas células foram mantidos com apenas o meio de cultura. Em outros 4 poços, que continham células, também foi adicionado apenas o meio de cultura, para manter células sem tratamento. Nos demais poços foram adicionados, em triplicata, os compostos em diferentes concentrações, variando de 0 a 200 μ M, sendo as diluições dos compostos realizadas previamente de forma seriada.

Após a adição dos compostos, a placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ por 48 horas. Após 47 horas de incubação foi adicionada a resazurina em todos os poços e determinada a viabilidade celular como descrito no item 4.10. Foram feitas três repetições do referido ensaio.

Para a determinação do IC₅₀ dos compostos em promastigotas, 4x10⁶ células, em fase log de crescimento, foram adicionadas em 92 poços da microplaca, sendo nos 4 restantes adicionado apenas meio de cultura, o meio Grace's suplementado. Em 4 poços, que continham células, foi adicionado meio de cultura, mantendo células sem tratamento e, nos demais poços foram adicionados, em triplicata, os compostos em diferentes concentrações, variando de 0 a 200 µM, com as diluições dos compostos realizadas previamente de forma seriada. Após adição dos compostos, a placa foi incubada em estufa a 25 °C por 48 horas. Após 47 horas de incubação foi adicionada a resazurina em todos os poços e determinada a viabilidade celular como descrito no item 4.10. Três repetições do ensaio foram feitas.

4.12. Avaliação, in vitro, do efeito dos compostos combinados

4.12.1. Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

Em 92 dos 96 poços de uma microplaca foram adicionadas 0,5x10⁵ células de macrófagos e nos 4 restantes adicionado apenas meio RPMI completo, em um volume final de 200 µL. A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após a incubação e adesão das células à placa, todo o meio de cultura foi removido e foram feitas 3 lavagens com 100 µL de meio RPMI base (sem adição de soro fetal bovino) para remoção de células não aderidas.

Foram feitos quatro tipos de controle: 1) os 4 poços da microplaca de 96 poços nos quais não foram adicionadas células foram mantidos com apenas meio de cultura; 2) em 4 poços foi adicionada anfotericina B (3,125 µg/mL – Sigma®); 3) em outros 4 poços foi adicionado DMSO, na mesma concentração

utilizada nos compostos (1%) e 4) em mais 4 poços foi adicionado meio RPMI completo, para manter células sem tratamento.

Nos poços restantes foram adicionados os compostos, em triplicata. Foram testadas diferentes combinações dos compostos SRVIC22 e SRVIC32, utilizando diferentes proporções dos mesmos, em uma concentração máxima total de 10 μ M. Após a adição dos compostos, a placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ por 48 horas. Após 47 horas de incubação foi adicionada a resazurina em todos os poços e determinada a viabilidade celular como descrito no item 4.10. O ensaio foi realizado com três repetições.

4.12.2. Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas

Em 92 dos 96 poços de uma microplaca foram adicionadas 4×10^6 células, em fase log de crescimento, e nos 4 poços restantes foi adicionado apenas meio Grace's suplementado, em um volume final de 200 μ L. Dos poços que continham células, em 4 deles foi adicionado meio de cultura, mantendo células sem tratamento, em outros 4 foi adicionado DMSO, na mesma concentração utilizada nos compostos (1%) e em mais outros 4 poços foi adicionada anfotericina B (3,125 μ g/mL – Sigma®). Nos poços restantes foram adicionados os compostos, em triplicata. Foram testadas diferentes combinações dos compostos SRVIC22 e SRVIC32, utilizando diferentes proporções dos mesmos, em uma concentração máxima total de 10 μ M. Após a adição dos compostos, a placa foi incubada em estufa a 25 °C por 48 horas. Após 47 horas de incubação o foi adicionada a resazurina em todos os poços e determinada a viabilidade celular, como descrito no item 4.10. Foram feitas três repetições do ensaio.

4.12.3. Avaliação da atividade leishmanicida em ensaios de infecção in vitro

Em microplacas de 24 poços foi colocada uma lamínula circular por poço. Posteriormente, foram adicionadas 5×10^5 células de macrófagos em cada poço,

em um volume final de 200 μL . A microplaca foi incubada por 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO_2 , para permitir a adesão das células. Após o tempo de incubação todo o meio foi removido e os poços foram lavados por três vezes com 100 μL de RPMI base (sem soro fetal bovino) para a remoção das células que não se aderiram. $7,5 \times 10^6$ células de *L. braziliensis*, em fase estacionária de crescimento, foram adicionadas em cada poço e a placa foi incubada por mais 24 h na estufa úmida, a 37 °C com 5% de CO_2 . Após esta incubação, todo o meio foi removido e foram feitas três lavagens com 100 μL de meio RPMI base, para remoção das células de *Leishmania* que não infectaram os macrófagos. Foram adicionados 200 μL de meio RPMI suplementado em todos os poços e feita uma nova incubação por mais 24 h, para o estabelecimento da infecção. Após o período de incubação, todo o meio foi removido.

Dos poços infectados, em 2 deles foi adicionado apenas meio de cultura, mantendo células sem tratamento, em outros 2 poços foi adicionada anfotericina B (3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – Sigma[®]) e em mais 2 poços foi adicionado DMSO, na mesma concentração utilizada nos compostos (1%). Nos poços restantes foram adicionados os compostos, em duplicata. Foram testados o composto SRVIC22 na concentração de 10 μM , o composto SRVIC32 também na concentração de 10 μM e a combinação destes dois compostos na proporção de 1:1 (concentração final de 5 μM de cada composto). Após a adição dos compostos, a placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO_2 por 48 horas. Ao final do período de incubação o meio foi removido e os poços foram lavados com RPMI base, para remoção de qualquer resquício dos compostos testados. As lamínulas foram, então, removidas da placa e as células foram coradas usando panótico rápido (Laborclin), de acordo com as recomendações do fabricante.

Para avaliação da atividade leishmanicida, 300 células para cada lamínula foram avaliadas randomicamente, determinando-se a porcentagem de células infectadas e o número de parasitos intracelulares. O ensaio foi realizado com três repetições.

4.13. Análise da expressão da possível SRPK em *L. braziliensis* por qPCR

Amostras de *L. braziliensis* em diferentes formas e fases de crescimento (formas promastigotas em fase log, formas promastigotas em fase estacionária e formas amastigotas) e dos tratamentos da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* com DMSO (1%), AnfB (3,125 µg/mL), SRVIC22 (10 µM), SRVIC32 (10 µM) e com a combinação usando a proporção de 1:1 de cada composto (concentração final de 5 µM do SRVIC22 e 5 µM do SRVIC32) foram utilizadas para extração de RNA total e síntese de cDNA. A concentração e a qualidade dos cDNAs obtidos foram avaliadas usando NanoDrop (Thermo Scientific™). Os cDNAs foram utilizados, inicialmente, para a análise da eficiência dos primers (**Tabela 3**) para genes endógenos (GAPDH e G6PD) e para o gene da possível SRPK e, em seguida, foram utilizados para a análise da expressão da possível SRPK nas diferentes amostras acima citadas.

Tabela 3. Primers utilizados no qPCR.

	Foward Primer	Reverse Primer
GAPDH	5' ggagatagacaaggccatcaag 3'	5' tgtcggtgatgaagtcagagc 3'
G6PD	5' gtccgaggctatgtatgtcaag 3'	5' catcgtaccgagtggtatg 3'
SRPK	5' gactctgagaagccagttgag 3'	5' cgtcgctactctcttcatcttc 3'

Todas as reações de qPCR foram realizadas utilizando o Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), o qual inclui o fluoróforo SYBR Green, Taq DNA polimerase e dNTPs em um tampão otimizado, sendo necessário acrescentar apenas o template (cDNA) e os primers. Os ensaios foram realizados no termociclador 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems), utilizando-se o método do $\Delta\Delta CT$ comparativo.

Para análise da eficiência foram testadas, em duplicata, três concentrações diferentes dos pares de primers - 100 nM, 200 nM e 400 nM, e três diferentes quantidades de um pool de cDNA (contendo uma alíquota de cada amostra citada acima) - 25 ng, 75 ng e 225 ng. A especificidade da amplificação foi verificada pela curva de dissociação ou curva de melting. A presença de um

único pico na curva demonstra a especificidade, assim como confirma a ausência de dímeros de primers e produtos inespecíficos. A condição que apresentou a maior eficiência da reação, para cada par de primer, foi selecionada para prosseguimento dos ensaios. Para a análise da expressão gênica as reações foram montadas utilizando as diferentes amostras de cDNA citadas acima e as condições definidas de concentração de primer e quantidade de cDNA. As reações foram feitas em duplicata, sendo que também houve uma duplicata biológica.

4.14. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism (versão 6.01).

4.15. Experimento in vivo

4.15.1. Modelo animal

Para avaliação da toxicidade dos compostos, in vivo, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas (4 a 8 semanas de idade) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais, provenientes do Biotério Central – CCB/UFV, foram transportados, no menor tempo possível, dentro de contêineres seguros, confortáveis e à prova de fuga, com fornecimento de água e comida adequados e acondicionados no biotério do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral, na Universidade Federal de Viçosa, sob condições ambientais controladas (temperatura ambiente de 22-25°C, umidade relativa de 60-65% e ciclos de luminosidade de 10h de luz-14h de escuro (Sifontes-Rodriguez et al., 2015)).

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com dimensões de 49 cm x 34 cm x 16 cm forradas com maravalha previamente autoclavada, com

6 animais em cada caixa. As gaiolas foram higienizadas a cada dois dias (as caixas foram totalmente esvaziadas, lavadas e desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio e, em seguida, colocada uma nova maravalha, previamente autoclavada). Os animais receberam água e comida à vontade durante todo o experimento e foram submetidos a um período de adaptação antes do começo das atividades. A ração oferecida foi do tipo comercial apropriada para ratos, camundongos e hamsters e a água obtida do sistema de abastecimento da Universidade Federal de Viçosa, sendo autoclavada antes de ser dada aos animais. Os experimentos foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) – certificado número 30/2018 (**Anexo 1**) – e respeitando os princípios éticos do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário.

4.15.2. Grupos experimentais e análise estatística

Para avaliação da toxicidade dos compostos foram utilizados 6 animais por grupo, em um total de 9 grupos experimentais:

- Grupo 1: tratado com PBS;
- Grupo 2: tratado com DMSO;
- Grupo 3: tratado com anfotericina B;
- Grupo 4: tratado com o composto SRVIC22 em dose de 1,0 mg/Kg/dia;
- Grupo 5: tratado com o composto SRVIC22 em dose de 2,5 mg/Kg/dia;
- Grupo 6: tratado com o composto SRVIC22 em dose de 5 mg/Kg/dia;
- Grupo 7: tratado com o composto SRVIC32 em dose de 0,5 mg/Kg/dia;
- Grupo 8: tratado com o composto SRVIC32 em dose de 1,0 mg/Kg/dia;
- Grupo 9: tratado com o composto SRVIC32 em dose de 2,0 mg/Kg/dia.

O cálculo do número de animais por grupo foi feito utilizando o software Minitab 14[®], levando em conta a força e o tamanho da amostra. Para o cálculo foram adotados os seguintes valores: poder do teste de hipótese igual a 0,95;

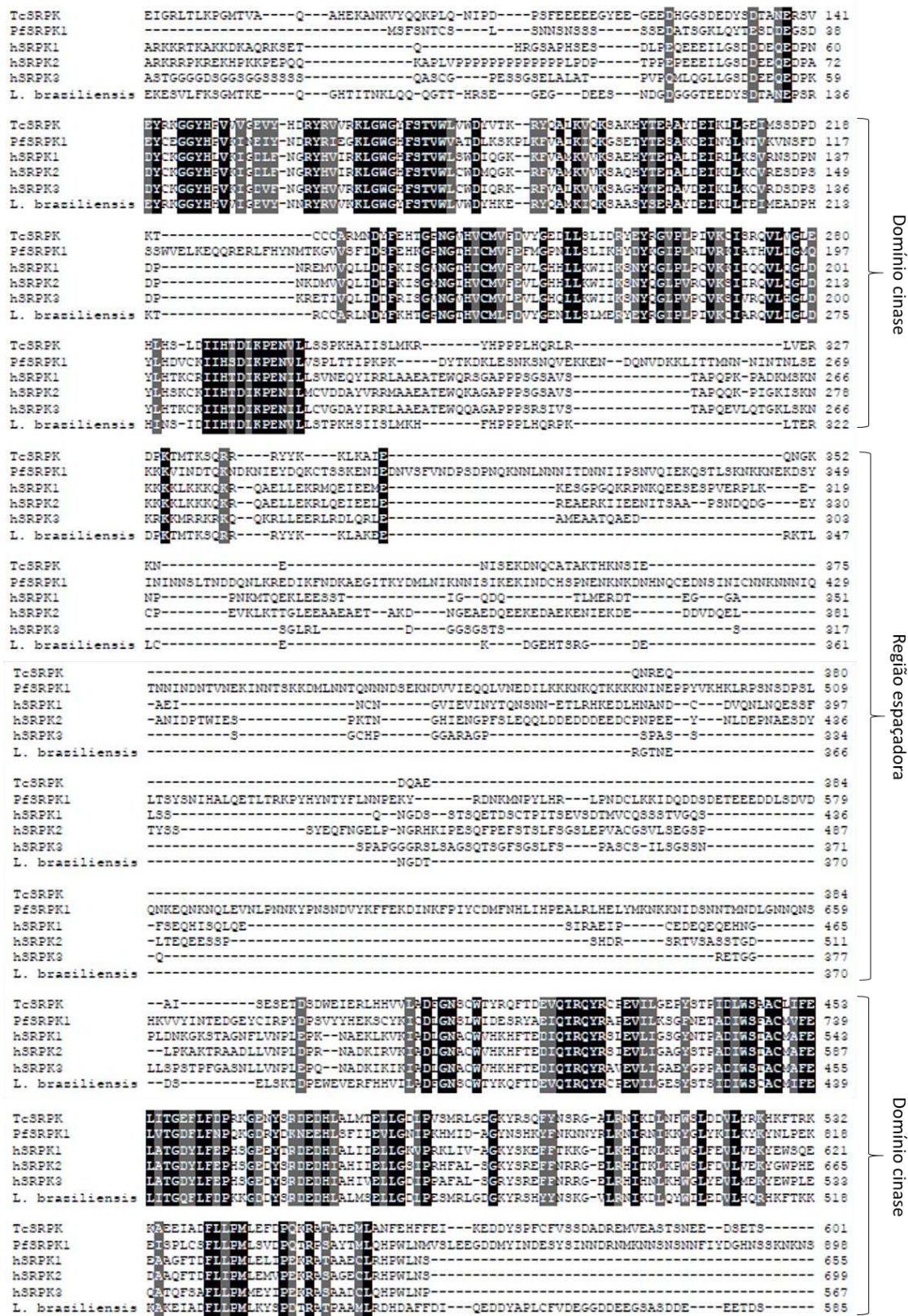
diferença a ser detectada pelo teste igual a 1,17; valor de alfa igual a 0,05; e desvio padrão de 0,5.

4.15.3. Avaliação da toxicidade dos compostos

Os animais receberam diferentes doses dos compostos por via intravenosa, em dias alternados, durante um período de 15 dias. Para uma melhor visualização das veias, as caudas dos camundongos foram imersas em água quente a 40-50 °C por alguns segundos e, os animais foram contidos dentro de um pequeno recipiente para a administração das doses.

Após esse período de 15 dias, os animais foram eutanasiados, por pessoal devidamente treinado, utilizando a técnica de deslocamento cervical em substituição à utilização de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis recomendados pela resolução número 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. O uso de anestésicos pode interferir na resposta imune (Markovic et al., 1990; Thompson et al., 2002), comprometendo os resultados obtidos. Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta e o fígado e os rins coletados. Fragmentos destes órgãos foram processados histologicamente para análise do efeito dos compostos em sua arquitetura. Além disto, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca e, em seguida, centrifugado para separação do soro. Este, foi utilizado nas dosagens de enzimas hepáticas, para avaliação dos efeitos dos tratamentos.

Foram feitas as dosagens das enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina e gama glutamil transferase (GGT) através da utilização dos kits comerciais Transaminase ALT (TGP) cinética (Bioclin), Fosfatase alcalina (Bioclin) e Gama GT cinético (Bioclin), respectivamente. Além disto, também foi feita a dosagem da creatinina, utilizando o kit comercial Creatinina cinética (Bioclin). Alterações nos níveis de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina e gama glutamil transferase (GGT) permitem avaliar a presença de danos no tecido hepático e alterações nos níveis de creatinina danos no tecido renal.



Domínio cinase

Região espaçadora

Domínio cinase

Figura 6. Alinhamento da sequência encontrada para a SRPK com sequências de SRPKs já descritas na literatura utilizando o Clustal Omega, mostrando a presença das regiões de domínio cinase conservadas e a região espaçadora variável. Resíduos idênticos estão marcados em preto e resíduos similares em cinza.

As regiões espaçadoras das SRPKs humanas apresentam tamanho variável, de 160 a 280 resíduos de aminoácidos, e regulam a localização celular destas proteínas (Ghosh et al., 2011; Giannakouros et al., 2011). Para a TcSRPK, SRPK identificada em *T. cruzi*, foi observada uma região espaçadora com cerca de 86 resíduos de aminoácidos. Embora seja menor, quando comparada às regiões espaçadoras das SRPKs humanas, possui um sinal de exportação nuclear, o que sugere uma possível conservação no mecanismo de localização celular (Portal et al., 2003b). A possível SRPK encontrada em *L. braziliensis*, assim como a TcSRPK, apresenta uma região espaçadora menor, de 77 resíduos de aminoácidos. Dessa forma, por ser um mecanismo possivelmente conservado, pode ser que a região espaçadora da possível SRPK também apresente sinais que regulem sua localização celular.

Adicionalmente, a possível SRPK apresenta cerca de 31,08% de identidade de sequência em relação à SRPK de *P. falciparum* e 40% de identidade em relação às SRPKs humanas (SRPK1 - 40,49%, SRPK2 - 39,10% e SRPK3 - 39,95%) enquanto para a TcSRPK a identidade é de aproximadamente 57% (**Anexo 2**). Isto indica que, além da região de domínio cinase, estas proteínas podem apresentar outras regiões conservadas, reforçando a hipótese de sinais de localização celular conservados entre a proteína de *T. cruzi* e a suposta proteína de *L. braziliensis*. A análise da sequência da possível SRPK no NetNES 1.1 Server, ferramenta para predição de sinal de exportação nuclear (NES) (la Cour et al., 2004) mostrou a presença de três resíduos de aminoácidos com pontuação NES acima da linha de corte, o que indica que esses resíduos, possivelmente, participam de um sinal de exportação nuclear (**Anexo 3**).

A busca por possíveis proteínas SR através do Blastp, dentro do banco de dados do NCBI e do TritypDB, utilizando como referência sequências de proteínas SR já descritas, também permitiu a identificação de uma possível proteína SR (NCBI ID: XP_001565981.2; TritypDB ID: LbrM.27.2280). A sequência também foi avaliada através do Pfam, com o qual foi possível observar a presença de motivos de reconhecimento de RNA, que são característicos destas proteínas. Além disto, também observamos a presença de repetições SR

primers específicos para estas sequências, o que possibilitou a realização dos experimentos de clonagem, descritos adiante.

5.2. Curva de crescimento de *L. braziliensis* M2904

Para a determinação do perfil de crescimento do parasito foi feita a curva de crescimento em meio Grace's suplementado, iniciando-se com 1×10^5 células/mL. De acordo com o resultado obtido (**Figura 8**) foi observado que o parasito se encontra em fase log, de crescimento exponencial, até o 5º dia de cultivo, alcançando a fase estacionária de crescimento no 6º dia.

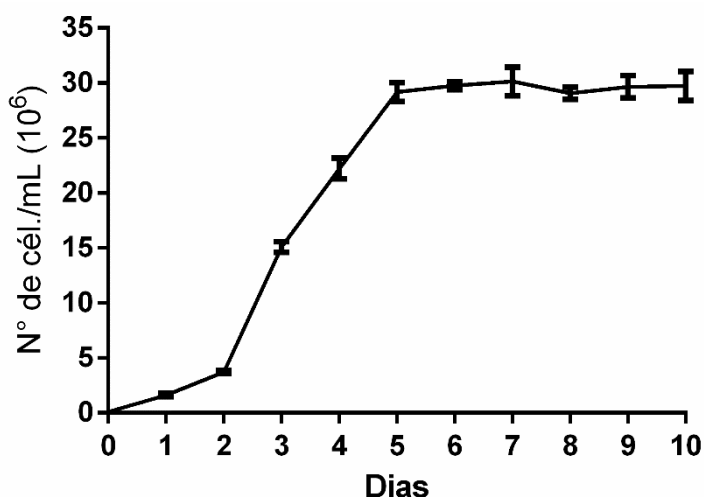


Figura 8. Curva de crescimento de *L. braziliensis*, cepa M2904, em meio Grace's suplementado a 25°C.

Durante o cultivo *in vitro* dois tipos principais de promastigotas são observados na cultura, promastigotas procíclicas e promastigotas metacíclicas. As formas procíclicas são mais alongadas, não infecciosas e se replicam ativamente, sendo predominantes na fase log de crescimento. Já as formas metacíclicas são pequenas, delgadas, apresentam um flagelo relativamente mais longo e são infecciosas, sendo observadas na fase estacionária de crescimento (Cysne-Finkelstein et al., 1998). Essas diferentes fases de

crescimento são utilizadas em experimentos posteriores, como a avaliação do potencial leishmanicida em promastigotas totais, onde são utilizados parasitos em fase log, e os ensaios de infecção in vitro, onde se utiliza parasitos em fase estacionária.

A partir da curva de crescimento, determinou-se que no 6º dia é observada a maior densidade de células. Este dia foi, então, definido para a coleta das células, de forma a obter um maior rendimento na extração de RNA total, que foi utilizado nos experimentos seguintes de clonagem.

5.3. Clonagem das sequências que codificam a LbSRPK e a LbSR em vetor de expressão

O cDNA, sintetizado a partir do RNA extraído de *L. braziliensis*, foi utilizado para amplificação, via PCR, das sequências de interesse, responsáveis por codificar as proteínas LbSRPK e LbSR.

Inicialmente, os produtos de PCR obtidos foram purificados e inseridos em vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega), por meio de uma reação de ligação, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante. Foram obtidos clones contendo as sequências de interesse, 3 clones para a LbSRPK e 2 clones para a LbSR. Estes clones foram utilizados para os experimentos de subclonagem em vetor de expressão. Os clones do pGEM, assim como o vetor pET-28a, foram digeridos com as enzimas de restrição e os fragmentos de interesse foram inseridos no pET-28a por meio de uma reação de ligação. Após a transformação de *E. coli* DH5 α com os materiais provenientes das reações de ligação do vetor pET-28a com as sequências de interesse foram obtidos 14 possíveis clones para a LbSRPK e 6 para a LbSR. Estes clones tiveram, então, seu DNA plasmidial extraído, para serem utilizados na confirmação da subclonagem por PCR e ensaios de digestão usando enzimas de restrição.

A região correspondente à LbSRPK possui 2.229 pb. Como mostrado na **Figura 9**, a PCR utilizando o DNA plasmidial dos dois clones, 2.9 e 2.12, amplificou um fragmento do tamanho esperado para o inserto. Além disto, a

banda amplificada para os clones ficou na mesma altura da banda do controle positivo, na qual foi utilizado para amplificação o cDNA obtido de *L. braziliensis*, material que foi utilizado para a clonagem no pGEM e, na reação do controle negativo, na qual foi adicionada água ao invés de material genético, não houve nenhuma amplificação, demonstrando que não houve contaminação durante o processo. Ainda, a digestão com as enzimas de restrição, *NdeI* e *EcoRI*, liberou um fragmento correspondente ao tamanho esperado, sendo observada uma banda entre 2.000 e 3.000 pb.

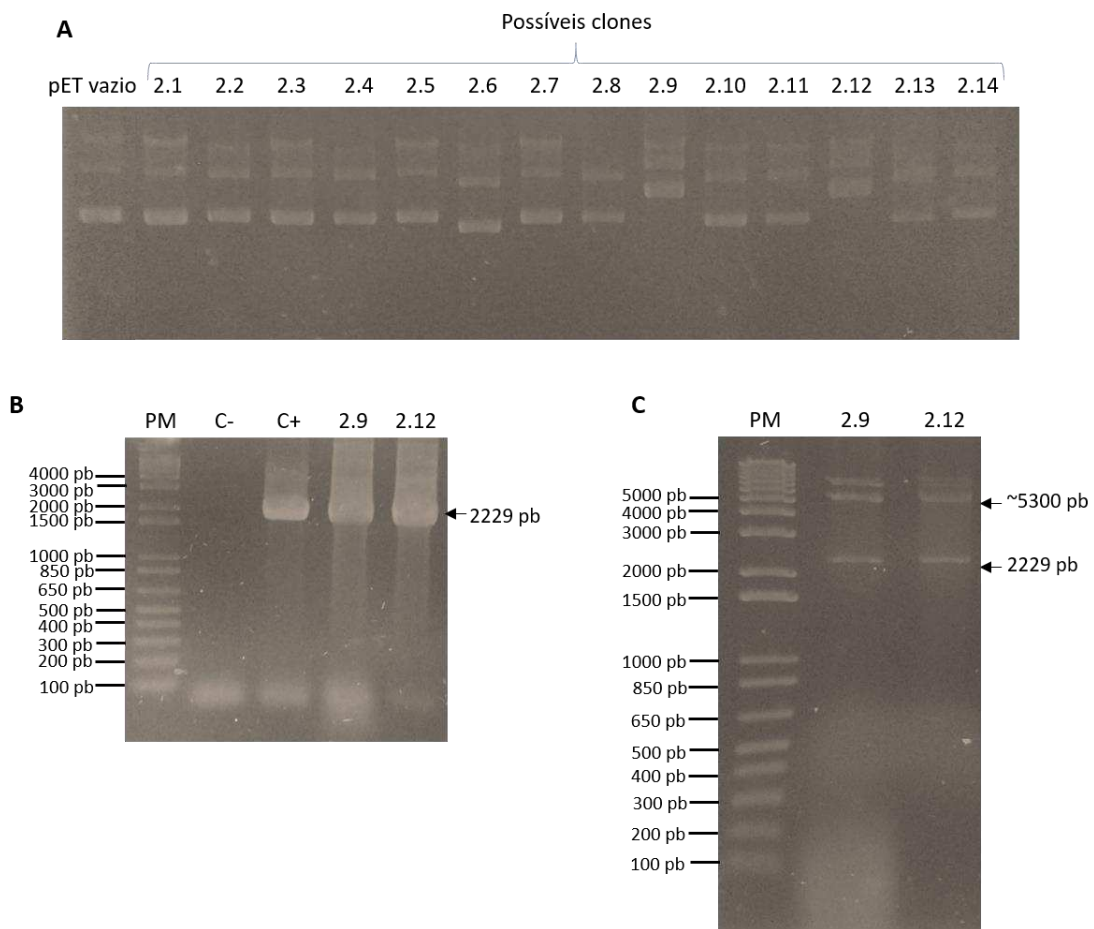


Figura 9. Subclonagem da LbSRPK em vetor de expressão pET-28a. A) DNA plasmidial dos clones obtidos. B) PCR dos clones selecionados com os primers específicos e C) Digestão dos clones selecionados com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. PM = padrão de peso molecular; C- = controle negativo (água); C+ = controle positivo (cDNA de *L. braziliensis*); e os números representam os possíveis clones obtidos.

Já a região correspondente à LbSR possui 1.257 pb. Como demonstrado na **Figura 10**, a PCR feita a partir do DNA plasmidial dos quatro clones selecionados - 1, 3, 5 e 6 - também amplificou um fragmento do tamanho esperado para o inserto. Não houve amplificação no controle negativo, no qual foi adicionada água ao invés de material genético, demonstrando que não houve contaminação durante o processo e, a banda amplificada para os clones se apresentou do mesmo tamanho que a banda amplificada no controle positivo, na qual foi utilizado para amplificação o cDNA obtido de *L. braziliensis*, material utilizado para a clonagem no pGEM. Além disto, a digestão utilizando as enzimas de restrição, *NdeI* e *XhoI*, liberou um fragmento correspondente ao tamanho esperado, sendo observada uma banda entre 1.000 e 1.500 pb.

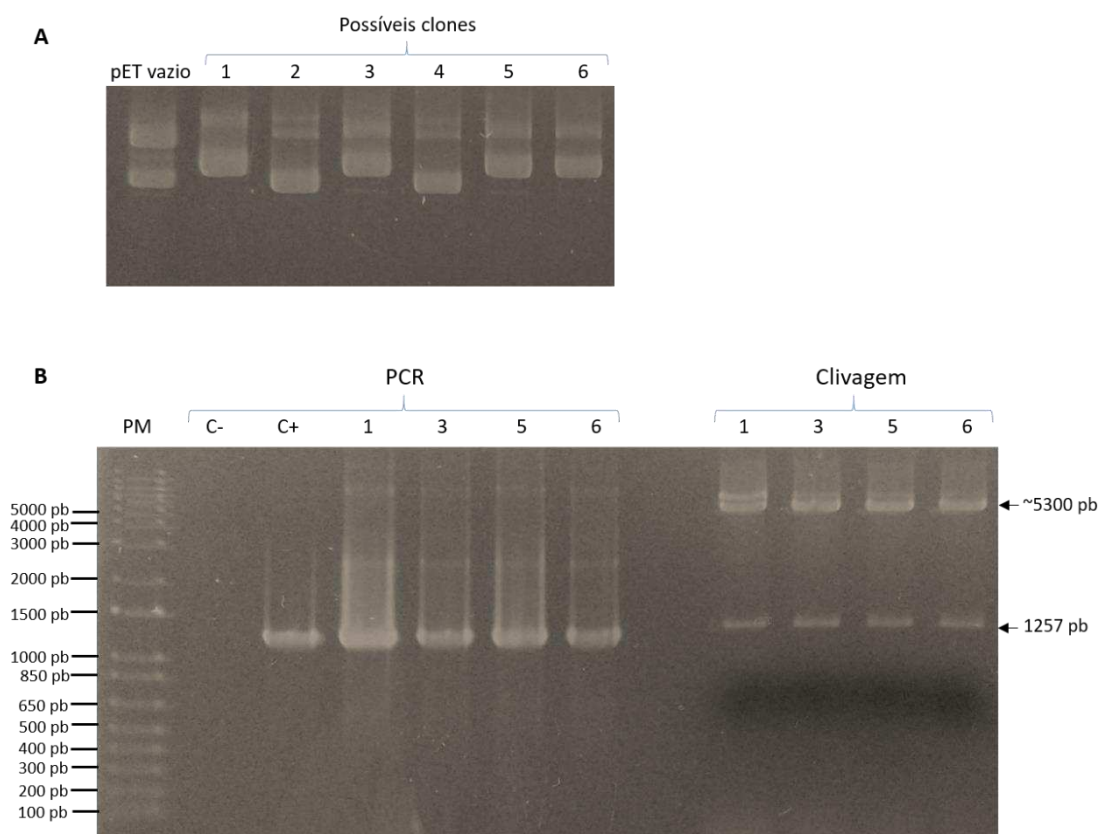


Figura 10. Subclonagem da LbSR em vetor de expressão pET-28a. A) DNA plasmidial dos clones obtidos. B) PCR dos clones selecionados com os primers específicos e digestão dos clones selecionados com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Todas as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. PM = padrão de peso molecular; C- = controle negativo (água); C+ = controle positivo (cDNA de *L. braziliensis*); e os números representam os possíveis clones obtidos.

Os clones confirmados por PCR e ensaios de digestão também foram sequenciados, confirmando que apresentavam as sequências corretas inseridas no DNA plasmidial e que estas se encontravam no quadro de leitura correto.

5.4. Expressão das proteínas recombinantes em E. coli

Os plasmídeos recombinantes foram, então, inseridos em E. coli BL21 (DE3) RIL por transformação e as bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB líquido. A indução da expressão das proteínas foi feita sob diferentes condições de temperatura (30 °C e 37 °C), tempo (0 h a 5 h) e concentração de IPTG (0,10 mM e 0,25 mM). As frações solúveis e insolúveis da LbSRPK e da LbSR obtidas para cada condição testada, de temperatura, tempo e concentração de IPTG, foram avaliadas por SDS-PAGE e Western blotting para comprovar a produção das proteínas, avaliar em qual fração elas se encontravam e quais parâmetros geraram um maior rendimento. Todas as amostras foram previamente quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), sendo aplicadas 10 µg de cada amostra nos géis.

Como mostrado na **Figura 11**, podemos observar que a expressão da LbSRPK a 37°C foi maior quando comparada à expressão a 30°C, entretanto na temperatura de 30°C a proteína se encontrava predominantemente na fração solúvel enquanto na temperatura de 37°C verificamos o contrário, a proteína se encontrava na fração insolúvel. A redução da temperatura leva a uma diminuição na velocidade de síntese das proteínas, com isso, a maquinaria de enovelamento consegue atuar por mais tempo nas proteínas produzidas. Dessa forma, o dobramento correto evita que elas se agreguem e precipitem, permanecendo na fração solúvel. Entre as concentrações de IPTG testadas, 0,10 mM e 0,25 mM não foram observadas diferenças no nível de expressão. Quando comparados os tempos, podemos ver que a expressão com 1h de indução é um pouco menor, passando a não apresentar diferença após 2h de indução. A diferença que podemos observar é com relação à fração onde se encontra a proteína. Com o passar do tempo, na temperatura de 30°C, a quantidade de proteína encontrada na fração insolúvel aumenta. A medida que aumenta o tempo de indução

aumenta a quantidade de proteína produzida, o que favorece a ocorrência de agregados proteicos, que precipitam, e a proteína passa a ser encontrada na fração insolúvel. Já na temperatura de 37°C, passamos a encontrar uma pequena quantidade da proteína na fração solúvel.

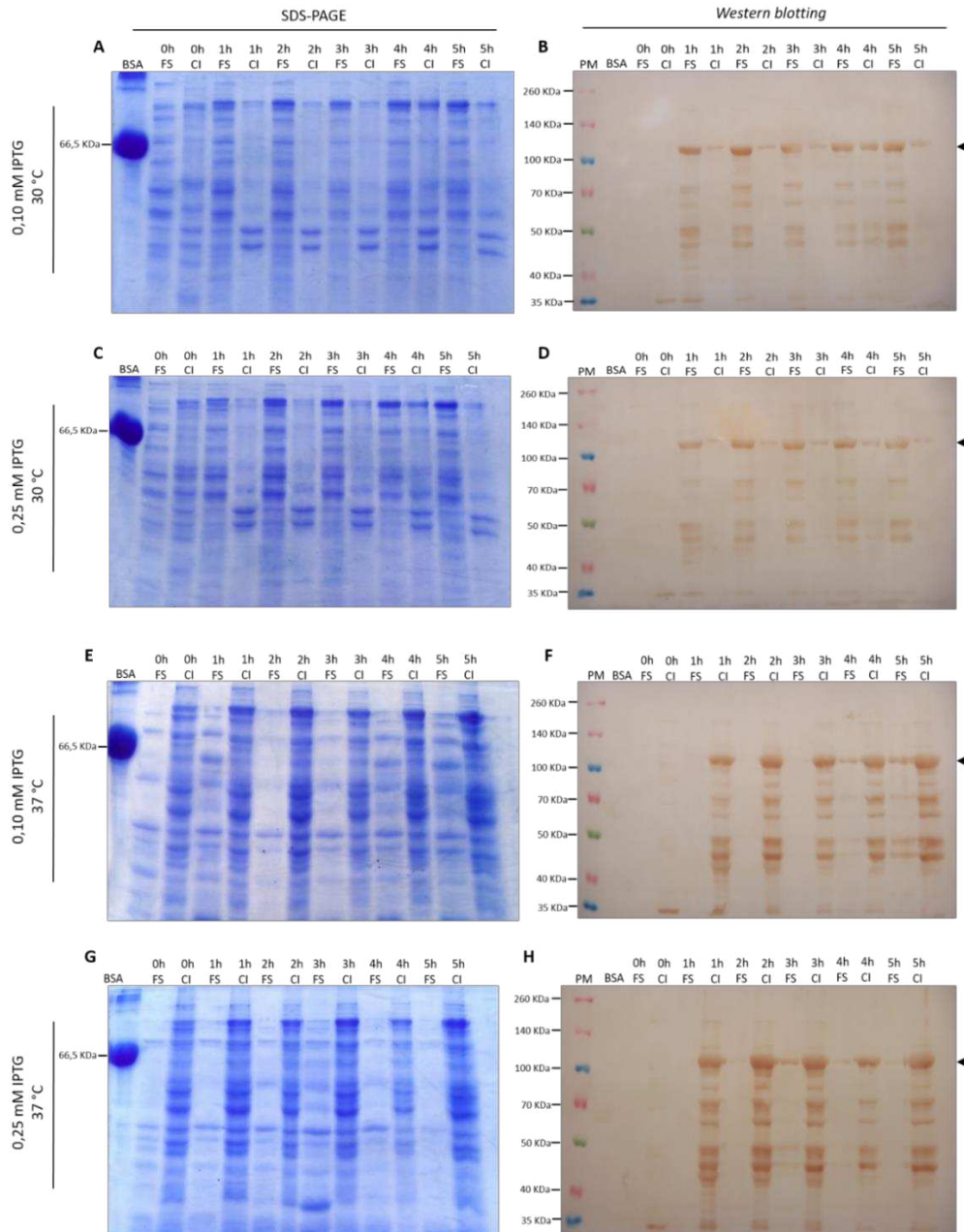


Figura 11. Análise da expressão da LbSRPK por SDS-PAGE 10% e Western blotting. A e B) 0,10 mM de IPTG e 30°C; C e D) 0,25 mM de IPTG e 30°C; E e F) 0,10 mM de IPTG e 37°C; G e H) 0,25 mM de IPTG e 37°C. PM = padrão de peso molecular; B SA = albumina sérica bovina – utilizada como controle negativo para o Western blotting; FS = fração solúvel e CI = corpo de inclusão, fração insolúvel. As setas indicam as bandas de interesse. Foram utilizados os anticorpos anti-his monoclonal produzido em camundongo (*Cusabio*), diluição 1:3.000 e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma*), diluição 1:10.000.

Para a proteína LbSR podemos observar, através da **Figura 12**, que a quantidade de proteína produzida, na temperatura de 30°C, foi um pouco maior quando utilizou-se a concentração de 0,10 mM de IPTG. Em ambas as concentrações de indutor, 0,10 e 0,25 mM, a expressão da proteína aumenta com o decorrer do tempo, sendo que, na concentração de 0,10 mM, a partir de 4h de indução a proteína também passa a ser encontrada na fração insolúvel, o que não é observado na concentração de 0,25 mM. Na temperatura de 37°C, as quantidades de proteína induzidas foram equivalentes em ambas as concentrações de IPTG testadas, com a expressão aumentando ao longo do tempo de indução. Entretanto, observamos diferenças quanto às frações onde a proteína se encontra. Para a concentração de 0,10 mM de IPTG a proteína pode ser encontrada em ambas as frações, estando predominantemente na fração insolúvel até 3h de indução. Nos tempos de 4h e 5h se encontra em maior parte na fração solúvel. Já para a concentração de 0,25 mM de IPTG a proteína é encontrada predominantemente na fração solúvel até 2h de indução, na fração insolúvel com 3h e 4h e volta a estar em maior quantidade na fração solúvel no tempo de 5h de indução.

Diante do exposto, foram selecionadas as melhores condições para a produção das proteínas em maior escala, sendo escolhidos os parâmetros que permitiram obter uma maior quantidade de proteína na fração solúvel. Assim, foram escolhidos para a LbSRPK as seguintes condições: temperatura de 30°C, concentração de IPTG de 0,10 mM e tempo de indução de 2 horas. Já para a LbSR foram as seguintes condições: temperatura de 30°C, concentração de IPTG de 0,10 mM e tempo de indução de 3 horas.

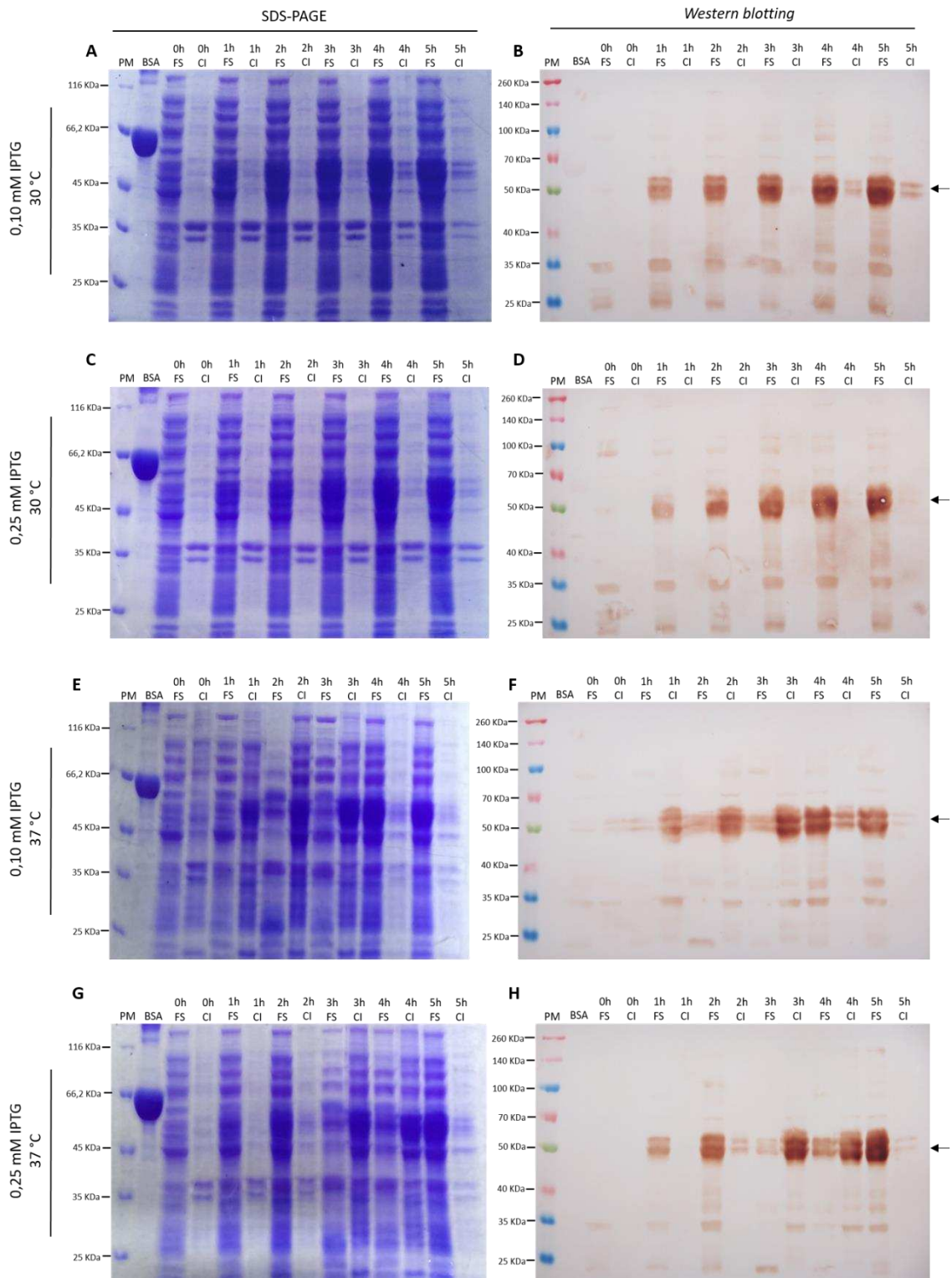


Figura 12. Análise da expressão da LbSR por SDS-PAGE 12% e Western blotting. A e B) 0,10 mM de IPTG e 30°C; C e D) 0,25 mM de IPTG e 30°C; E e F) 0,10 mM de IPTG e 37°C; G e H) 0,25 mM de IPTG e 37°C. PM = padrão de peso molecular; B SA = albumina sérica bovina – utilizada como controle negativo para o Western blotting; FS = fração solúvel e CI = corpo de inclusão, fração insolúvel. As setas indicam as bandas de interesse. Foram utilizados os anticorpos anti-his monoclonal produzido em camundongo (*Cusabio*), diluição 1:3.000 e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (*Sigma*), diluição 1:10.000.

5.5. Purificação das proteínas

Com as condições de expressão definidas as proteínas foram induzidas em um maior volume de meio. Os pellets formados pelas células de *E. coli* cultivadas foram lisados e os extratos brutos proteicos presentes nas frações solúveis foram utilizados para purificação da LbSRPK e LbSR por cromatografia de afinidade, uma vez que as proteínas possuem uma cauda constituída de seis resíduos de histidina na sua porção N-terminal. Na primeira purificação realizada para cada proteína a eluição foi feita utilizando um gradiente de 0-100% do tampão de eluição (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 300 mM imidazol e 5% glicerol, pH 7,5). As frações obtidas para cada proteína foram, então, analisadas por SDS-PAGE e Western blotting.

Através da análise das frações obtidas para a LbSRPK (**Figura 13**), podemos ver que as primeiras frações eluídas não contêm a proteína de interesse, mas possuem outras proteínas de diferentes tamanhos. A partir da fração de número 4 é encontrada uma banda do tamanho de interesse, confirmada como sendo a LbSRPK através do Western blotting. Embora a LbSRPK esteja em maior concentração podemos observar a presença de outras proteínas junto com a de interesse.

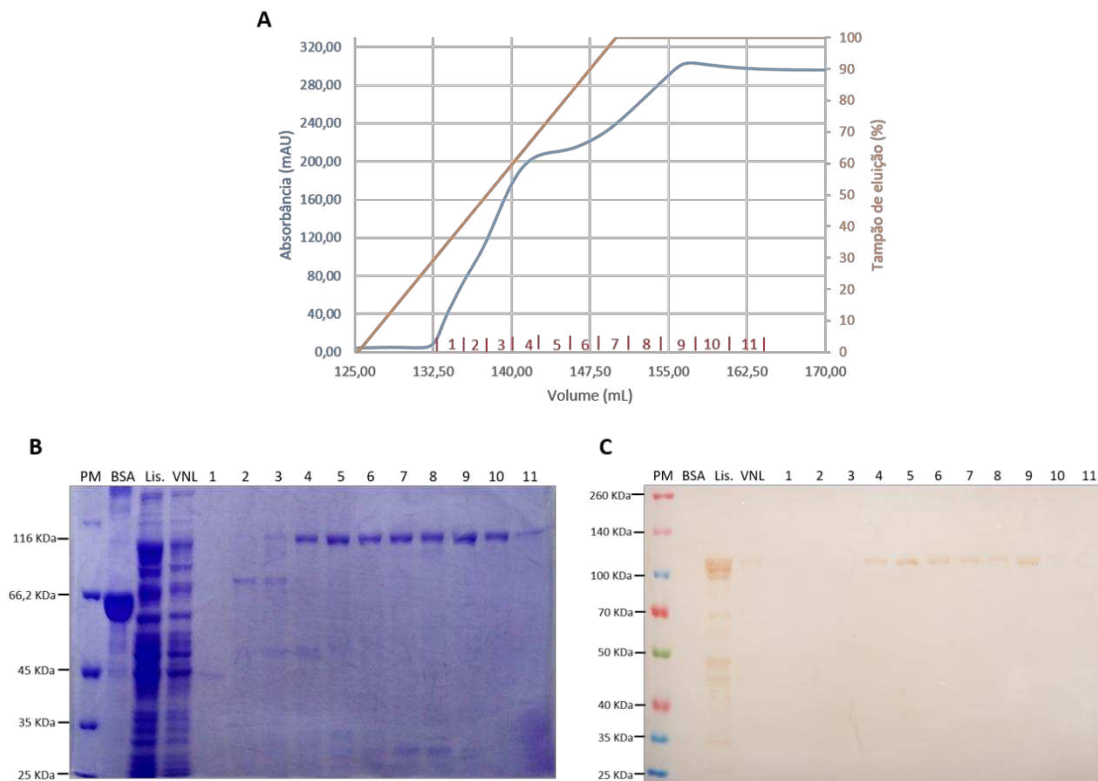


Figura 13. Purificação da LbSRPK por cromatografia de afinidade com eluição por gradiente. A) Representação gráfica do perfil de eluição da proteína, na qual os números em vermelho indicam as frações coletadas; B) SDS-PAGE 10% e C) Western blotting das frações obtidas. PM = padrão de peso molecular; BSA = albumina sérica bovina – utilizada como controle negativo para o Western blotting; Lis. = lisado, fração solúvel; VNL = volume não ligado à coluna. Foram utilizados os anticorpos anti-his monoclonal produzido em camundongo (Cusabio), diluição 1:3.000 e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), diluição 1:10.000.

Como mostrado na **Figura 14**, uma porção da LbSR não se ligou à coluna, sendo observada no volume não ligado. Isto ocorreu, provavelmente, devido à presença de uma maior quantidade da proteína, o que levou à saturação da coluna. Podemos ver que as primeiras frações eluídas ou não possuem a proteína de interesse ou possuem em pequena quantidade, apresentando mais proteínas de tamanhos diferentes. Através do Western blotting confirmamos a presença da LbSR a partir da fração 3, sendo encontrada em maior quantidade nas frações 6, 7 e 8. Embora a LbSR esteja em maior concentração, também podemos observar a presença de outras proteínas junto com a de interesse.

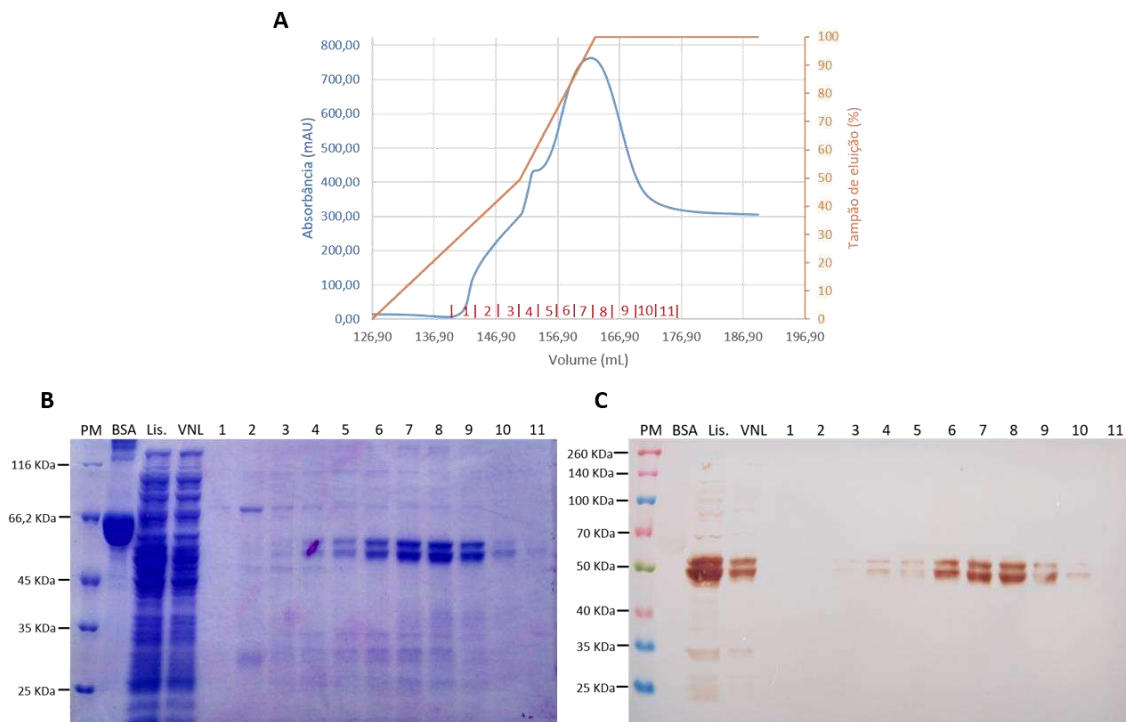


Figura 14. Purificação da LbSR por cromatografia de afinidade com eluição por gradiente. A) Representação gráfica do perfil de eluição da proteína, na qual os números em vermelho indicam as frações coletadas; B) SDS-PAGE 12% e C) Western blotting das frações obtidas. PM = padrão de peso molecular; BSA = albumina sérica bovina – utilizada como controle negativo para o Western blotting; Lis. = lisado, fração solúvel; VNL = volume não ligado à coluna. Foram utilizados os anticorpos anti-his monoclonal produzido em camundongo (Cusabio), diluição 1:3.000 e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), diluição 1:10.000.

Como dispúnhamos de um anticorpo primário anti-proteínas SR (1H4) (Thermo Scientific), para confirmar a presença da LbSR foi feito um Western blotting utilizando tal anticorpo. Foram analisadas amostras de lisado de *L. braziliensis*, para mostrar a presença das proteínas SR nos parasitos, bem como da LbSR purificada (**Figura 15**). Verificamos que houve a marcação tanto da proteína purificada quanto de proteínas presentes no lisado de *L. braziliensis*, sendo uma delas de tamanho próximo ao da proteína recombinante. Como este anticorpo é específico para epítomos fosforilados das proteínas SR, é possível que as duas bandas apresentadas pela proteína purificada representem diferentes estados de fosforilação da LbSR. Este padrão de bandas em doublet já foi observado para proteínas SR, representando estados hipo e hiperfosforilados destas proteínas. Foi mostrado, ainda, que a presença das fosforilações altera o peso molecular aparente, sendo observado um aumento

no peso molecular de 35 para até 70 KDa (Screaton et al., 1995; Ma et al., 2009; Keshwani et al., 2015). Além disto, a fosforilação tem emergido como uma das principais modificações pós-traducionais em bactérias, estando envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos. eSTKs (cinases bacterianas semelhantes às cinases Ser/Thr eucarióticas) já foram identificadas, estando relacionadas com a fosforilação de diferentes substratos em resíduos de serina ou treonina (Kobir et al., 2011; Cousin et al., 2013; Dworkin, 2015; Mijakovic et al., 2016). É possível que algumas destas cinases, presentes na bactéria, tenham reconhecido sítios de fosforilação na proteína recombinante, levando à observação da proteína em diferentes estados de fosforilação.

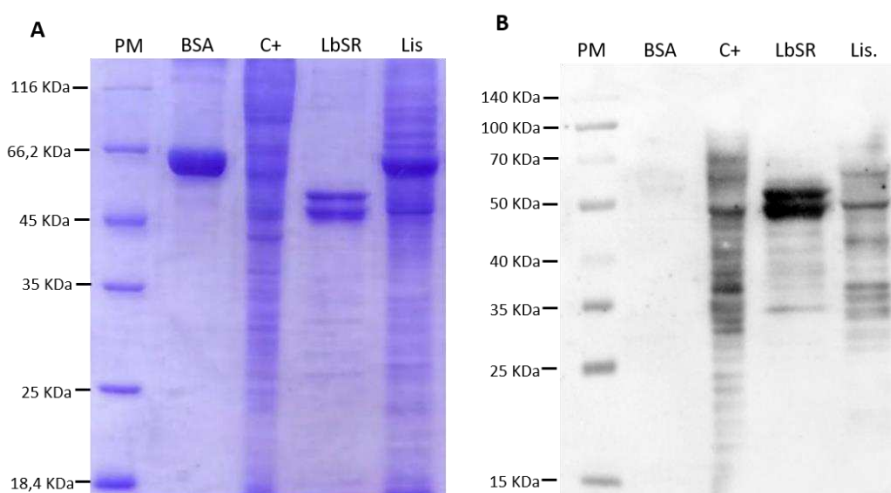


Figura 15. Análise da LbSR e de lisado de *Leishmania* utilizando anticorpo anti-proteínas SR (1H4). A) SDS-PAGE 12% e B) Western blotting das amostras. PM = padrão de peso molecular; BSA = albumina sérica bovina – utilizada como controle negativo para o Western blotting; C+ = controle positivo, lisado de células humanas (linhagem HEK293T); Lis. = lisado de *L. braziliensis*. Foram utilizados os anticorpos anti-proteínas SR (1H4) (Thermo Scientific), diluição 1:5.000 e anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), diluição 1:10.000.

Com a eluição em gradiente foi possível determinar com quais concentrações de imidazol as proteínas permanecem retidas na coluna e a partir de quais são eluídas, permitindo assim, que nas purificações posteriores a eluição das proteínas fosse feita em steps. Para eluição da LbSRPK foi utilizado um step de 30% do tampão B e depois 100% do tampão B (**Figura 16**). E para a LbSR um step de 50% e posteriormente 100% do tampão B para eluição (**Figura 17**). As principais frações obtidas, contendo as proteínas de interesse,

foram dialisadas utilizando membrana de celulose que retém proteínas de peso molecular maior que 12 KDa.

Podemos observar (**Figura 16**) que após a utilização de 30% do tampão de eluição uma pequena quantidade da LbSRPK foi eluída junto com proteínas de tamanhos diferentes, frações estas que representam o primeiro pico no perfil de eluição. Com 100% do tampão foram observados mais dois picos no perfil de eluição, sendo que as frações coletadas destes picos contêm a quase totalidade da LbSRPK. Assim como na eluição por gradiente, embora a LbSRPK se encontre em maior concentração podemos encontrar outras proteínas, de tamanhos diferentes, junto com a proteína de interesse. Para aumentar a pureza da proteína outras técnicas podem vir a ser utilizadas, como por exemplo, uma cromatografia por exclusão molecular.

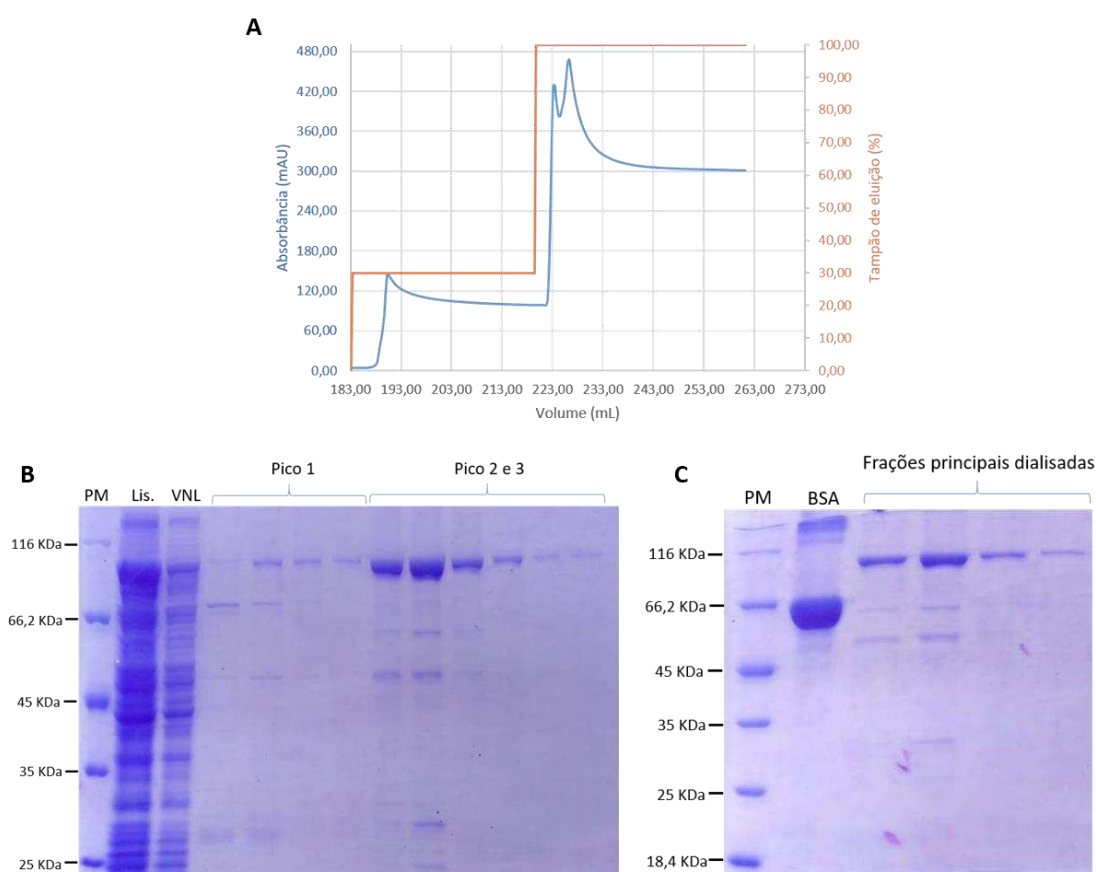


Figura 16. Purificação por cromatografia de afinidade da LbSRPK com eluição por steps. A) Representação gráfica do perfil de eluição da proteína; B) SDS-PAGE 10% das frações obtidas e C) SDS-PAGE 10% das principais frações (as quatro primeiras frações do pico 2 e 3) após diálise. PM = padrão de peso molecular; BSA = albumina sérica bovina; Lis. = lisado, fração solúvel; VNL = volume não ligado à coluna.

Para a purificação por steps da LbSR (**Figura 17**), vemos que após a utilização de 50% do tampão de eluição uma pequena fração da proteína de interesse foi eluída junto com proteínas de tamanhos diferentes - frações do primeiro pico no perfil de eluição. Com 100% do tampão foi observado apenas mais um pico no perfil de eluição, com as frações coletadas contendo a maior parte da proteína de interesse. Embora a LbSR esteja em maior concentração podemos observar a presença de outras proteínas junto com a de interesse, podendo vir a ser utilizadas outras técnicas a fim de se aumentar o grau de pureza.

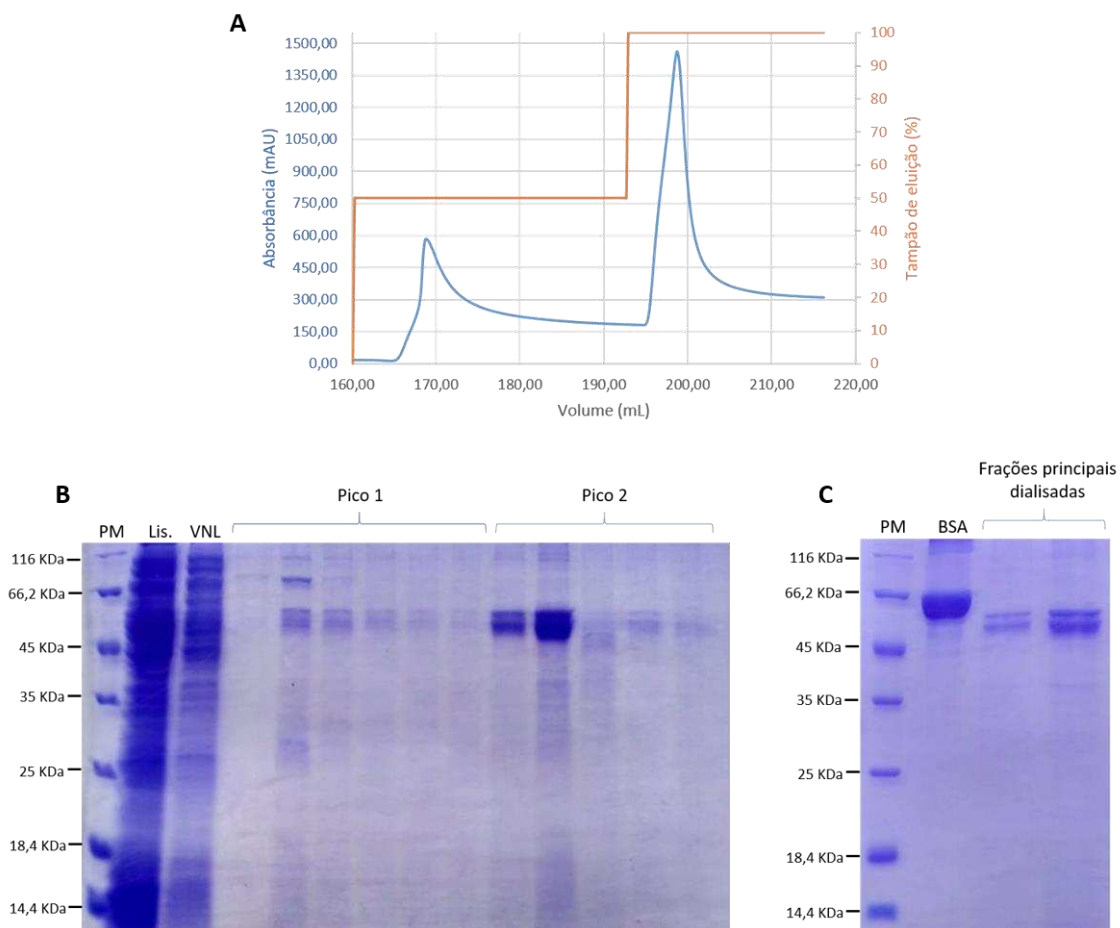


Figura 17. Purificação por cromatografia de afinidade da LbSR com eluição por steps. A) Representação gráfica do perfil de eluição da proteína; B) SDS-PAGE 12% das frações obtidas e C) SDS-PAGE 12% das principais frações (as duas primeiras frações do pico 2) após diálise. PM = padrão de peso molecular; BSA = albumina sérica bovina; Lis. = lisado, fração solúvel; VNL = volume não ligado à coluna.

A obtenção das proteínas purificadas permitirá a realização de ensaios de caracterização bioquímica das mesmas, bem como a realização de testes com inibidores, selecionando compostos de forma mais específica para a LbSRPK.

5.6. Construção dos modelos tridimensionais das proteínas

Foram construídos três modelos (**Figura 18**), um para a LbSR, abrangendo a sequência completa da proteína, e dois para a LbSRPK, sendo que um também abrange toda a sequência da proteína e o outro contém apenas as regiões de domínio cinase. As regiões mais desordenadas e flexíveis da proteína foram removidas - resíduos de aminoácidos de 1-123, 311-388 e 558-742, que correspondem às regiões N-terminal, espaçadora e C-terminal, respectivamente - construindo um modelo da proteína truncada (LbSRPKt), contendo apenas as duas regiões de domínio cinase (**Anexo 4**).

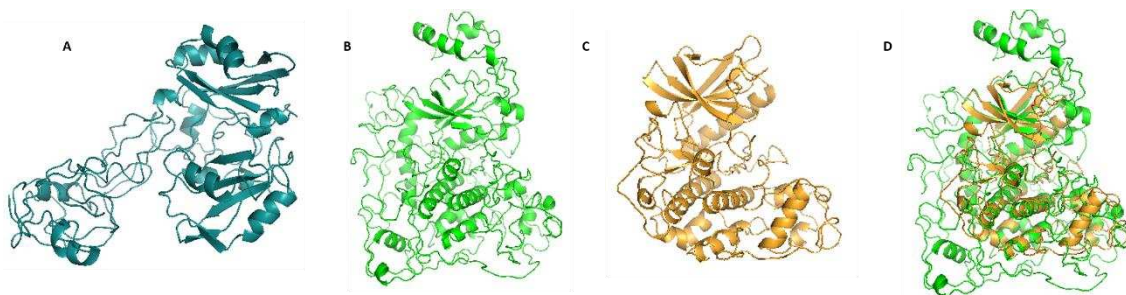


Figura 18. Modelos tridimensionais das proteínas. Modelos construídos para as sequências completas A) da LbSR e B) da LbSRPK; C) Modelo da LbSRPK truncada, contendo apenas os resíduos pertencentes ao domínio cinase. D) Sobreposição dos dois modelos gerados para a LbSRPK, mostrando que o núcleo catalítico foi mantido na proteína truncada.

Todos os modelos construídos foram validados utilizando os programas RAMPAGE (Ramachandran Plot Assessment), Procheck, Errat, Verify3D e ProSA-web (Protein Structure Analysis) (**Anexo 5**). Apenas o modelo da proteína LbSRPK truncada foi aprovado em todos os parâmetros avaliados pelos programas. Os outros modelos, por conterem a sequência completa das proteínas, apresentam regiões mais flexíveis e desordenadas, o que dificulta a

modelagem. Por causa disto, não foram aprovados em todos os parâmetros analisados. Ambos os modelos, da LbSRPK e da LbSR, não foram aprovados na análise do Verify3D, apresentando menos de 80% dos resíduos de aminoácidos com score maior ou igual a 0,2 (ponto de corte do programa). O modelo da LbSR apresentou, ainda, mais de 5% do seu número de resíduos em áreas não permitidas, de acordo com a análise no RAMPAGE e, apresentou algumas regiões problemáticas no N- e C-terminal, segundo a análise no ProSA.

Uma vez que as estruturas cristalográficas das proteínas humanas SRPK1 (PDB ID: 1WAK) e SRPK2 (PDB ID: 2X7G) truncadas podem ser encontradas no PDB foi avaliado se o modelo da LbSRPKt se aproxima das estruturas apresentadas pelas proteínas humanas, através do alinhamento das estruturas (**Figura 19**). O alinhamento do modelo da LbSRPK truncada com o cristal da SRPK1 humana gerou um valor de desvio médio quadrático (RMSD) de 1,26 Å e com o cristal da SRPK2 humana de 1,327 Å. O alinhamento das proteínas humanas entre si gerou um RMSD de 0,449 Å. Este pequeno desvio apresentado entre as estruturas confirma a proximidade existente entre elas. Através da comparação entre as estruturas truncadas, observamos na LbSRPKt, assim como nas SRPKs humanas, a presença de um enovelamento bilobular, no qual o lóbulo menor é composto, principalmente, de folhas- β e possui o sítio de ligação de ATP, e o lóbulo maior é composto, predominantemente, de α -hélices e apresenta resíduos importantes para a ligação do substrato.

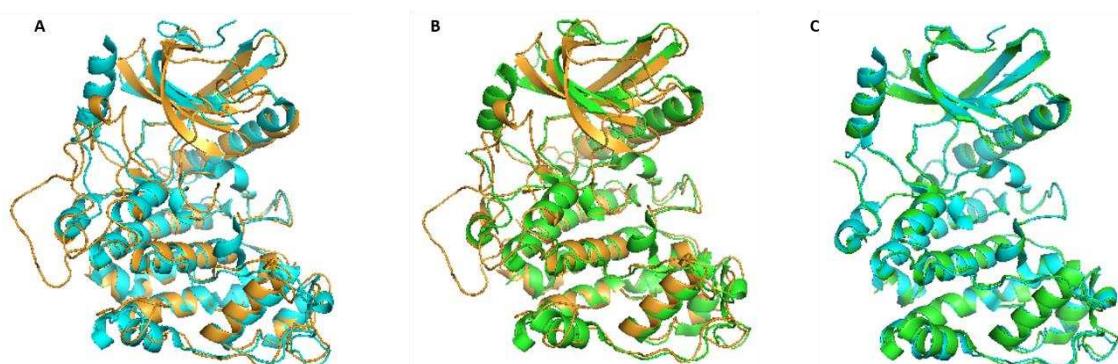


Figura 19. Alinhamento estrutural das SRPKs. A) Alinhamento da LbSRPKt com o cristal da SRPK1; B) Alinhamento da LbSRPKt com o cristal da SRPK2 e C) Alinhamento entre as estruturas cristalográficas da SRPK1 e SRPK2 humanas. LbSRPKt: representada na cor laranja; SRPK1: cor azul e SRPK2: cor verde.

5.7. Ensaios de docking molecular com a LbSRPKt e análises físico-químicas dos compostos

O modelo da LbSRPKt foi utilizado para realização dos dockings com o SRPIN340 e uma série de análogos (SRVIC15 a SRVIC36) deste composto (**Figura 20**). Também foi feito o docking com a molécula de ATP, uma vez que o SRPIN340 é um inibidor ATP-competitivo, bloqueando a atividade de cinase das SRPKs por impedir a ligação do ATP no sítio ativo das enzimas (Fukuhara et al., 2006).

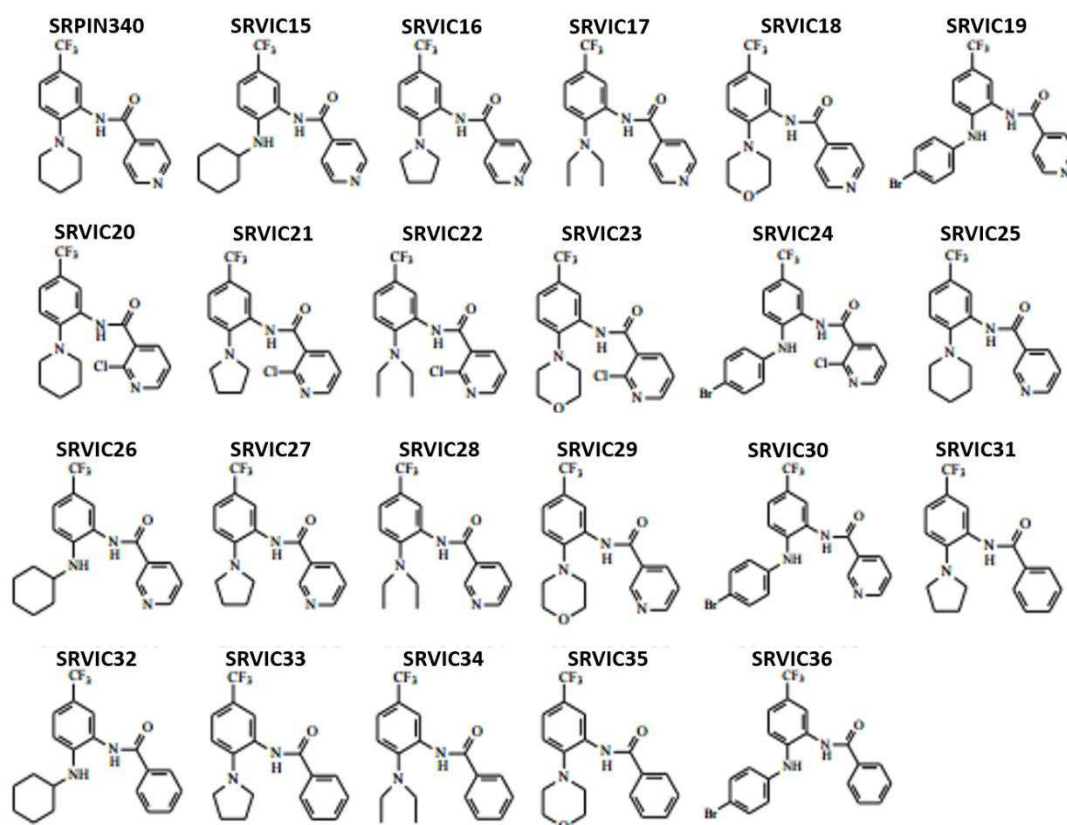


Figura 20. Estrutura química dos compostos. A primeira estrutura corresponde ao SRPIN340 e as demais estruturas representam análogos deste.

Dos 22 análogos apenas um interage com uma região diferente da proteína, sendo ele o SRVIC17. Todos os demais compostos interagem com a mesma região de ligação do ATP e do SRPIN340, incluindo os análogos SRVIC22 e SRVIC32, para os quais foi mostrado, anteriormente, possuir

atividade leishmanicida em experimentos in vitro (Onofre, 2017) (**Figura 21**). A **Tabela 3** representa os valores de docking score apresentados para cada molécula. Quanto mais negativo o valor maior a força de interação com a proteína. Podemos observar que o SRVIC22 e o SRVIC32, que apresentaram atividade leishmanicida, obtiveram docking score de -7,2 e -8,7, respectivamente. O SRVIC22 apresentou uma das piores pontuações enquanto o SRVIC32 apresentou uma das melhores, sendo, inclusive, maior que a apresentada pelo SRPIN340. Podemos observar também que outros análogos obtiveram melhores pontuações, quando comparados aos análogos SRVIC22 e SRVIC32. Entretanto, como mostrado por Onofre (2017) estes análogos não apresentaram atividade leishmanicida e, ainda, o SRVIC30, que apresentou o maior valor de docking score foi tóxico para macrófagos, sendo descartado. Desta forma, foi observado que os valores de docking score não se correlacionaram com o dado biológico obtido anteriormente, por meio de ensaio de infecção utilizando o parasito. Como o ensaio não foi realizado utilizando a proteína purificada, a atividade leishmanicida apresentada pelos compostos pode ser resultante da atuação destes sobre outros alvos no parasito ou na célula hospedeira (macrófagos).

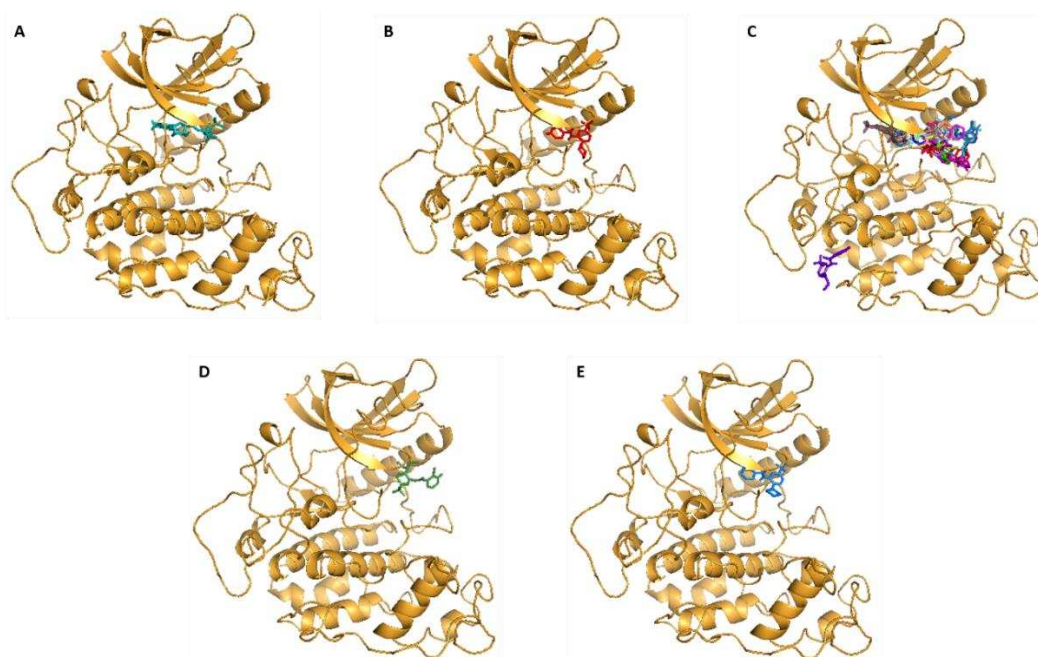


Figura 21. Docking dos compostos com a LbSRPK truncada. Dockings com A) ATP; B) SRPIN340; C) os 22 análogos do SRPIN340; D) SRVIC22 e E) SRVIC32.

Tabela 3. Valores de docking score para cada molécula avaliada.

Ligante	Docking score	Ligante	Docking score	Ligante	Docking score (Kcal)
ATP	- 9,0	SRVIC21	- 8,5	SRVIC29	- 7,5
SRPIN340	- 8,2	SRVIC22	- 7,2	SRVIC30	- 9,3
SRVIC15	- 8,2	SRVIC23	- 7,8	SRVIC31	- 7,5
SRVIC16	- 8,8	SRVIC24	- 8,8	SRVIC32	- 8,7
SRVIC17	- 6,7	SRVIC25	- 7,6	SRVIC33	- 9,1
SRVIC18	- 8,5	SRVIC26	- 8,1	SRVIC34	- 8,3
SRVIC19	- 8,8	SRVIC27	- 7,7	SRVIC35	- 8,8
SRVIC20	- 8,0	SRVIC28	- 6,7	SRVIC36	- 8,1

Já se sabe que o SRPIN340 interage com o sítio de ligação de ATP da SRPK1 humana e forma extensas interações hidrofóbicas com os resíduos L86, V94, F165, L168, L220, Y227 e L231. O átomo de oxigênio do grupo carbonila do SRPIN340 fixa a posição do ligante pela formação de uma ligação de hidrogênio com a amida da cadeia principal da L168. Essa ligação aproxima o grupo trifluorometil do peptídeo L168-G169, provocando a inversão deste peptídeo. Após a inversão, o oxigênio da cadeia principal da L168 forma uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal da V223, potencialmente estabilizando a estrutura. Esta inversão é provavelmente o fator necessário para a inibição potente da SRPK1 (Morooka et al., 2015). Embora o SRPIN340 apresente um maior valor de docking score quando comparado ao SRVIC22, indicando uma melhor interação com a LbSRPK, ele não apresentou atividade leishmanicida. Como mostrado anteriormente, existem diferenças entre as sequências das SRPKs. Quando comparadas as regiões de interação com o SRPIN340 das duas proteínas, a LbSRPK não possui este peptídeo importante (L168-G169) em posições similares, não possibilitando a ocorrência da inversão e, conseqüentemente, levando a não inibição. Por outro lado, as alterações feitas nos análogos SRVIC22 e SRVIC32 alteram a hidrofobicidade das moléculas, possibilitando a ocorrência de novas interações, o que levaria à inibição da LbSRPK.

Como os análogos SRVIC22 e SRVIC32 não foram aqueles que apresentaram os maiores valores de docking score, o que explicaria a atividade leishmanicida apresentada por estes compostos e não pelos demais, foram

analisadas algumas propriedades físico-químicas dos compostos, a fim de compreender a melhor atividade apresentada por eles. Foram analisadas a polarizabilidade e a área de superfície de Van de Waals dos análogos SRVIC22 e SRVIC32, do SRPIN340 e dos demais análogos que apresentaram um maior valor de docking score (**Tabela 4**).

Tabela 4. Análise de propriedades físico-químicas dos compostos com maior docking score e dos compostos que possuem atividade leishmanicida in vitro.

	Polarizabilidade	Área de superfície de Van der Waals
SRVIC22	33,62	491,60
SRVIC32	35,38	510,32
SRPIN340	32,71	477,76
SRVIC16	30,89	450,63
SRVIC19	36,72	474,38
SRVIC24	38,77	472,07
SRVIC30	36,72	476,02
SRVIC33	31,73	457,09
SRVIC35	32,47	470,22

A polarizabilidade representa a capacidade que um átomo ou molécula possui de ter sua distribuição eletrônica distorcida por um campo elétrico externo. Desta forma, quanto maior a polarizabilidade maior a tendência em alterar a densidade eletrônica, gerando dipolos momentâneos, facilitando, assim, a ocorrência de interações intermoleculares (Miller et al., 1979; Jensen, L., 2002). Podemos ver (**Tabela 4**) que embora essa propriedade seja importante para uma melhor interação do composto com a proteína não foi um fator determinante para que o composto apresentasse atividade leishmanicida, uma vez que compostos que não apresentaram atividade apresentaram valores de polarizabilidade maiores que os análogos SRVIC22 e SRVIC32. A análise da área de superfície de Van der Waals, também apresentada na **Tabela 4**, representa a área de superfície acessível dos compostos, desta forma, quanto maior o valor apresentado maior a possibilidade de interação com outras moléculas. Foi observado que os análogos SRVIC22 e SRVIC32, para esta propriedade, foram os que apresentaram os maiores valores, indicando que este fator pode ter sido determinante para que apresentassem atividade leishmanicida nos experimentos de infecção.

De acordo com Onofre (2017), ambos os análogos, SRVIC22 e SRVIC32, apresentaram atividade, entretanto, o SRVIC32 apresentou melhores resultados. Isto pode ser devido ao fato de que, quando comparados entre si, além de apresentar uma maior área de superfície de Van der Waals, o SRVIC32 ainda apresenta uma maior polarizabilidade e um maior docking score (**Tabela 3**).

Diante de tudo que foi exposto, há indícios de que os análogos possam estar atuando sobre a LbSRPK, levando à sua inibição. Entretanto, essa hipótese ainda não foi confirmada experimentalmente, por isso não podemos descartar a possibilidade de que estes análogos atuem de outras formas sobre o parasito.

5.8. IC₅₀ dos análogos SRVIC22 e SRVIC32 em macrófagos RAW 264.7 e promastigotas

Foi determinada a concentração de cada composto capaz de inibir 50% do crescimento (IC₅₀) de macrófagos e promastigotas (**Figura 22**).

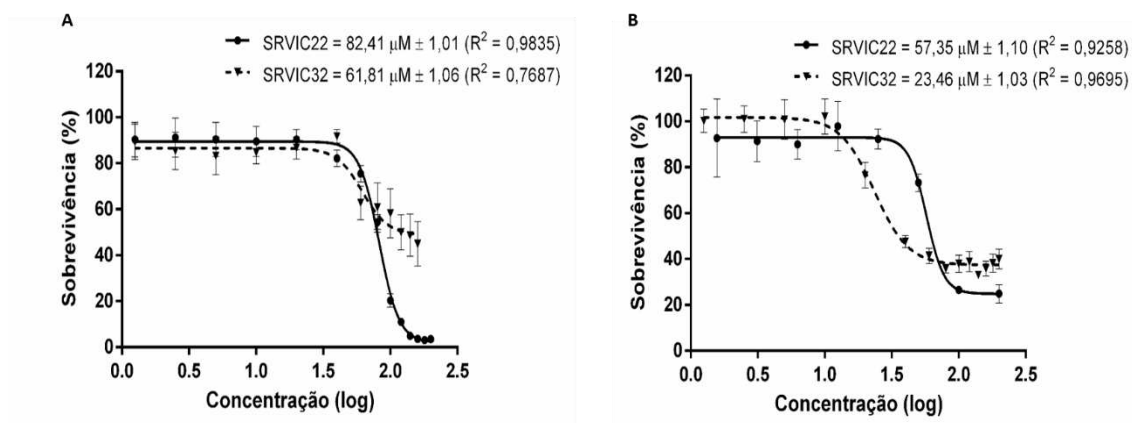


Figura 22. IC₅₀ dos análogos SRVIC22 e SRVIC32 em A) Macrófagos RAW 264.7 e B) Promastigotas.

Os valores de IC₅₀ para o SRVIC32, tanto em macrófagos quanto em promastigotas, foram menores que os observados para o SRVIC22. O análogo SRVIC32 apresenta uma pior solubilidade no meio de cultura utilizado nos

macrófagos, precipitando quando utilizado em maiores concentrações. Isto levou a uma redução no valor de R^2 .

5.9. Avaliação, in vitro, do efeito dos compostos combinados

Inicialmente, para a determinação do efeito dos compostos SRVIC22 e SRVIC32 combinados, as proporções de cada composto a serem utilizadas foram definidas com base nos valores de IC_{50} apresentados em macrófagos e em promastigotas (**Figura 22**), sendo utilizadas diferentes porcentagens do valor do IC_{50} . Entretanto, todas as combinações testadas se mostraram tóxicas para os macrófagos (dados não mostrados), e, desta forma, não puderam ser utilizadas para o prosseguimento dos experimentos.

Como mostrado por Onofre (2017), os compostos quando utilizados na concentração de 10 μ M não foram tóxicos para os macrófagos e apresentaram atividade leishmanicida. Assim, para a determinação do efeito dos compostos combinados foram utilizadas diferentes proporções dos mesmos, com uma concentração máxima total de 10 μ M. As diferentes combinações foram testadas em macrófagos e em promastigotas (**Figura 23**). Nenhuma das combinações foram tóxicas para os macrófagos, que apresentaram para todas uma taxa de sobrevivência maior que 80%. Este ponto de corte foi definido pois representa o mínimo de sobrevivência já observado para os macrófagos quando tratados com a anfotericina B em todos os experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Além disto, as combinações testadas não apresentaram atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas, que apresentaram taxa de sobrevivência de aproximadamente 100%. O ponto de referência de 20% foi definido pois representa o máximo de sobrevivência já observado para as promastigotas quando tratadas com a anfotericina B em todos os experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

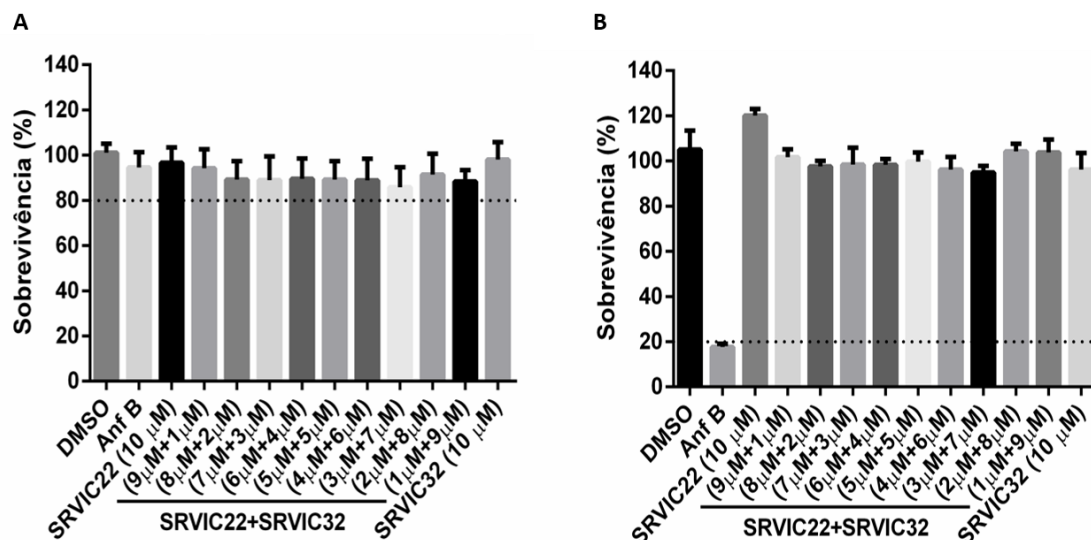


Figura 23. Análise do efeito dos compostos na concentração de 10 μM e quando combinados em diferentes proporções. A) Efeito em macrófagos RAW 264.7 e B) Efeito em promastigotas. DMSO (1%) e Anf B (3,125 $\mu\text{g/mL}$) foram utilizados como controle.

Entretanto, nos experimentos de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*, in vitro, foi observada atividade leishmanicida dos compostos (**Figura 24**). O tratamento com os análogos levou a uma redução tanto na porcentagem de células infectadas quanto no número de amastigotas intracelulares. O SRVIC22, na concentração de 10 μM , levou a uma redução de 40% na taxa de infecção e de 44% no número de amastigotas intracelulares. Já o SRVIC32, também na concentração de 10 μM , reduziu 55% da taxa de infecção e 60% do número de amastigotas intracelulares. A combinação dos compostos testada, utilizando 5 μM de cada composto obteve os mesmos percentuais de redução apresentados pelo SRVIC32 sozinho, quando este foi utilizado na concentração de 10 μM .

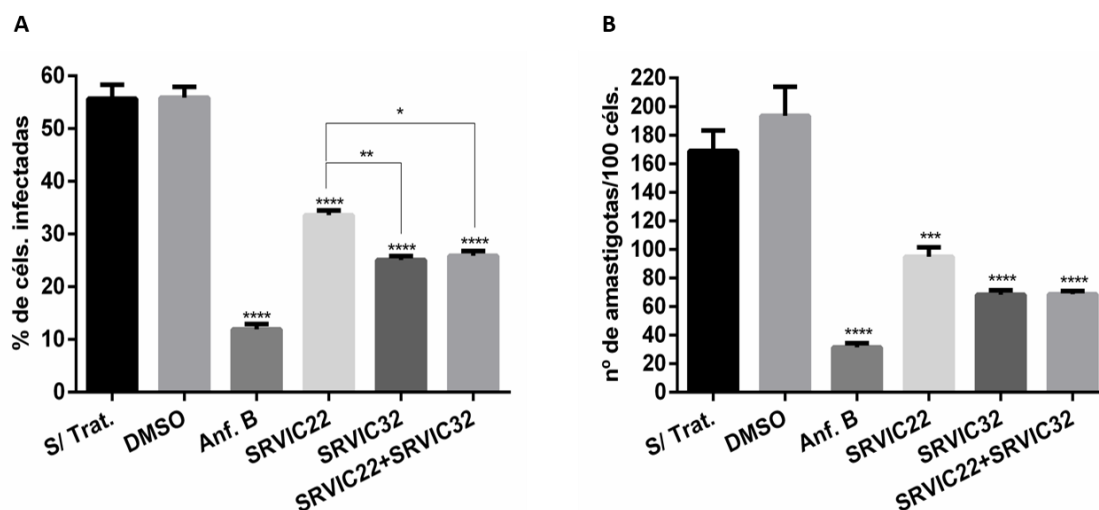


Figura 24. Análise do efeito dos compostos na concentração de 10 μM e quando combinados na proporção de 1:1 (concentração final de 5 μM de cada composto). A) Porcentagem de macrófagos infectados e B) Número de amastigotas para cada 100 células. Foram utilizados como controles células infectadas mantidas sem tratamento (S/Trat.), tratadas com DMSO (1%) e Anf B (3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os asteriscos logo acima das colunas representam as diferenças obtidas com relação ao controle de células infectadas sem tratamento e os acima das barras com relação aos compostos quando comparados entre si. * representa diferença significativa com $p < 0,05$; ** com $p < 0,01$; *** com $p < 0,001$ e **** com $p < 0,0001$.

5.10. Análise da expressão da LbSRPK por qPCR

Inicialmente, para a padronização das reações foram testadas três concentrações dos pares de primers e três quantidades de cDNA, sendo escolhidas as condições que forneceram a maior eficiência de reação (mais próxima de 1) (**Tabela 5**). As reações padronizadas apresentaram uma eficiência semelhante, o que possibilitou a utilização do método do $\Delta\Delta\text{CT}$ comparativo, para a quantificação relativa da expressão gênica (Livak et al., 2001). A expressão da LbSRPK foi, então, analisada em promastigotas em fases log e estacionária de crescimento, em amastigotas e, ainda, após o tratamento da infecção com DMSO (1%), Anf B (3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), SRVIC22 (10 μM), SRVIC32 (10 μM) e a combinação dos compostos na proporção de 1:1 (concentração final de 5 μM de cada composto) (**Figura 25**).

Tabela 5. Parâmetros escolhidos para as reações.

	Concentração dos pares de primers	Quantidade de cDNA	Eficiência
SRPK	200 nM	225 ng	0,992
GAPDH	200 nM	225 ng	0,972
G6PD	400 nM	225 ng	0,994

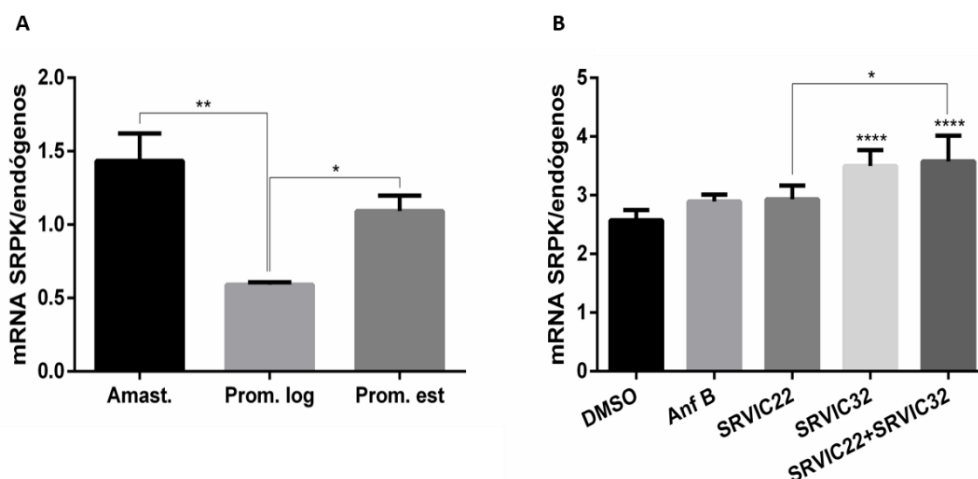


Figura 25. Análise da quantidade de mRNA da LbSRPK por qPCR. A) Análise da quantidade em promastigotas em fase log de crescimento (Prom. log) e em fase estacionária (Prom. est) e em amastigotas, provenientes da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* (Amast.). B) Análise da quantidade após o tratamento da infecção com DMSO (1%), Anf B (3,125 µg/mL), SRVIC22 (10 µM), SRVIC32 (10 µM) e a combinação dos análogos na proporção de 1:1 (concentração final de 5 µM de cada composto). Os asteriscos logo acima das colunas, em B, representam as diferenças obtidas com relação ao tratamento com DMSO 1% (controle) e os acima das barras com relação aos compostos quando comparados entre si. * representa diferença significativa com $p < 0,05$; ** com $p < 0,01$; e **** com $p < 0,0001$.

Foi observada (**Figura 25**) uma menor quantidade de mRNA da LbSRPK em promastigotas em fase log de crescimento, apresentando um aumento de aproximadamente 50% quando se encontram em fase estacionária. Não há diferença entre as quantidades de mRNA em promastigotas em fase estacionária e amastigotas. Visto que a quantidade de mRNA é maior em uma fase de crescimento em que há predominância de formas promastigotas metacíclicas (infectiosas) e em formas amastigotas (formas intracelulares, também infectiosas) é possível que a LbSRPK desempenhe funções relacionadas à infecção e/ou manutenção da mesma.

Como observado na **Figura 23** o tratamento das formas promastigotas (fase log) com os análogos não apresentou atividade leishmanicida, por outro lado, foi detectada atividade sobre as amastigotas, na infecção (**Figura 24**). Em relação ao mRNA da LbSRPK (**Figura 25**) observou-se maior quantidade nas formas amastigotas do que nas promastigotas. Portanto, os análogos teriam maior atividade inibitória sobre as formas amastigotas.

Ademais, durante o tratamento da infecção, não houve alteração na quantidade de mRNA quando foi utilizado o SRVIC22 sozinho. Apenas verificamos alteração quando o SRVIC32 está presente no tratamento, seja em maior concentração (10 μ M) ou menor (5 μ M). Diante disto, pode-se pensar que o SRVIC32 realmente atue inibindo a LbSRPK e o parasito, para compensar a ausência da atividade da cinase, aumenta a estabilidade do mRNA responsável por codificar a LbSRPK, garantindo uma maior produção da proteína.

5.11. Avaliação da toxicidade dos análogos SRVIC22 e SRVIC32 in vivo

Para avaliação da toxicidade dos análogos in vivo foram testadas três diferentes concentrações de cada composto – 0,5; 1,0 e 2,0 mg/Kg/dia do SRVIC32 e 1,0; 2,5 e 5,0 mg/Kg/dia do SRVIC22. Foram utilizados como controle PBS, DMSO 1% e Anf B (1,0 mg/Kg/dia). Após receberem as dosagens, durante 15 dias alternados, os camundongos foram eutanasiados e foram coletados fígado e rins dos animais. Fragmentos destes órgãos foram processados histologicamente para análise do efeito dos compostos em sua arquitetura (**Figuras 26 e 27**). A análise das lâminas histológicas foi feita sob a orientação da professora Mariana Machado Neves, do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Nenhuma alteração foi observada na arquitetura dos órgãos. Podemos ver, nos rins (**Figura 26**), a presença das duas regiões, cortical e medular, apresentando sua organização normal. Na zona cortical observou-se a presença dos corpúsculos renais, formados pelos glomérulos e pelas cápsulas de Bowman, túbulos contorcidos proximais, com parede composta por epitélio

cúbico simples e células apresentando grande quantidade de microvilosidades e túbulos contorcidos distais, também revestidos por epitélio cúbico simples e com microvilos mais curtos e esparsos. Uma região mais rica em túbulos contorcidos distais delimita a área de transição entre a zona cortical e a medular. Nesta zona observamos uma maior presença de ductos coletores e dos segmentos delgado e espesso da alça de Henle.

No fígado (**Figura 27**) também observamos uma organização normal das células. Podemos notar lóbulos hepáticos compostos por cordões de hepatócitos dispostos de forma radial em relação à veia central e a presença de capilares sinusóides entre os cordões, também dispostos radialmente, convergindo para a veia central. Os hepatócitos apresentavam um ou dois núcleos arredondados e presença de vesículas lipídicas no citoplasma. Além disto, também observamos a presença de ductos biliares, com epitélio cúbico simples e células de Kupffer nos sinusóides. Embora a arquitetura do órgão não apresentou nenhuma alteração foram observadas regiões focais contendo pequenos aglomerados de células e em alguns pontos infiltrados leucocitários nos fígados dos animais que receberam a maior dose dos compostos – 2 mg/Kg/dia do SRVIC32 e 5 mg/Kg/dia do SRVIC22 – indicando presença de pequenas regiões inflamatórias. Como os compostos apresentam problemas em sua completa solubilização, nas maiores doses, de ambos os compostos, foi observada a presença de precipitado, o que pode ter contribuído para o surgimento dos pequenos focos de inflamação.

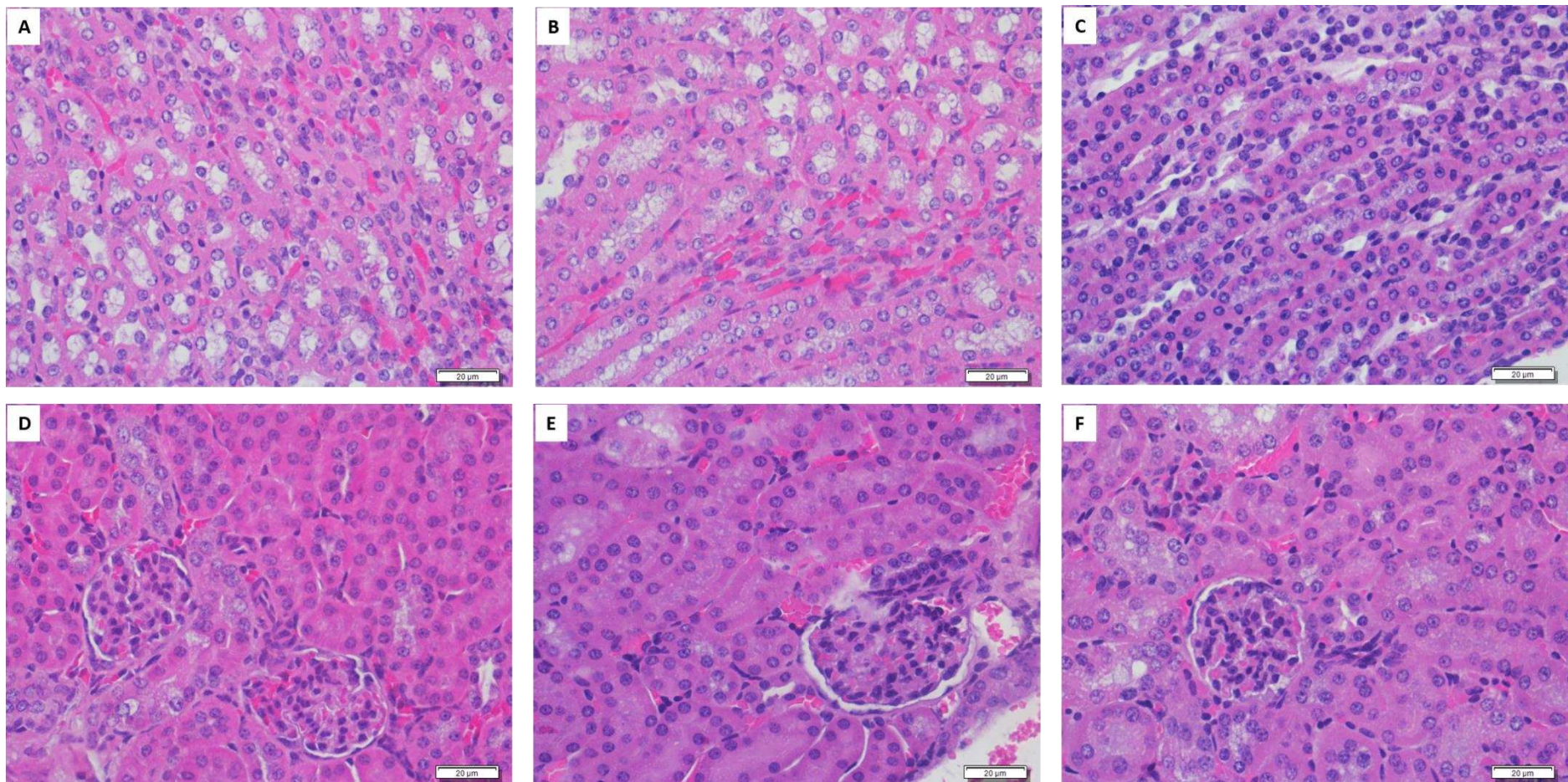


Figura 26. Análise histológica do rim. A região medular é representada em A, B e C e a região cortical em D, E e F. Como não foram encontradas alterações na arquitetura do órgão, A e D representam todos os controles testados, assim como B e E representam as menores doses dos análogos testadas e C e F representam as maiores doses. Hematoxilina-Eosina; Aumento de 40x.

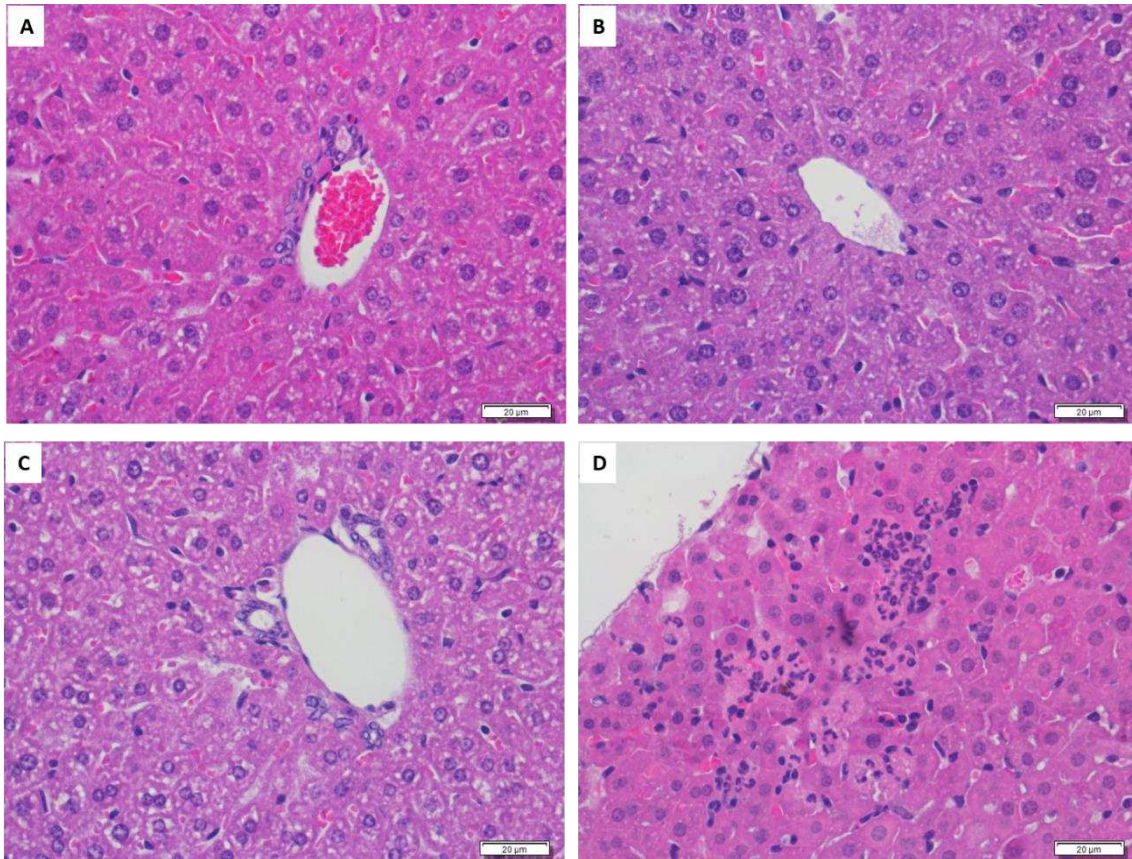


Figura 27. Análise histológica do fígado. Como não foram encontradas alterações na arquitetura do órgão, A representa todos os controles testados, assim como B representa as menores doses dos análogos testadas e C representa as maiores doses. D representa as pequenas regiões inflamatórias encontradas para a maior dose de ambos os análogos. Hematoxilina-Eosina; Aumento de 40x.

Além das análises histológicas foram feitas as dosagens de creatinina e das enzimas alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT), onde não foram observadas alterações frente aos tratamentos com os compostos quando comparados com os controles (**Tabela 6**). A avaliação dos níveis de creatinina e das enzimas ALT, FA e GGT permite identificar possíveis danos no tecido hepático e tecido renal.

Em condições normais, a creatinina, originada do metabolismo da creatina, é produzida, filtrada nos rins e excretada em ritmo constante. Desta forma, índices elevados de creatinina no sangue indicam falência da função renal, visto que sua filtração estará comprometida. A alanina aminotransferase, enzima citoplasmática, é liberada no sangue em grandes quantidades quando há dano na membrana do hepatócito, aumentando sua permeabilidade e, indicando, assim, danos no tecido hepático. As dosagens de fosfatase alcalina e

gama glutamil transferase também permitem a avaliação de possíveis danos no tecido hepático. São encontradas, principalmente, no fígado e nas células que compõem a parede de ductos biliares, sendo o aumento no nível sanguíneo indicativo de obstrução dos ductos biliares.

Tabela 6. Análises bioquímicas do sangue.

Tratamento	CR (mg/dL)	FA (U/L)	GGT (U/L)	ALT (U/L)
PBS	0,5 ($\pm 0,19$)	119 ($\pm 36,81$)	36,25 ($\pm 10,30$)	58,75 ($\pm 9,46$)
DMSO	0,42 ($\pm 0,20$)	119,16 ($\pm 60,61$)	48,33 ($\pm 16,02$)	51,25 ($\pm 32,26$)
Anf B	0,44 ($\pm 0,17$)	130,83 ($\pm 49,84$)	33,00 ($\pm 18,90$)	68,33 ($\pm 33,29$)
SRVIC22 - 1 mg	0,4 ($\pm 0,16$)	137,00 ($\pm 49,57$)	45,83 ($\pm 11,14$)	46,00 ($\pm 15,57$)
SRVIC22 - 2,5 mg	0,35 ($\pm 0,11$)	129,00 ($\pm 40,06$)	43,33 ($\pm 14,02$)	50,00 ($\pm 24,08$)
SRVIC22 - 5 mg	0,30 ($\pm 0,11$)	166,00 ($\pm 38,47$)	42,50 ($\pm 13,69$)	36,66 ($\pm 25,81$)
SRVIC32 - 0,5 mg	0,40 ($\pm 0,07$)	151,66 ($\pm 58,79$)	53,33 ($\pm 14,02$)	38,33 ($\pm 12,90$)
SRVIC32 - 1 mg	0,38 ($\pm 0,07$)	163,33 ($\pm 58,79$)	47,50 ($\pm 6,89$)	57,00 ($\pm 21,67$)
SRVIC32 - 2 mg	0,30 ($\pm 0,12$)	135,00 ($\pm 55,56$)	55,00 ($\pm 9,35$)	60,00 ($\pm 42,19$)

CR = creatinina; FA = fosfatase alcalina; GGT = gama glutamil transferase; ALT = alanina aminotransferase.

Os valores obtidos para os níveis de creatinina e das enzimas ALT, FA e GGT para o tratamento com os compostos, bem como o tratamento com DMSO e Anf B, foram comparados com os valores obtidos para o controle negativo (PBS). Quando comparados os valores, vemos que o tratamento com os compostos não levou a alterações nos níveis de creatinina e das enzimas avaliadas, indicando que, a nível de dosagens sanguíneas, não foram observados danos nos tecidos hepático e renal. As amostras de sangue coletadas apresentaram hemólise, o que pode ter contribuído para os altos desvios observados nas dosagens.

6. Conclusões

SRVIC32, sozinho ou combinado, houve aumento de expressão da LbSRPK.

7. Perspectivas

O presente trabalho identificou uma possível SRPK bem como um de seus possíveis substratos, uma proteína SR. A partir da caracterização bioquímica destas proteínas será possível confirmar suas identidades e validar a SRPK como alvo terapêutico.

Como a combinação dos análogos SRVIC22 e SRVIC32 mostrou resultados promissores pode, agora, ser testada in vivo, quanto à toxicidade e ao potencial leishmanicida.

Uma vez que, dentre os análogos, o SRVIC32 apresentou melhores resultados, pode vir a ser utilizado como base para a construção de novos compostos, visando potencializar a atividade leishmanicida.

8. Referências Bibliográficas

Akbari, M., Oryan, A. and Hatam, G. (2017). "Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review." Acta Trop **172**: 86-90.

Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. and Team, W. H. O. L. C. (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renaud, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E. and El-Sayed, N. M. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." Science **309**(5733): 416-422.

Bowie, J. U., Luthy, R. and Eisenberg, D. (1991). "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure." Science **253**(5016): 164-170.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Buchan, D. W., Minnici, F., Nugent, T. C., Bryson, K. and Jones, D. T. (2013). "Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench." Nucleic Acids Res **41**(Web Server issue): W349-357.

Chan, C. B. and Ye, K. (2013). "Serine-arginine protein kinases: new players in neurodegenerative diseases?" Rev Neurosci **24**(4): 401-413.

Colovos, C. and Yeates, T. O. (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions." Protein Sci **2**(9): 1511-1519.

Cousin, C., Derouiche, A., Shi, L., Pagot, Y., Poncet, S. and Mijakovic, I. (2013). "Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation." FEMS Microbiol Lett **346**(1): 11-19.

Cruz, A. K., de Toledo, J. S., Falade, M., Terrao, M. C., Kamchonwongpaisan, S., Kyle, D. E. and Uthaipibull, C. (2009). "Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review." Curr Drug Targets **10**(3): 178-192.

Cysne-Finkelstein, L., Temporal, R. M., Alves, F. A. and Leon, L. L. (1998). "*Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes." Exp Parasitol **89**(1): 58-62.

de Azevedo, W. F., Jr. and Soares, M. B. (2009). "Selection of targets for drug development against protozoan parasites." Curr Drug Targets **10**(3): 193-201.

De Conti, L., Baralle, M. and Buratti, E. (2013). "Exon and intron definition in pre-mRNA splicing." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(1): 49-60.

Ding, J. H., Zhong, X. Y., Hagopian, J. C., Cruz, M. M., Ghosh, G., Feramisco, J., Adams, J. A. and Fu, X. D. (2006). "Regulated cellular partitioning of SR protein-specific kinases in mammalian cells." Mol Biol Cell **17**(2): 876-885.

Dixit, A., Singh, P. K., Sharma, G. P., Malhotra, P. and Sharma, P. (2010). "PfSRPK1, a novel splicing-related kinase from *Plasmodium falciparum*." J Biol Chem **285**(49): 38315-38323.

Dworkin, J. (2015). "Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria." Curr Opin Microbiol **24**: 47-52.

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R.,

Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D. and Andersson, B. (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.

Eshar, S., Allemand, E., Sebag, A., Glaser, F., Muchardt, C., Mandel-Gutfreund, Y., Karni, R. and Dzikowski, R. (2012). "A novel *Plasmodium falciparum* SR protein is an alternative splicing factor required for the parasites' proliferation in human erythrocytes." Nucleic Acids Res **40**(19): 9903-9916.

Felsenstein, J. (1985). "Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap." Evolution **39**(4): 783-791.

Ferrara, P., Apostolakis, J. and Caflisch, A. (2001). "Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations." Proteins **46**: 24-33.

Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J. and Bateman, A. (2016). "The Pfam protein families database: towards a more sustainable future." Nucleic Acids Res **44**(D1): D279-285.

Fukuhara, T., Hosoya, T., Shimizu, S., Sumi, K., Oshiro, T., Yoshinaka, Y., Suzuki, M., Yamamoto, N., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A. and Hagiwara, M. (2006). "Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11329-11333.

Furuyama, S. and Bruzik, J. P. (2002). "Multiple roles for SR proteins in trans splicing." Mol Cell Biol **22**(15): 5337-5346.

Ghosh, G. and Adams, J. A. (2011). "Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases." FEBS J **278**(4): 587-597.

Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Mylonis, I. and Georgatsou, E. (2011). "Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence." FEBS J **278**(4): 570-586.

Gui, J. F., Lane, W. S. and Fu, X. D. (1994a). "A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle." Nature **369**(6482): 678-682.

Gui, J. F., Tronchere, H., Chandler, S. D. and Fu, X. D. (1994b). "Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10824-10828.

Gunzl, A. (2010). "The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified?" Eukaryot Cell **9**(8): 1159-1170.

Gupta, S. K., Chikne, V., Eliaz, D., Tkacz, I. D., Naboishchikov, I., Carmi, S., Waldman Ben-Asher, H. and Michaeli, S. (2014). "Two splicing factors carrying serine-arginine motifs, TSR1 and TSR1IP, regulate splicing, mRNA stability, and rRNA processing in *Trypanosoma brucei*." RNA Biol **11**(6): 715-731.

Hasel, W., Hendrickson, T. and Still, W. (1988). "A Rapid Approximation to the Solvent Accessible Surface Areas of Atoms." Tetrahedron Computer Methodology **1**(2): 103-116.

Howard, J. M. and Sanford, J. R. (2015). "The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression." Wiley Interdiscip Rev RNA **6**(1): 93-110.

Huang, Y., Yario, T. A. and Steitz, J. A. (2004). "A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9666-9670.

Ismaili, N., Perez-Morga, D., Walsh, P., Mayeda, A., Pays, A., Tebabi, P., Krainer, A. R. and Pays, E. (1999). "Characterization of a SR protein from *Trypanosoma brucei* with homology to RNA-binding cis-splicing proteins." Mol Biochem Parasitol **102**(1): 103-115.

Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B. and Myler, P. J. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.

Jensen, L. (2002). "Polarizability of molecular clusters as calculated by a dipole interaction model." J Chem Phys **116**.

Jeong, S. (2017). "SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA." Mol Cells **40**(1): 1-9.

Kaushal, H., Bhattacharya, S. K., Verma, S. and Salotra, P. (2017). "Serological and Molecular Analysis of Leishmania Infection in Healthy Individuals from Two Districts of West Bengal, India, Endemic for Visceral Leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **96**(6): 1448-1455.

Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Andrews, P. C., Junk, P. C. and Kedzierska, K. (2009). "Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines." Curr Med Chem **16**(5): 599-614.

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Sternberg, M. J. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nat Protoc **10**(6): 845-858.

Keshwani, M. M., Aubol, B. E., Fattet, L., Ma, C. T., Qiu, J., Jennings, P. A., Fu, X. D. and Adams, J. A. (2015). "Conserved proline-directed phosphorylation regulates SR protein conformation and splicing function." Biochem J **466**(2): 311-322.

Kimutai, R., Musa, A. M., Njoroge, S., Omollo, R., Alves, F., Hailu, A., Khalil, E. A., Diro, E., Soipei, P., Musa, B., Salman, K., Ritmeijer, K., Chappuis, F., Rashid, J., Mohammed, R., Jameneh, A., Makonnen, E., Olobo, J., Okello, L., Sagaki, P., Strub, N., Ellis, S., Alvar, J., Balasegaram, M., Alirol, E. and Wasunna, M. (2017). "Safety and Effectiveness of Sodium Stibogluconate and Paromomycin Combination for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: Results from a Pharmacovigilance Programme." Clin Drug Investig **37**(3): 259-272.

Kobir, A., Shi, L., Boskovic, A., Grangeasse, C., Franjevic, D. and Mijakovic, I. (2011). "Protein phosphorylation in bacterial signal transduction." Biochim Biophys Acta **1810**(10): 989-994.

Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D. and Karplus, K. (2009). "Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8." Proteins **77 Suppl 9**: 114-122.

Kulshrestha, A., Bhandari, V., Mukhopadhyay, R., Ramesh, V., Sundar, S., Maes, L., Dujardin, J. C., Roy, S. and Salotra, P. (2013). "Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of Leishmania donovani." Parasitol Res **112**(2): 825-828.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." Mol Biol Evol **33**(7): 1870-1874.

Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T. and Hagiwara, M. (1998). "Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles." Biochem Biophys Res Commun **242**(2): 357-364.

la Cour, T., Kierner, L., Molgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." Protein Eng Des Sel **17**(6): 527-536.

Lara-Silva Fde, O., Michalsky, E. M., Fortes-Dias, C. L., Fiuza Vde, O., Pessanha, J. E., Regina-Silva, S., de Avelar, D. M., Silva, M. A., Lima, A. C., da Costa, A. J., Machado-Coelho, G. L. and Dias, E. S. (2015). "Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil." Acta Trop **148**: 128-136.

Lasda, E. L. and Blumenthal, T. (2011). "Trans-splicing." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(3): 417-434.

Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. and Thornton, J. M. (1996). "AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR." J Biomol NMR **8**(4): 477-486.

Leta, S., Dao, T. H., Mesele, F. and Alemayehu, G. (2014). "Visceral leishmaniasis in Ethiopia: an evolving disease." PLoS Negl Trop Dis **8**(9): e3131.

Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S. and Michaeli, S. (2003). "trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation." Eukaryot Cell **2**(5): 830-840.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2003). "Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation." Proteins **50**(3): 437-450.

Luthy, R., Bowie, J. U. and Eisenberg, D. (1992). "Assessment of protein models with three-dimensional profiles." Nature **356**(6364): 83-85.

Ma, C. T., Hagopian, J. C., Ghosh, G., Fu, X. D. and Adams, J. A. (2009). "Regiospecific phosphorylation control of the SR protein ASF/SF2 by SRPK1." J Mol Biol **390**(4): 618-634.

Markovic, S. N. and Murasko, D. M. (1990). "Anesthesia inhibits poly I:C induced stimulation of natural killer cell cytotoxicity in mice." Clin Immunol Immunopathol **56**(2): 202-209.

Maroli, M., Jalouk, L., Al Ahmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C. and Gradoni, L. (2009). "Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria." Med Vet Entomol **23**(2): 148-154.

Martins-Melo, F. R., Lima Mda, S., Ramos, A. N., Jr., Alencar, C. H. and Heukelbach, J. (2014). "Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns." PLoS One **9**(4): e93770.

Mayeda, A., Zahler, A. M., Krainer, A. R. and Roth, M. B. (1992). "Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1301-1304.

McGwire, B. S. and Satoskar, A. R. (2014). "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment." QJM **107**(1): 7-14.

Mijakovic, I., Grangeasse, C. and Turgay, K. (2016). "Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems." FEMS Microbiol Rev **40**(3): 398-417.

Mikus, J. and Steverding, D. (2000). "A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue." Parasitol Int **48**(3): 265-269.

Miller, K. J. and Savchik, J. (1979). "A new empirical method to calculate average molecular polarizabilities." Journal of the American Chemical Society **101**(24): 7206-7213.

Mohammadzadeh, M., Behnaz, F. and Golshan, Z. (2013). "Efficacy of glucantime for treatment of cutaneous leishmaniasis in Central Iran." J Infect Public Health **6**(2): 120-124.

Monge-Maillo, B. and Lopez-Velez, R. (2013). "Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Drugs **73**(17): 1889-1920.

Morooka, S., Hoshina, M., Kii, I., Okabe, T., Kojima, H., Inoue, N., Okuno, Y., Denawa, M., Yoshida, S., Fukuhara, J., Ninomiya, K., Ikura, T., Furuya, T., Nagano, T., Noda, K., Ishida, S., Hosoya, T., Ito, N., Yoshimura, N. and Hagiwara, M. (2015). "Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice." Mol Pharmacol **88**(2): 316-325.

Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A. A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroge, S., Manduku, V., Mutuma, G., Apadet, L., Lodenyo, H., Mutea, D., Kirigi, G., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tafes, H., Mekonnen, Y., Makonnen, E., Ndegwa, S., Sagaki, P., Kimutai, R., Kesusu, J., Owiti, R., Ellis, S. and Wasunna, M. (2012). "Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial." PLoS Negl Trop Dis **6**(6): e1674.

Nagle, A. S., Khare, S., Kumar, A. B., Supek, F., Buchynskyy, A., Mathison, C. J., Chennamaneni, N. K., Pendem, N., Buckner, F. S., Gelb, M. H. and Molteni, V. (2014). "Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis." Chem Rev **114**(22): 11305-11347.

Nakagawa, O., Arnold, M., Nakagawa, M., Hamada, H., Shelton, J. M., Kusano, H., Harris, T. M., Childs, G., Campbell, K. P., Richardson, J. A., Nishino, I. and Olson, E. N. (2005). "Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2." Genes Dev **19**(17): 2066-2077.

Naula, C., Parsons, M. and Mottram, J. C. (2005). "Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania." Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 151-159.

Negrao, F., Eberlin, M. N. and Giorgio, S. (2017). "Proteomic approaches for drug discovery against tegumentary leishmaniasis." Biomed Pharmacother **95**: 577-582.

Noazin, S., Shirzadi, M. R., Kermanizadeh, A., Yaghoobi-Ershadi, M. R. and Sharifi, I. (2013). "Effect of large-scale installation of deltamethrin-impregnated screens and curtains in Bam, a major focus of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Iran." Trans R Soc Trop Med Hyg **107**(7): 444-450.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." Eur J Biochem **267**(17): 5421-5426.

Onofre, T. S. (2017). Desafios na busca por novos meios para o controle de circovirose suína e leishmaniose. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa: 124.

Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69 Suppl 1**: S10-18.

Pan, K., Lee, J. T., Huang, Z. and Wong, C. M. (2015). "Coupling and coordination in gene expression processes with pre-mRNA splicing." Int J Mol Sci **16**(3): 5682-5696.

Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N. and Mottram, J. C. (2005). "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*." BMC Genomics **6**: 127.

Portal, D., Espinosa, J. M., Lobo, G. S., Kadener, S., Pereira, C. A., De La Mata, M., Tang, Z., Lin, R. J., Kornblihtt, A. R., Baralle, F. E., Flawia, M. M. and Torres, H. N. (2003a). "An early ancestor in the evolution of splicing: a *Trypanosoma cruzi* serine-arginine-rich protein (TcSR) is functional in cis-splicing." Mol Biochem Parasitol **127**(1): 37-46.

Portal, D., Lobo, G. S., Kadener, S., Prasad, J., Espinosa, J. M., Pereira, C. A., Tang, Z., Lin, R. J., Manley, J. L., Kornblihtt, A. R., Flawia, M. M. and Torres, H. N. (2003b). "*Trypanosoma cruzi* TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases." Mol Biochem Parasitol **127**(1): 9-21.

Rabi Das, V. N., Siddiqui, N. A., Pal, B., Lal, C. S., Verma, N., Kumar, A., Verma, R. B., Kumar, D., Das, P. and Pandey, K. (2017). "To evaluate efficacy and safety of amphotericin B in two different doses in the treatment of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL)." PLoS One **12**(3): e0174497.

Rahman, R., Goyal, V., Haque, R., Jamil, K., Faiz, A., Samad, R., Ellis, S., Balasegaram, M., Boer, M. D., Rijal, S., Strub-Wourgaft, N., Alves, F., Alvar, J. and Sharma, B. (2017). "Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh." PLoS Negl Trop Dis **11**(5): e0005635.

Rampersad, S. N. (2012). "Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays." Sensors (Basel) **12**(9): 12347-12360.

Reithinger, R., Mohsen, M. and Leslie, T. (2010). "Risk factors for anthroponotic cutaneous Leishmaniasis at the household level in Kabul, Afghanistan." PLoS Negl Trop Dis **4**(3): e639.

Risso, G., Pelisch, F., Quaglino, A., Pozzi, B. and Srebrow, A. (2012). "Regulating the regulators: serine/arginine-rich proteins under scrutiny." IUBMB Life **64**(10): 809-816.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-425.

Sanford, J. R. and Bruzik, J. P. (1999). "SR proteins are required for nematode trans-splicing in vitro." RNA **5**(7): 918-928.

Sanford, J. R., Gray, N. K., Beckmann, K. and Caceres, J. F. (2004). "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation." Genes Dev **18**(7): 755-768.

Saúde, M. d. (2017). "Doenças e Agravos de Notificação - De 2007 em diante." Retrieved 01 de dezembro de 2017, from <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>.

Schellenberg, M. J., Ritchie, D. B. and MacMillan, A. M. (2008). "Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition." Trends Biochem Sci **33**(6): 243-246.

Scott, P. and Novais, F. O. (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis." Nat Rev Immunol **16**(9): 581-592.

Screaton, G. R., Caceres, J. F., Mayeda, A., Bell, M. V., Plebanski, M., Jackson, D. G., Bell, J. I. and Krainer, A. R. (1995). "Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors." EMBO J **14**(17): 4336-4349.

Seeliger, D. and de Groot, B. L. (2010). "Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina." J Comput Aided Mol Des **24**(5): 417-422.

Shafiei, R., Mohebal, M., Akhoundi, B., Galian, M. S., Kalantar, F., Ashkan, S., Fata, A., Farash, B. R. and Ghasemian, M. (2014). "Emergence of co-infection of visceral leishmaniasis in HIV-positive patients in northeast Iran: a preliminary study." Travel Med Infect Dis **12**(2): 173-178.

Sifontes-Rodriguez, S., Monzote-Fidalgo, L., Castanedo-Cancio, N., Montalvo-Alvarez, A. M., Lopez-Hernandez, Y., Diogo, N. M., Infante-Bourzac, J. F., Perez-Martin, O., Meneses-Marcel, A., Garcia-Trevijano, J. A. and Cabrera-Perez, M. A. (2015). "The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* in vitro and in vivo." Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(2): 166-173.

Singh, N., Kumar, M. and Singh, R. K. (2012). "Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets." Asian Pac J Trop Med **5**(6): 485-497.

Sinha, S. and Sundaram, S. (2016). "An analysis of phosphorylation sites in protein kinases from Leishmania." Bioinformatics **12**(4): 249-253.

Sippl, M. J. (1993). "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Proteins **17**(4): 355-362.

Siqueira, R. P., Barros, M. V. A., Barbosa, E. A. A., Onofre, T. S., Goncalves, V. H. S., Pereira, H. S., Silva Junior, A., de Oliveira, L. L., Almeida, M. R., Fietto, J. L. R., Teixeira, R. R. and Bressan, G. C. (2017). "Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs)." Eur J Med Chem **134**: 97-109.

Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." Parasit Vectors **10**(1): 82.

Sundar, S. and Chakravarty, J. (2015). "An update on pharmacotherapy for leishmaniasis." Expert Opin Pharmacother **16**(2): 237-252.

Sundar, S., Rai, M., Chakravarty, J., Agarwal, D., Agrawal, N., Vaillant, M., Olliaro, P. and Murray, H. W. (2008). "New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine." Clin Infect Dis **47**(8): 1000-1006.

Sundar, S. and Singh, A. (2016). "Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis." Ther Adv Infect Dis **3**(3-4): 98-109.

Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C. S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P. and Modabber, F. (2011). "Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial." Lancet **377**(9764): 477-486.

Thompson, J. S., Brown, S. A., Khurdayan, V., Zeynalzadedan, A., Sullivan, P. G. and Scheff, S. W. (2002). "Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbitol, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice." Comp Med **52**(1): 63-67.

Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. and Nakamura, C. V. (2011). "Recent advances in leishmaniasis treatment." Int J Infect Dis **15**(8): e525-532.

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. and Arenas, R. (2017). "Leishmaniasis: a review." F1000Res **6**: 750.

Trott, O. and Olson, A. J. (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." J Comput Chem **31**(2): 455-461.

van Griensven, J., Carrillo, E., Lopez-Velez, R., Lynen, L. and Moreno, J. (2014). "Leishmaniasis in immunosuppressed individuals." Clin Microbiol Infect **20**(4): 286-299.

Veras, P. S. and Bezerra de Menezes, J. P. (2016). "Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection." Int J Mol Sci **17**(8).

Wahl, M. C., Will, C. L. and Luhrmann, R. (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." Cell **136**(4): 701-718.

Wang, H. Y., Lin, W., Dyck, J. A., Yeakley, J. M., Songyang, Z., Cantley, L. C. and Fu, X. D. (1998). "SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells." J Cell Biol **140**(4): 737-750.

Wiederstein, M. and Sippl, M. J. (2007). "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W407-410.

Wodak, S. J. and Janin, J. (1980). "Analytical approximation to the accessible surface area of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 1736-1740.

World Health, O. (2010). "Control of the leishmaniases." World Health Organ Tech Rep Ser(949): xii-xiii, 1-186, back cover.

World Health, O. (2015). "Leishmaniasis - Global Health Observatory (GHO) data." Retrieved 04 de novembro de 2017, from http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.

World Health, O. (2018). "Leishmaniasis - 14 de março de 2018." Retrieved 22 de julho de 2018, from <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

Xiao, R., Sun, Y., Ding, J. H., Lin, S., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., Fu, X. D. and Li, X. (2007). "Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and

cell proliferation during mammalian organogenesis." Mol Cell Biol **27**(15): 5393-5402.

Zahler, A. M., Lane, W. S., Stolk, J. A. and Roth, M. B. (1992). "SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors." Genes Dev **6**(5): 837-847.

Zamir, M., Zaman, G. and Alshomrani, A. S. (2016). "Sensitivity Analysis and Optimal Control of Anthroponotic Cutaneous Leishmania." PLoS One **11**(8): e0160513.

Zhou, Z. and Fu, X. D. (2013). "Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases." Chromosoma **122**(3): 191-207.

Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A., el-Hassan, I. M. and el-Hassan, A. M. (2003). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis." Lancet Infect Dis **3**(2): 87-98.

Zuckerlandl, E., Pauling, L. (1965). "Evolutionary divergence and convergence in proteins." Edited in Evolving Genes and Proteins by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York.: 97-166.

Zulfiqar, B., Shelper, T. B. and Avery, V. M. (2017). "Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development." Drug Discov Today **22**(10): 1516-1531.

Anexo 1

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) aprovando a realização do experimento descrito no trabalho.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 30/2018, intitulado “**Serine-arginine protein kinases (SRPKs) como potencial alvo de fármacos em *Leishmania brazilienses***”, coordenado pelo professor Raphael de Souza Vasconcellos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 26/06/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 30/2018, named “**Serine-arginine protein kinases (SRPKs) as potential target drugs in Brazilian Leishmania**”, is in agreement with the an actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on June 26, 2018 valid for 12 months.

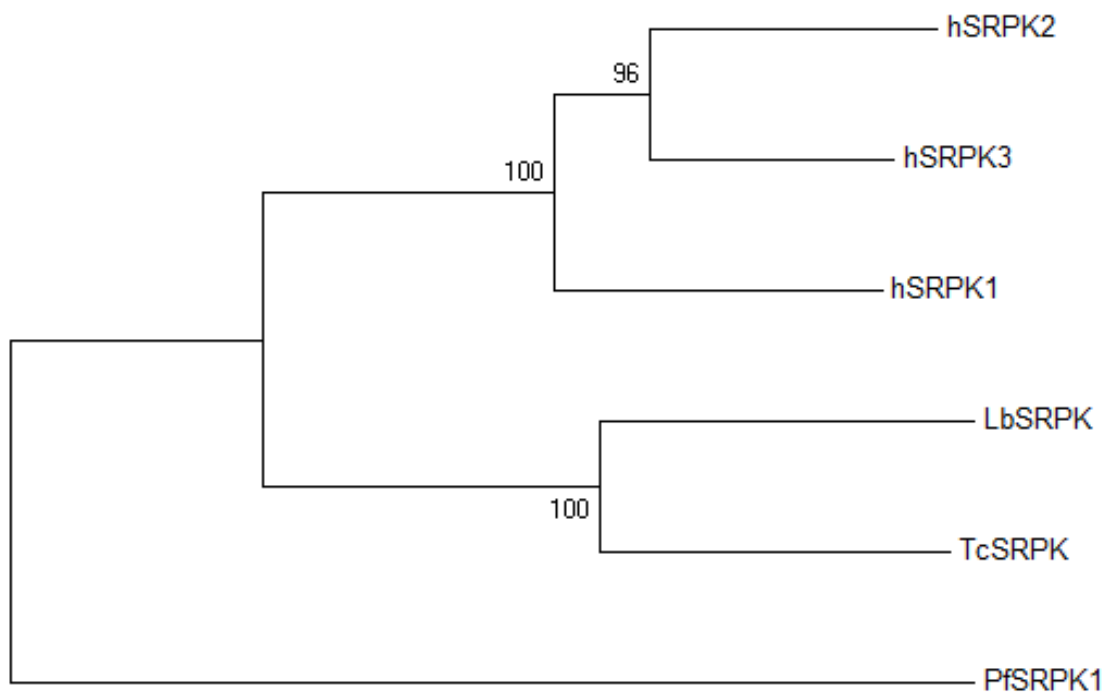

Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

Anexo 2

Árvore filogenética construída utilizando o método Neighbor-Joining (Saitou et al., 1987), com teste de bootstrap com 10.000 réplicas (Felsenstein, 1985), através da análise de 6 sequências (as 5 sequências usadas como referência na busca em banco de dados e a sequência da possível SRPK de *L. braziliensis*). As distâncias evolutivas foram computadas usando o método de correção de Poisson (Zuckerandl, 1965) e a taxa de variação entre os sítios de substituição de aminoácidos modelada com distribuição gama (parâmetro de shape = 4). As análises foram realizadas no MEGA7 versão 7.0.21 (Kumar et al., 2016).



Anexo 3

Análise da sequência da LbSRPK no NetNES 1.1 Server, para predição de sinal de exportação nuclear.

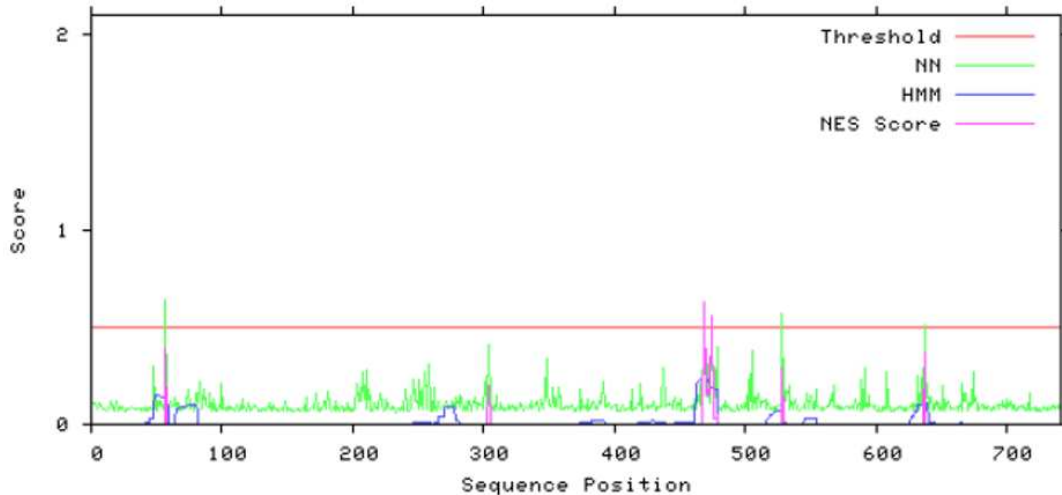


NetNES 1.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

>LbSRPK - NetNES 1.1 prediction

NetNES 1.1: Predicted NES signals in LbSRPK



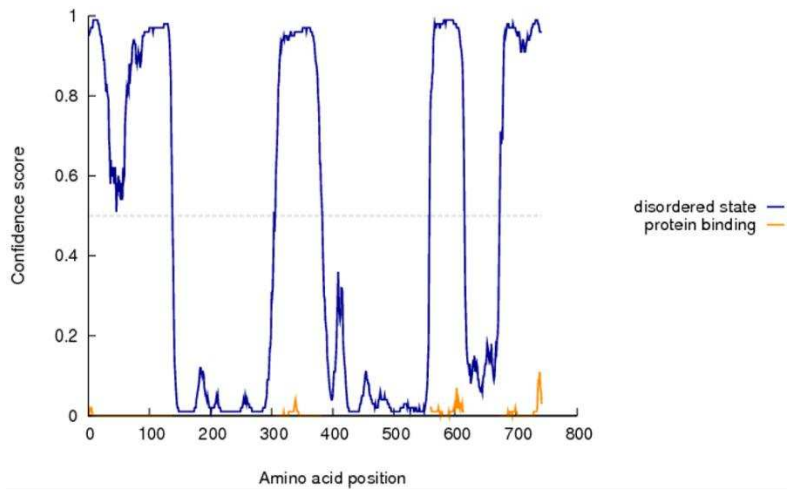
#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
#-----				
LbSRPK-460-D	0.091	0.012	0.000	-
LbSRPK-461-H	0.130	0.012	0.000	-
LbSRPK-462-L	0.103	0.208	0.000	-
LbSRPK-463-A	0.082	0.208	0.000	-
LbSRPK-464-L	0.153	0.220	0.000	-
LbSRPK-465-M	0.095	0.229	0.000	-
LbSRPK-466-S	0.212	0.229	0.000	-
LbSRPK-467-E	0.146	0.229	0.000	-
LbSRPK-468-L	0.421	0.282	0.504	Yes
LbSRPK-469-L	0.567	0.296	0.626	Yes
LbSRPK-470-G	0.155	0.222	0.152	-
LbSRPK-471-D	0.142	0.222	0.162	-
LbSRPK-472-L	0.309	0.225	0.184	-
LbSRPK-473-P	0.112	0.192	0.144	-
LbSRPK-474-E	0.469	0.192	0.554	Yes
LbSRPK-475-S	0.072	0.192	0.044	-
LbSRPK-476-M	0.102	0.192	0.033	-
LbSRPK-477-R	0.167	0.182	0.028	-
LbSRPK-478-L	0.395	0.182	0.045	-
LbSRPK-479-G	0.081	0.000	0.000	-
LbSRPK-480-D	0.077	0.000	0.000	-

Anexo 4

Predição do perfil de desordem da LbSRPK utilizando o DISOPRED (Buchan et al., 2013), programa que identifica os resíduos que, provavelmente, são nativamente desordenados. A remoção das regiões N- e C-terminal e espaçadora diminui a probabilidade de desordem da proteína.

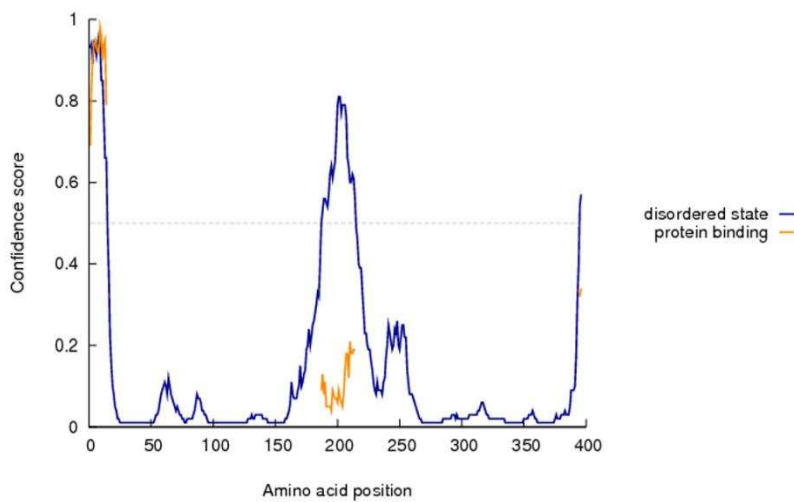
LbSRPK – sequência completa

Intrinsic disorder profile



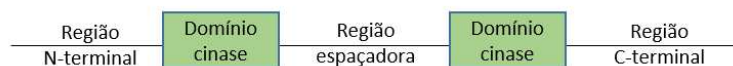
LbSRPK – sequência truncada

Intrinsic disorder profile



Análise dos domínios presentes nas SRPKs de Homo sapiens (hSRPK1, hSRPK2 e hSRPK3), Trypanosoma cruzi (TcSRPK), Plasmodium falciparum (PfSRPK1) e da possível SRPK de Leishmanis braziliensis (LbSRPK) utilizando o Pfam (Finn et al., 2016). O esquema presente na figura mostra a sequência com que são representadas as regiões e domínios das SRPKs no resultado obtido com o Pfam.

Esquema das regiões presentes nas SRPKs*



* Os tamanhos das regiões N- e C-terminais e da região espaçadora são variáveis.

Representação dos domínios e regiões das SRPKs, de acordo com o esquema acima

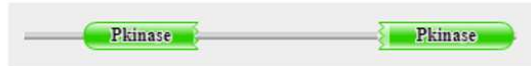
LbSRPK (742aa)



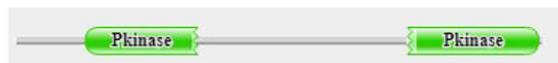
TcSRPK (716aa)



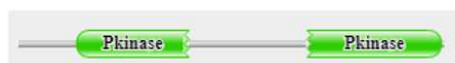
hSRPK1 (655aa)



hSRPK2 (699aa)



hSRPK3 (567aa)



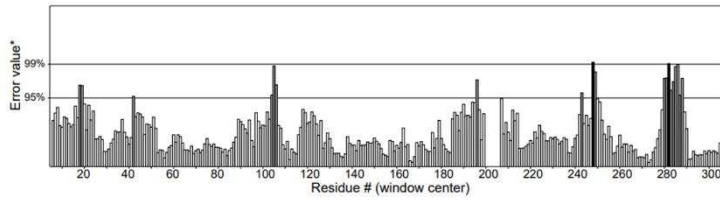
PfSRPK1 (1.338aa)



Anexo 5

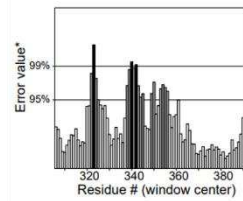
ERRAT

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/4136806/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor*: 90.237



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/4136806/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor*: 90.237



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Verify3D

85.35% of the residues have averaged 3D-1D score ≥ 0.2

Pass

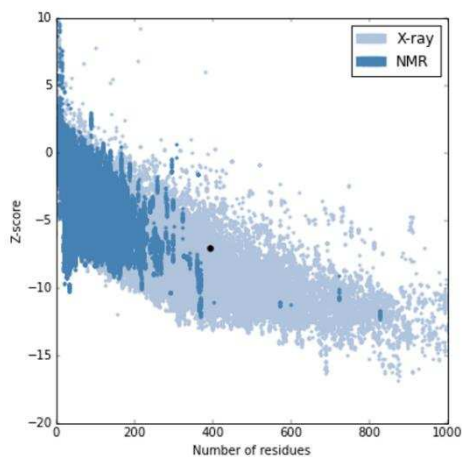
At least 80% of the amino acids have scored ≥ 0.2 in the 3D/1D profile.



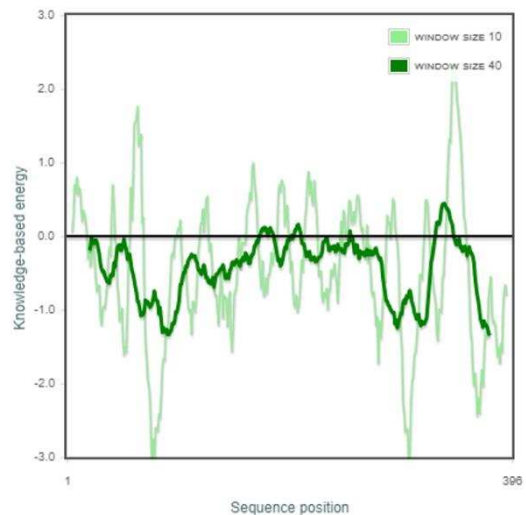
ProSA

Overall model quality

Z-Score: -7.06

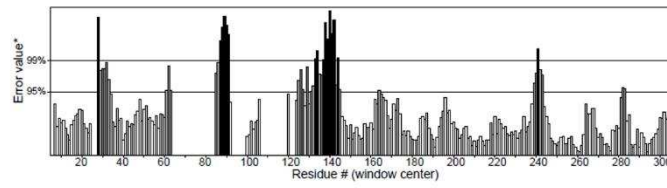


Local model quality



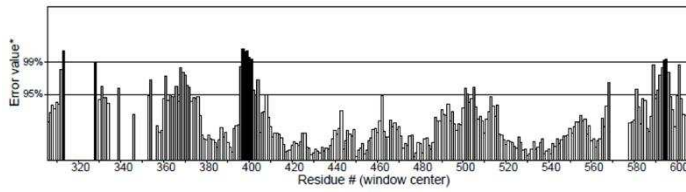
ERRAT

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/8954567/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor**: 83.861



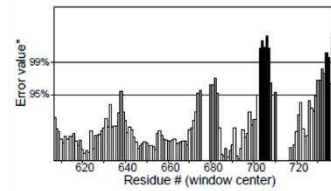
*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/8954567/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor**: 83.861



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/8954567/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor**: 83.861



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Verify3D

Completed at 10:57 am | View Structure

64.56% of the residues have averaged 3D-1D score >= 0.2

Fail

Fewer than 80% of the amino acids have scored >= 0.2 in the 3D/1D profile.

Verify3D: SRPK_LbrM2904_yasara.pdb



PROCHECK

```

Check of stereochemical quality - PROCHECK v.3.5.4 (Feb 2001)
-----
Coordinates file: [ /var/www/PROCHECK/Jobs/7359103/7359103.pdb ]
Resolution:      1.5
Program directory: /var/www/PROCHECK/procheck

Running clean-up on file: /var/www/PROCHECK/Jobs/7359103/7359103.pdb

* Side chain atoms swapped for residues:
* PHE 13 PHE 14 GLU 22 ASP 53 PHE 65 TYR 72 GLU 85
* PHE 152 ASP 160 TYR 174 ASP 177 ASP 205 ASP 215 ASP 235
* PHE 255 TYR 267 PHE 279 GLU 304 GLU 326 ARG 329 ASP 330
* Program completed

-----
Secondary structure assignment

* Program completed

-----
Non-bonded interactions

* Program completed

-----
Calculation of bond lengths and bond angles

* Program completed

-----
Phi-psi and chi1-chi2 distributions

Main Ramachandran plot      * File: 7359103_01.ps
All-residue Ramachandran plots * File: 7359103_02.ps
All-residue chi1-chi2 plots * File: 7359103_03.ps
* Program complete

-----
Stereochemical quality plots and residue-by-residue listing

Main-chain parameters      * File: 7359103_04.ps
Side-chain parameters      * File: 7359103_05.ps
Residue properties plot    * File: 7359103_06.ps
* cis-peptide: PRO 202
* cis-peptide: SER 328
* cis-peptide: PRO 386
* cis-peptide: PRO 387
*
* Detailed listing: 7359103.out
*
* Program complete

-----
Main-chain bond-lengths and angles, and planar groups

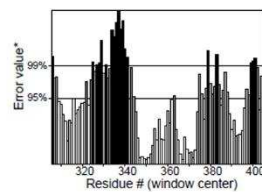
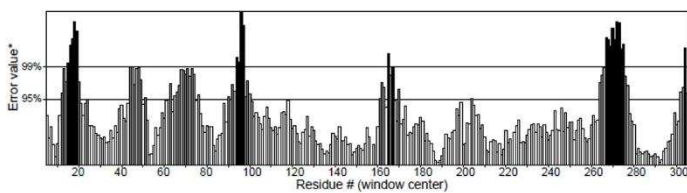
Main-chain bond lengths      * File: 7359103_07.ps
Main-chain bond angles      * File: 7359103_08.ps
RMS distances from planarity * File: 7359103_09.ps
Distorted geometry          * File: 7359103_10.ps
* Distorted main-chain bonds: 0
* Distorted main-chain angles: 32
* Distorted planar groups: 11
* Program complete
*
* Summary page: 7359103.sum

```

ERRAT

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/3388304/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor**: 72.544

Program: ERRAT2
 File: /home/saves/Jobs/3388304/qq_aaaa.pdb_errat.logf
 Overall quality factor**: 72.544



*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Verify3D

60.29% of the residues have averaged 3D-1D score >= 0.2

Fail

Fewer than 80% of the amino acids have scored >= 0.2 in the 3D/1D profile.

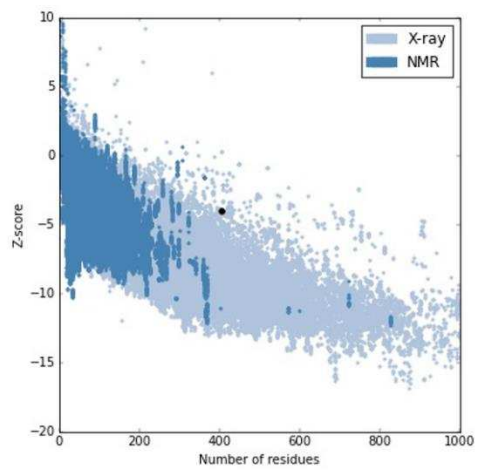


ProSA

Overall model quality

[HELP](#)

Z-Score: **-4.04**



Local model quality

[HELP](#)

