

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BRUNA UKRAINSKI

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS LEUCIL e
VALIL-tRNA SINTETASES de *Trypanosoma cruzi* e GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO
DESIDROGENASE de *Babesia bovis*

PONTA GROSSA

2026

BRUNA UKRAINSKI

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS LEUCIL e
VALIL-tRNA SINTETASES de *Trypanosoma cruzi* e GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO
DESIDROGENASE de *Babesia bovis*

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Química ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Estadual
de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek

Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva

PONTA GROSSA

2026

U35 Ukrainski, Bruna

 Expressão heteróloga e estudos estruturais das enzimas leucil e valil-tRNA sintetases de *Trypanosoma cruzi* e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Babesia bovis* / Bruna Ukrainski. Ponta Grossa, 2026.
 77 f.

 Dissertação (Mestrado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.
 Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva.

 1. TcValRS. 2. TcLeuRS. 3. BbGAPDH. 4. Babesiose bovina. 5. Doença de chagas. I. Iulek, Jorge. II. Silva, Marcio. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA UKRAINSKI

**“EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS
LEUCIL E VALIL-tRNA SINTETASE DE *Trypanosoma cruzi* E
GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Babesia bovis*”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

gov.br Documento assinado digitalmente
JORGE IULEK
Data: 21/02/2026 16:26:49-0300
Verifique em <https://validar.jti.gov.br>

Orientador Prof. Dr. Jorge Iulek
UEPG/PR

Documento assinado digitalmente
gov.br **ALINE COQUEIRO**
Data: 22/02/2026 09:31:53-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dra. Aline Coqueiro
UTFPR/PR

gov.br Documento assinado digitalmente
JULIANA INABA
Data: 25/02/2026 08:56:34-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dra. Juliana Inaba
UEPG/PR

Ponta Grossa, 20 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo suporte e incentivo durante toda a vida.

Ao orientador Prof. Dr. Jorge Iulek, por toda a orientação, sobretudo nas últimas semanas com os trabalhos com os dados de difração de raios X. Foi um prazer ser orientada pelo senhor.

Ao coorientador Prof. Dr. Marcio Silva, por todo o suporte na fase experimental do projeto e pelos ensinamentos sobre biologia molecular. Foi ótimo trabalhar com o senhor.

Ao meu namorado André, por todo o incentivo, apoio e palavras de conforto, quando eu achei que a jornada estava difícil. O seu apoio foi essencial para a finalização deste projeto. Obrigada por todo o companheirismo e amor.

À Emelly B. Galvão, minha primeira aluna de Iniciação Científica. Obrigado pela amizade durante o tempo de execução do projeto. Realizar os ensaios de cristalização nos finais de semana foi bem mais divertido em companhia.

Aos meus colegas e amigos de vida e de laboratório, obrigado pelas conversas, desabafos e risadas.

Ao *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease* (SSGCID), por fornecer os vetores plasmidiais de expressão com os genes das proteínas deste trabalho.

Ao Laboratório de Biociências do Brasil (LNBio), em específico ao Laboratório de Purificação de Proteínas, ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria e ao ROBOLAB, e ao Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), pelo apoio para o uso de suas instalações.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-LABMU), pela realização das análises que possibilitaram a existência deste trabalho.

À CAPES e a Fundação Araucária, pelo fomento.

RESUMO

A determinação das estruturas tridimensionais de proteínas de patógenos ajuda a compreender seu funcionamento em detalhes e a identificar características que as distinguem das proteínas homólogas dos hospedeiros. Esse conhecimento, adjuntado à interpretação dos dados estruturais já disponíveis, serve de base para estudos computacionais diversos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo expressar e caracterizar estruturalmente as enzimas leucil e valil-tRNA sintetases de *Trypanosoma cruzi* (*TcLeuRS* e *TcValRS*, respectivamente) e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Babesia bovis* (*BbGAPDH*). A *TcLeuRS* foi superexpressa, no entanto, majoritariamente na fração insolúvel, impossibilitando as etapas de purificação e posteriores ensaios de cristalização. A *TcValRS* foi superexpressa e, apesar da pequena quantidade na fração solúvel observada no SDS-PAGE, purificada e quantificada. Seu rendimento foi de aproximadamente 750 μL a 1 mg mL^{-1} , o que impossibilitou ensaios de cristalização. Já para a *BbGAPDH*, o protocolo para expressão e purificação foi desenvolvido com rendimento de 28 mg de proteína pura por litro de meio de cultura. Para sua cristalização, remoção da cauda de histidina foi essencial. Cristais difrataram à resolução de 3,12 Å no grupo de espaço $P3_121$; a estrutura 3D foi refinada contendo moléculas do cofator NAD^+ observadas em seus respectivos sítios. Comparações com o modelo teórico indicaram uma série de diferenças na conformação de cadeias laterais. Esses resultados fornecem suporte para futuros ensaios de inibição enzimática, além de ensaios de cristalização de complexos com potenciais inibidores.

Palavras-chave: *TcValRS*, *TcLeuRS*, GAPDH, Babesiose Bovina, Doença de Chagas, *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Three dimensional structure determination of pathogen proteins helps to understand their functions in detail and to identify characteristics that distinguish them from homologous host proteins. This knowledge, along with the interpretation of already available structural data, serves as basis for several computational studies. Thus, the present work aimed to express and structurally characterize the leucyl and valyl-tRNA synthetases enzymes from *Trypanosoma cruzi* (*TcLeuRS* and *TcValRS*, respectively) and the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Babesia bovis* (*BbGAPDH*). *TcLeuRS* was overexpressed, nevertheless, mostly in the insoluble fraction, making purification and subsequent crystallization assays impossible. *TcValRS* was overexpressed and, despite the small amount in the soluble fraction observed at SDS-PAGE, it was purified and quantified. The yield was approximately 750 μL at 1 mg mL^{-1} , what prevented crystallization assays. For *BbGAPDH*, the expression and purification protocol was developed to a yield of 28 mg of pure protein per liter of culture medium. For crystallization, his-tag removal was essential. Crystals diffracted at a resolution of 3.12 Å in the $P3_121$ space group; the 3D structure was refined containing NAD^+ cofactor molecules observed in their respective sites. Comparisons with the theoretical model indicated several differences in the conformation of side chains. These results provide support for future enzyme inhibition assays, as well as for crystallization assays of complexes with potential inhibitors.

Keywords: *TcValRS*, *TcLeuRS*, GAPDH, Bovine Babesiosis, Chagas Disease, *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2 - Processo de aminoacilação catalisada pela aaRS (na imagem, o aminoácido é transferido para o grupo 2'-hidroxila da porção ribose, típico de uma aaRS da classe II).....	19
Figura 3 - Estrutura de uma GlnRS.	20
Figura 4 - Classes e subclasses das aaRS baseadas em seu domínio catalítico.....	21
Figura 5 - Ciclo de reprodução do parasita <i>Babesia</i> sp.	22
Figura 6 - Processo de catálise realizada pela GAPDH.....	25
Figura 7 - Mecanismo da reação da formação do 1,3-bifosfo-D-glicerato catalisado pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.	26
Figura 8 - (A) SDS-PAGE do teste de expressão da <i>TcLeuRS</i> . As raias se referem a: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; SNI – Sobrenadante da amostra Não Induzida; PNI – Pellet Não Induzido; L1, S1, P1 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,1 mmol L-1); L2, S2, P2 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,5 mmol L-1); L3, S3, P3 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 1,0 mmol L-1); L4, S4, P4 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet do meio autoinduzido.	37
Figura 9 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da <i>TcLeuRS</i> . (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; I – amostra Injetada; Números - indicam as frações coletadas.	38
Figura 10 - (A) SDS-PAGE 10% do teste de expressão da <i>TcValRS</i> . As raias se referem a: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; LNI – Lisado da amostra Não Induzida; SNI – Sobrenadante da amostra Não Induzida; PNI – Pellet Não Induzido; L1, S1, P1 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,1 mmol L-1); L2, S2, P2 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,5 mmol L-1); L3, S3, P3 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 1,0 mmol L-1); L4, S4, P4 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (meio autoinduzido).....	40
Figura 11 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da <i>TcValRS</i> . (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; I - amostra Injetada; Números - indicam as frações coletadas.	41
Figura 12 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da <i>TcValRS</i> . (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; I - amostra Injetada; Números - indicam as frações coletadas.	41
Figura 13 - SDS-PAGE 10% do teste de expressão da <i>BbGAPDH</i> . As raias se referem a: MMM - Marcadores de Massas Moleculares, A:250,0; B:150,0; C: 66,0; D:29,0 kDa. NI – fração Não Induzida; L1, S1, P1 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,1 mmol L-1); L2, S2, P2 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,5 mmol L-1); L3, S3, P3 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 1,0 mmol L-1); L4, S4, P4 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (meio autoinduzido).....	42
Figura 14 - (A) Perfil de eluição da <i>BbGAPDH</i> (B) SDS-PAGE 10% das amostras referentes ao terceiro pico do cromatograma.....	43
Figura 15 - Cristais obtidos nos kits (A) Structure Screen - condição 4 (B) Structure Screen - condição 6 (C) Structure Screen - condição 8 (D) Structure Screen - condição 11 (E) JBScreen Pentaerythritol – condição 4 (F) Structure Screen – condição 24. Os cristais estão indicados em círculos com bordas vermelhas.....	45
Figura 16 - Cristais da <i>BbGAPDH</i> obtidos na condição 0,1 mol L-1 Tris – HCl pH 8,0, 0,1 mol L-1 NH ₄ H ₂ PO ₄ , 55% MPD.	47

Figura 17 - Cristais obtidos (A) na condição B2 - 0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ .6H ₂ O, 0,6 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄ e (B) na condição D2 - 0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ .6H ₂ O, 0,6 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	49
Figura 18 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da BbGAPDH. (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; L - lisado; I - amostra Injetada; F - amostra do primeiro pico (Flow); Números - indicam as frações coletadas.....	50
Figura 19 - (A) Perfil cromatográfico da IMAC e cromatografia de afinidade por glutatona da BbGAPDH. (B) SDS-PAGE 10% das amostras coletadas do pico. I - Amostra Injetada; N.C - Não Clivado; MMM - Marcadores de Massas Moleculares; Números - indicam as frações coletadas.	51
Figura 20 - (A) Perfil cromatográfico da gel filtração da BbGAPDH. (B) SDS-PAGE 10% das amostras coletadas do pico. I - Amostra Injetada; MMM - Marcadores de Massas Moleculares; Números - indicam as frações coletadas.....	52
Figura 21 - Distribuição de tamanho de partículas em solução determinada por DLS.....	52
Figura 22 - Efeito da temperatura na fluorescência de resíduos Trp da BbGAPDH.....	53
Figura 23 - Cristais obtidos nas condições (A) e (B) 14 do kit JCSG-plus Eco, (C) 27 do kit PACT premier Eco Screen, (D) 87 do kit SG1 Eco Screen, (E) 90 do kit SG1, (F) 57 do kit Wizard Classic.	55
Figura 24 - Alinhamento de sequências da BbGAPDH. As setas vermelhas representam fitas- β , os cilindros vermelhos representam hélices- α e as espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π	58
Figura 25 - O tetrâmero da BbGAPDH e seus três eixos ortogonais de ordem 2.	60
Figura 26 - Gráfico de Ramachandran para o modelo refinado final da BbGAPDH. (A) Geral excluindo Gly, Pro, Pré-Pro, Ile (B) apenas para Val/Ile.	61
Figura 27 - Representação gráfica dos valores de RSCC e RSR, em azul e vermelho, respectivamente, calculados para o modelo refinado da BbGAPDH por resíduo na (A) cadeia A (B) cadeia B.	62
Figura 28 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da BbGAPDH com BtGAPDH (PDB ID: 7U5M), HsGAPDH (PDB ID: 1U8F), CpGAPDH (PDB ID: 3CPS), PlGAPDH (PDB ID: 3DE5) e NgGAPDH (PDB ID: 5UR0).	65
Figura 29 - Arg193 das cadeias A e B (em ciano).	66
Figura 30 - Posição dos resíduos (A) Asp241 e Asp317, em azul (B) Val242, em vermelho. .	67
Figura 31 - Visualização do ajuste das cadeias laterais na densidade eletrônica. Em verde, a conformação do modelo teórico, e em rosa, a estrutura experimental. (A) Arg193 cadeia A (B) Arg193 cadeia B (C) Glu225 cadeia A (D) Glu225 cadeia B (E) Arg236 cadeia A (F) Arg236 cadeia B (G) Lys292 cadeia A (H) Lys292 cadeia B.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições iniciais em que se obtiveram cristais da <i>Bb</i> GAPDH.	44
Tabela 2 - Concentrações utilizadas para otimização da condição 6 do kit Structure Screen.	466
Tabela 3 - Concentrações utilizadas para otimização da condição 8 do kit Structure Screen. .	48
Tabela 4 - Condições de cristalização onde se obtiveram cristais da <i>Bb</i> GAPDH sem cauda. .	55
Tabela 5 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento.	57
Tabela 6 - Valores de RSZO, RSZD, RSR e RSCC para os monômeros da <i>Bb</i> GAPDH.	61
Tabela 7 - Dados das proteínas homólogas à enzima <i>Bb</i> GAPDH obtidos a partir do alinhamento de sequências	63
Tabela 8 - Comparação entre os rotâmeros, modelo teórico e estrutura experimental.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aaRS – Aminoacil-tRNA sintetases

AMP – Adenosina monofosfato

AMP-aa – Aminoacil adenilato

ATP – Adenosina trifosfato

BbGAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato de *Babesia bovis*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BNZ – Benznidazol

DLS – *Dynamic light scattering*

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*

IA – Inteligência artificial

ICT – *Immunochromatography Test*

IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria Bertani

NAD⁺ – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NFX – Nirfutimox

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDB – *Protein Data Bank*

PDI - *Polydispersity index*

Pi – Fosfato inorgânico

PPi – Pirofosfato inorgânico

RIFI - *Indirect Immunofluorescence Test*

RSCC – *Real Space Coefficient Correlation*

RSR – *Real Space Residual*

RSZD – *Real Space Z-score of Difference Density*

RSZO - *Real Space Z-score of Observed Density*

TcLeuRS – Leucil tRNA-sintetase de *Trypanosoma cruzi*

TcValRS – Valil tRNA-sintetase de *Trypanosoma cruzi*

SUMÁRIO

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 DOENÇA DE CHAGAS	16
3.2 AMINOACIL-tRNA SINTETASES.....	18
3.3 BABESIOSE BOVINA.....	21
3.4 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 SOLUÇÕES	28
4.2 RECUPERAÇÃO DO PLASMÍDEO	29
4.3 PREPARO DAS CÉLULAS QUIMICOMPETENTES.....	29
4.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	30
4.5 EXPRESSÃO PROTEICA.....	30
4.6 PURIFICAÇÃO	31
4.7 CLIVAGEM DA HIS-TAG	32
4.8 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA EMCONDIÇÕES DESNATURANTES.....	32
4.9 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS	32
4.10 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS) E NANO-FLUORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (NanoDSF)	33
4.11 COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DOS CRISTAIS DA <i>BbGAPDH</i>	34
4.12 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS	34
4.12.1 Determinação Da Estrutura Cristalográfica Por Difração De Raios X	34
4.12.1.1 Processamento das imagens de difração.....	34
4.12.1.2 Atribuição inicial das fases	35
4.12.1.3 Modelagem e refinamento	35
4.12.1.4 Validação do modelo	35
4.12.2 Alinhamento da sequência de aminoácidos da <i>bbgapdh</i> e análise de resíduos conservados	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 LEUCIL-tRNA SINTETASE (<i>TcLeuRS</i>).....	37
5.1.1 Expressão e purificação da <i>tcleurs</i>	37
5.2 VALIL-tRNA SINTETASE (<i>TcValRS</i>).....	39

5.2.1 Expressão e purificação da <i>Tc</i> ValRS	39
5.3 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE	42
5.3.1 Expressão, purificação e cristalização da <i>Bb</i> GAPDH.....	42
5.3.2 Procedimentos computacionais	56
5.3.2.1 Coleta de dados e processamento das imagens	56
5.3.2.2 Substituição molecular e faseamento inicial	58
5.3.2.3 Validação	60
5.3.2.4 Comparações estruturais e de sequência da <i>Bb</i> GAPDH.....	63
5.3.2.5 Comparações estruturais do modelo experimental com o modelo teórico	67
6 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS	72

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Patógenos que podem ser transmitidos de animais para humanos causam mais de 200 tipos conhecidos de doenças zoonóticas, incluindo aquelas causadas por parasitas (Weiss, 2008). Os parasitas não são apenas os agentes causadores de doenças animais e humanas, mas também frequentemente a principal via de aquisição da infecção (Kaminsky; Mäser, 2025).

As infecções parasitárias representam um problema de saúde pública que muitas vezes levam a quadros clínicos graves tanto em humanos quanto em animais. Entre as enfermidades causadas pelos parasitas, destacam-se a Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e a Babesiose Bovina, causada pela *Babesia bovis*, que são de importância médica e veterinária, respectivamente.

A Doença de Chagas é considerada endêmica na América Latina e no sul dos Estados Unidos, causando anualmente cerca de 12 mil mortes segundo (WHO, 2025). A doença apresenta duas fases clínicas, aguda e crônica; as duas fases são majoritariamente assintomáticas, no entanto, na fase crônica pode haver a manifestação de sintomas decorrentes de lesões cardíacas e/ou gastrointestinais. O tratamento é realizado com benzonidazol (BNZ) ou nifurtimox (NFX), com maior eficácia se administrados na fase aguda da doença (Norman; López-Vélez, 2019).

De forma análoga, no contexto veterinário, a Babesiose Bovina apresenta grandes desafios e é importante em países como o Brasil, onde a pecuária representa um setor econômico estratégico. A infecção por *Babesia bovis* pode levar à redução na produção de leite e carne, além de provocar infertilidade e, em casos graves, mortalidade dos animais (Ozubek *et al.*, 2020). No Brasil, Grisi e colaboradores (2014) estimaram os custos anuais associados a infecção por *B. bovis*, valores que chegaram à margem de US\$ 3,24 bilhões. Além disso, Rodrigues e Leite (2013) estimaram as perdas na produção de leite causadas pelos carrapatos *Rhipicephalus* no estado de Minas Gerais em valores que indicam uma redução anual de 90,24 L de leite anual por vaca por período de lactação.

O tratamento deve ser iniciado assim que a infecção é diagnosticada para maior êxito e evitar que a doença se espalhe (Florin-Christensen *et al.*, 2014). Atualmente, dois medicamentos estão disponíveis comercialmente: o dipropionato de imidocarb, que apesar da eficiência possui relatos de permanência nos tecidos que são comercializados para consumo (Suarez e Noh, 2011), e o aceturato de diminazeno, que é, entretanto, menos eficaz contra *B.*

bovis do que contra outros parasitas do gênero *Babesia*, além de ser menos eficiente, o que faz com que o gado apresente recidiva da doença (Yamasaki *et al.*, 2017).

Visando o combate destas doenças que são endêmicas principalmente no Brasil, novos alvos terapêuticos estão sendo estudados, dentre eles, alvos enzimáticos. As enzimas são catalisadores biológicos extremamente específicos para os substratos sobre os quais atuam, sendo essenciais em diversos processos bioquímicos (Moran; Horton; Scrimgeour; Perry, 2013). Essa relevância também se aplica aos parasitas, nos quais várias enzimas estão envolvidas em vias metabólicas essenciais para sua sobrevivência. Desse modo, para compreender os mecanismos de ação dessas enzimas e seu potencial uso como alvo terapêutico, faz-se necessário, inicialmente, o conhecimento de sua estrutura tridimensional. A determinação da conformação 3D possibilita a identificação de sítios ativos e regiões de ligação específicas, o que permite a exploração da estrutura dessas moléculas biológicas em futuras abordagens de desenvolvimento de fármacos.

As aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) vêm sendo exploradas como alvos terapêuticos em estudos moleculares parasitários, devido ao papel fundamental que desempenham nas vias metabólicas em que atuam. As aaRS catalisam o processo de aminoacilação, ligando o aminoácido ao tRNA cognato e garantindo a especificidade da síntese proteica (Pham *et al.*, 2014). Por outro lado, a GAPDH atua na glicólise, realizando a fosforilação oxidativa reversível do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfo-D-glicerato (Perez-Casal; Potter, 2016).

Assim, o presente estudo consiste na determinação da estrutura tridimensional das enzimas Leucil e Valil-tRNA sintetases de *Trypanosoma cruzi* e da GAPDH de *Babesia bovis* com o objetivo de compreender melhor suas características estruturais, funcionais e diferenciais. A elucidação dessas estruturas permite identificar sítios ativos, domínios específicos e possíveis regiões de interação com outras biomoléculas, adicionalmente contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a biologia desses parasitas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter a estrutura tridimensional das enzimas Valil e Leucil-tRNA Sintetase de *Trypanosoma cruzi* (*TcValRS* e *TcLeuRS*, respectivamente) e da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Babesia bovis* (*BbGAPDH*) através dos métodos experimentais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar, purificar e cristalizar as enzimas *TcValRS*, *TcLeuRS* e *BbGAPDH*;
- Coletar dados de difração de raios X de cristais das enzimas;
- Elucidar e refinar as estruturas tridimensionais a partir dos dados de difração obtidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

A Tripanossomíase Americana ou, como é popularmente conhecida, doença de Chagas, foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909). Atualmente, estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, de modo endêmico na América Latina, tenham contraído a Doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2025).

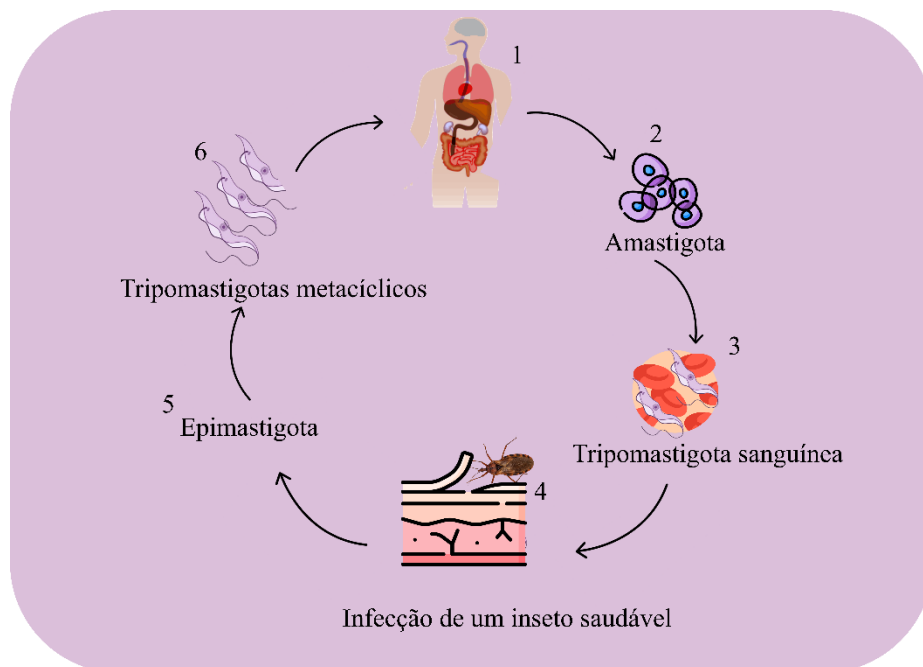
Historicamente, a Doença de Chagas foi encontrada majoritariamente em regiões rurais, onde os casos de infecção ocorriam em pessoas cujas residências eram precárias, isto é, com pisos de terra e telhados de palha e sem acesso a saneamento básico (Parra-Henao *et al.*, 2015). A doença se apresenta de forma aguda ou crônica. Na maior parte dos casos, a fase aguda é assintomática, durando de quatro a oito semanas após a infecção. Os sintomas mais comuns, quando presentes, são descritos como febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos, além de edema subcutâneo na área picada pelo triatomíneo (Swett; Rayes; Campos; Kumar, 2024). Já a fase crônica se inicia após 2 a 3 meses da infecção inicial. Os sintomas são quase imperceptíveis, onde 60 a 70% dos pacientes infectados não apresentam sintomas clínicos. No entanto, pode haver a manifestação da forma cardíaca, a mais grave e frequente das manifestações crônicas, que chega a comprometer de 20 a 30% dos pacientes, levando a morte súbita (Rassi; Rassi; de Rezende, 2012).

Os principais vetores do parasita são insetos popularmente chamados de barbeiro (*Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus lignarius*, *Rhodnius pictipes*, dentre outros), que transmitem a doença principalmente por seus excrementos infectados com o parasita *Trypanosoma cruzi* quando em contato de feridas da pele humana (Hernández *et al.*, 2016). Outras formas de infecção podem ocorrer através de transfusões de sangue ou órgãos, ingestão de alimentos contaminados ou transmissão vertical, que ocorre através da via placentária (Shcijman *et al.*, 2024).

O *T. cruzi* possui quatro estágios de desenvolvimento, conforme a Figura 1: inicialmente, os tripomastigotas metacíclicos que estão presentes nos excrementos - liberados localmente após um repasto sanguíneo - do inseto vetor entram em contato com as feridas locais na pele (etapa 1). Após a penetração nas células do hospedeiro, o parasita passa para a fase amastigota (etapa 2) que, após vários ciclos de reprodução, se diferenciam entre

amastigotas e tripomastigotas de corrente sanguínea (etapa 3). Devido à alta taxa de reprodução dentro da célula, a membrana celular acaba por se romper, tal que os tripomastigotas são liberados na corrente sanguínea e infectam demais células do corpo (Sales-Junior *et al.*, 2017). Além disso, um triatomíneo não infectado pode adquirir o *Trypanosoma cruzi* ao se alimentar do sangue de um hospedeiro infectado (etapa 4). Os tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas (forma multiplicativa) no intestino do inseto (etapa 5), migram para o reto e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (etapa 6), que são excretados junto as fezes e urina do inseto (Kollien; Schaub, 2000; Fuentes-Vicente *et al.*, 2019), perpetuando o ciclo de transmissão da doença.

Figura 1 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: a autora.

Para a detecção da fase aguda da doença, existem dois possíveis testes amplamente utilizados: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) e microscopia eletrônica. Na fase crônica da infecção, a detecção parasitária por ambos os testes apresenta limitações significativas, uma vez que a carga parasitária é consideravelmente reduzida. Desse modo, os métodos diagnósticos para *Trypanosoma cruzi* nessa fase baseiam-se predominantemente na detecção de anticorpos específicos.

Para o tratamento, atualmente, apenas dois medicamentos estão disponíveis: benzonidazol (BNZ) e nifurtimox (NFX) (Kann *et al.*, 2024). Cerca de 30% dos pacientes do BNZ apresentam reações adversas, como dermatites por hipersensibilidade, polineurite e

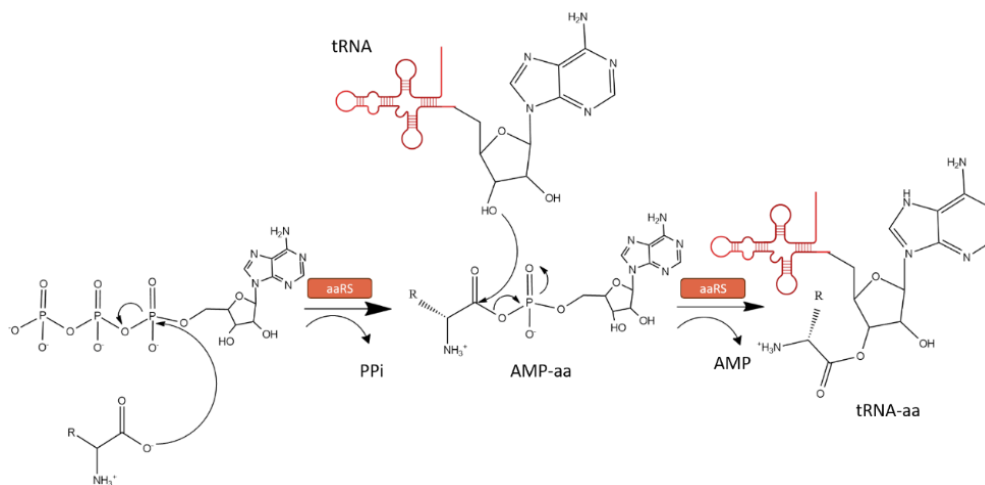
depressão da medula óssea (De Pontes *et al.*, 2010), e ambos os tratamentos são demorados, durando cerca de 60 a 90 dias, com maior eficácia na fase aguda da doença. Apesar dos múltiplos efeitos adversos associados ao tratamento com BNZ e NFX, esses fármacos permanecem como a abordagem terapêutica mais eficaz disponível. Ademais, a escassez de estudos pré-clínicos voltados para novos alvos terapêuticos reforça a necessidade de estratégias inovadoras para o desenvolvimento de alternativas mais seguras e eficazes.

3.2 AMINOACIL-tRNA SINTETASES

Alvos bem validados para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários compreendem a família de enzimas aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) (E.C 6.1.1) (Kalidas *et al.*, 2014), que catalisam o processo de aminoacilação, ligando o aminoácido com seu tRNA cognato (Pham *et al.*, 2014). As aaRS são enzimas fundamentais no processo de síntese de proteínas, uma vez que são elas que garantem a fidelidade do processo de tradução de ácidos nucleicos para aminoácido (Pham *et al.*, 2014). A precisão do mecanismo de ação das aaRS é influenciada por diversos fatores, incluindo a estereoespecificidade dessas enzimas em relação aos seus aminoácidos e tRNAs correspondentes, bem como sua capacidade de revisão, que corrigem aminoácidos incorretamente incorporados (Nasim e Qureshi, 2023). Portanto, uma vez que a ação das aaRSs é interrompida, o processo de síntese de proteínas também é afetado, o que pode impedir a reprodução do patógeno e, então, combater a doença.

O processo de aminoacilação ocorre em duas etapas (Figura 2): na primeira, denominada ativação dos aminoácido, há a formação de um intermediário aminoacil-adenilato (AMP-aa), gerado pela ligação entre a molécula de ATP e o aminoácido correspondente no sítio catalítico da enzima, tendo como subproduto da reação um pirofosfato inorgânico (PPi). Na segunda etapa, o aminoácido é transferido para o grupo 2' ou 3'-hidroxila da porção ribose da adenosina 3'-terminal do tRNA, formando um aminoacil-tRNA - o tRNA ativado - e liberando como subproduto o AMP (Ganesh; Maerkl, 2022; Gomez; IBba, 2020; Kalidas *et al.*, 2014).

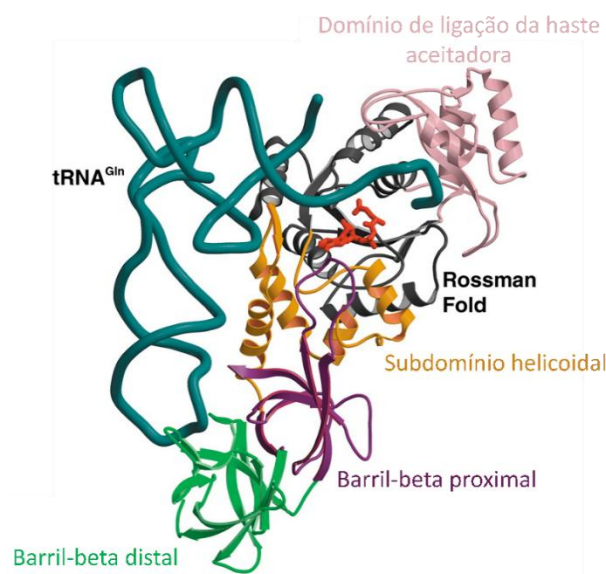
Figura 2 - Processo de aminoacilação catalisada pela aaRS (na imagem, o aminoácido é transferido para o grupo 2'-hidroxila da porção ribose, típico de uma aaRS da classe II).



Fonte: a autora.

As aaRS são divididas em duas classes, e posteriores subclasses, de acordo com a arquitetura do seu sítio ativo. A classe I geralmente é monomérica e corresponde a um *Rossmann fold* (RF) catalítico (Figura 3), que consiste em cinco β -fitas paralelas conectadas por α -hélices, com o sítio ativo localizado geralmente no terminal amino da proteína (Kwon *et al.* (2019). A classe I contém dois motivos que são altamente conservados no RF, HIGH (His-Ile-Gly-His) e KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser), que são separados pelo domínio denominado peptídeo conjuntivo I (CPI), que está inserido no RF (Gomez; IBba (2020). O motivo HIGH está presente na primeira α -hélice do RF, próximo ao terminal amino, sendo responsável por posicionar corretamente a adenina da molécula de ATP e interagir com os fosfatos, enquanto o KMSKS é encontrado na quinta β -fita, próximo ao terminal carboxila do RF, sendo responsável por estabilizar o estado de transição da etapa de aminoacilação (Kwon; Fox; Kim, 2019; Newberry; Hou; Perona, 2002).

Figura 3 - Estrutura de uma GlnRS.

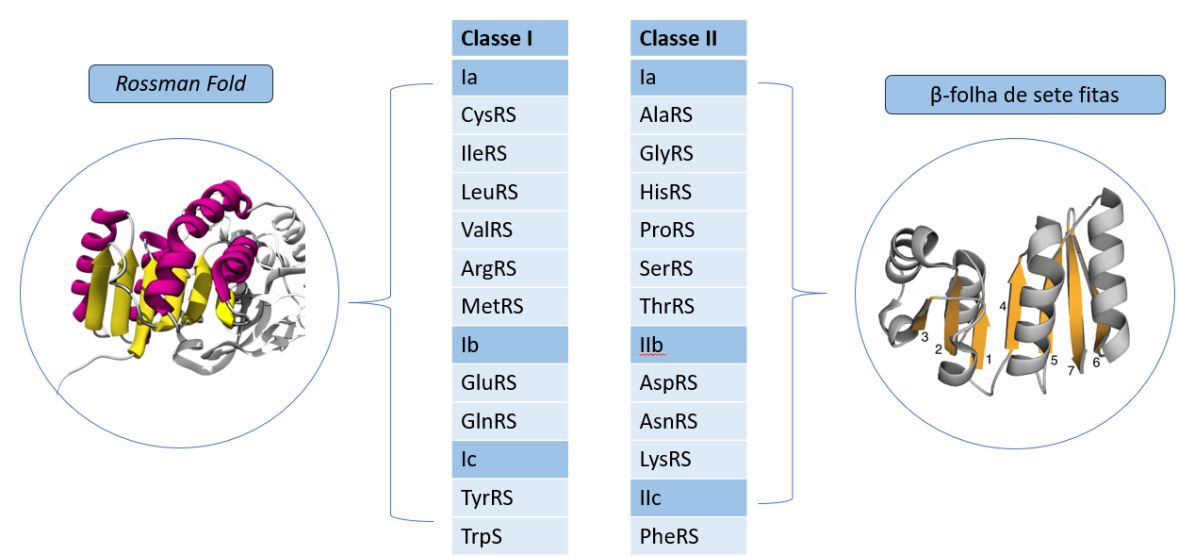


Fonte: adaptado de Sherlin e Perona (2003).

A classe II é caracterizada por apresentar estruturas quaternárias diméricas ou multiméricas, com o sítio ativo organizado como β -folha de sete fitas, ladeadas por α -hélices e possuindo três motivos conservados, embora a conservação se apresente menor do que os motivos das aaRS de classe I (Kwon, Fox e Kim, 2019). O motivo 1 é formado por uma α -hélice seguida de uma β -fita que termina em uma prolina envolvida na formação da interface dimérica. Os motivos 2 e 3 consistem em duas β -fitas conectadas por um *loop*, de modo que no motivo 3 as β -fitas são seguidas de uma α -hélice, formando sítios de ligação para o ATP e para os aminoácidos (Kushwaha; Capalash, 2022; Pang; Weeks; Van Aerschot, 2021; Perona; Hadd, 2012).

Com base nas tendências em reconhecer os aminoácidos quimicamente relacionados, as classes I e II podem ser divididas em subclasses (Figura 6), *a*, *b* e *c*, onde os membros de cada subclasse alinham-se entre si. As subclasses Ia e IIa apresentam aaRS que correspondem a aminoácidos majoritariamente apolares e alifáticos, já nas subclasses Ib e IIb correspondem a aminoácidos carregados, como Glu e Gln na classe Ib e Asp e Asn na classe IIb. Por fim, a subclasse c representa os aminoácidos aromáticos, Ic para Tyr e Trp enquanto IIc para Phe (Schimmel, 2008).

Figura 4 - Classes e subclasses das aaRS baseadas em seu domínio catalítico.



Fonte: a autora.

Além disso, as classes também apresentam características distintas em relação ao modo de ligação com o substrato. As aaRS da classe I catalisam a reação de aminoacilação diretamente no grupo 2'-OH da adenosina do tRNA, enquanto as enzimas da classe II, com exceção da PheRS, realizam a aminoacilação na porção 3'-OH da adenosina (Perona; Hadd, 2012).

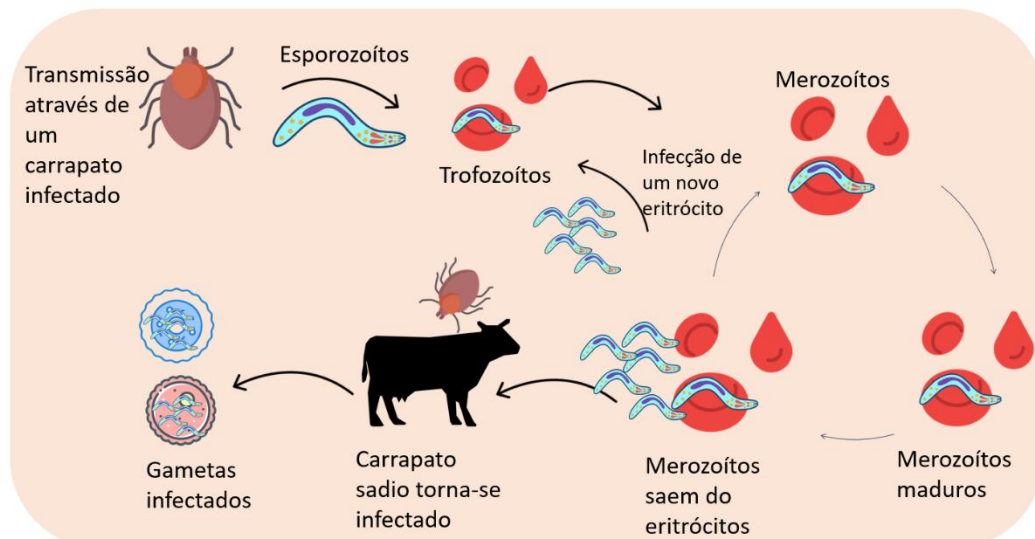
3.3 BABESIOSE BOVINA

As espécies de *Babesia* sp podem ser classificadas como protozoários hemoparasitas apicomplexanos transmitidos por carrapatos, sendo uma doença global que afeta hospedeiros vertebrados, na maioria mamíferos como humanos, morcegos, bovinos e cavalos (Ozubek *et al.*, 2020).

Sua propagação se dá através de ciclos de reprodução assexuada e sexuada; ocorre uma reprodução assexuada nos eritrócitos, a reprodução sexuada no intestino médio do carrapato e outra reprodução assexuada nas glândulas salivares do carrapato (Hakimi e Verocai, 2023). Além disso, conforme representado na Figura 5, os parasitas deste gênero desenvolveram novas estratégias de disseminação, como a transmissão transovariana, onde os

carrapatos fêmeas infectados produzem descendentes infectados, ampliando a propagação da doença (Jalovecka *et al.*, 2019).

Figura 5 - Ciclo de reprodução do parasita *Babesia* sp.



Fonte: a autora.

De forma mais detalhada, carrapatos infectados que se alimentam de sangue bovino inoculam esporozoítos que entram nos eritrócitos, transformando-se em trofozoítos, que são a forma ativa dos protozoários. Os trofozoítos se reproduzem assexuadamente por fissão binária, originando os merozoítos. Com a reprodução contínua, os eritrócitos rompem-se, liberando os merozoítos na circulação, que infectam outras hemácias, ampliando a infecção que infectará novos carrapatos sadios quando estes se alimentarem deste sangue.

No interior do carrapato que se alimentou de um hospedeiro infectado, os eritrócitos liberam protozoários em seus estágios sexuais no lúmen intestinal, onde se transformam em gametócitos. Os gametócitos por sua vez se diferenciam em gametas masculinos e femininos, que se unem para formar um zigoto. Este zigoto evolui para um estágio infeccioso, invadindo as células intestinais do carrapato. Nas células, surgem corpos de fissão que originam cinetes móveis. Estes cinetes destroem as células do intestino, escapam para a hemolinfa e se espalham por diversas células e tecidos, incluindo os ovários. Ante essa infecção, possibilita-se a transmissão transovariana. Desse modo, quando a fêmea coloca seus ovos, os embriões já estão contaminados. As larvas infectadas, ao eclodirem, se prendem a bovinos, e os cinetes migram para as glândulas salivares do carrapato, onde formam um esporoblasto. Cada esporoblasto gera milhares de esporozoítos. Finalmente, as larvas de carrapatos se alimentam

do sangue do bovino, liberando os esporozoítos junto com a saliva no sistema circulatório do animal, continuando o ciclo do parasita (Mosqueda *et al.*, 2012).

A babesiose bovina é considerada a segunda doença parasitária hemoprotozoária mais comum. É causada por algumas espécies de protozoários como: *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major*, *B. occultans* e *B. argentina*, sendo que a *B. bigemina* é a mais comum e a *B. bovis* a mais patogênica (Jacob *et al.*, 2020). Estas duas podem ser encontrados em regiões de clima tropical e subtropical, sendo distribuídas na África, Ásia, Austrália, Sul da Europa, América do Sul e América Central, com seu principal vetor sendo os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (Jacob *et al.*, 2022).

Efeitos da infecção em bovinos infectados por *B. bovis* incluem infertilidade, aborto, prostração, destacando-se a febre e anemia hemolítica. Além disso, *Babesia bovis* demonstra habilidade notável de escapar do sistema imunológico de bovinos. Isso acontece através da expressão de proteínas especializadas que estimulam a citoadesão das hemácias infectadas aos capilares, especialmente em órgãos como o cérebro, o que impede as hemácias infectadas de serem metabolizadas pelo baço. Esse fenômeno favorece o surgimento de sintomas neurológicos e falência multiorgânica, indicando um aumento considerável na virulência deste protozoário (Ozubek *et al.*, 2020). Em conjunto, todos os mecanismos infectantes de *B. bovis* levam a uma morte rápida do bovino durante a fase aguda da doença (Florin-Christensen *et al.*, 2014).

Em muitos países, a pecuária é um setor fundamental para a economia, que é prejudicada quando os rebanhos são acometidos por doenças, principalmente parasitárias, como a babesiose bovina. No México, estima-se que 75% dos rebanhos correm risco de serem infectados com babesiose (Pérez de Leon *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2020; Esteve-Gasent *et al.*, 2020), o que se tornaria um agravante econômico já que dados indicam que em 2019 os Estados Unidos importaram cerca de 1,3 milhões de bovinos vivos do México (Esteve-Gasent *et al.*, 2020). Singh e colaboradores (2022) mostram o impacto de carrapatos na produção de laticínios indianos e indicam que a prevalência de babesiose no gado é de 4%. Em sua estimativa em relação ao impacto econômico, a perda anual da produção de leite foi de 7,01 L por vaca mestiça infectada por carrapatos do gênero *Rhipicephalus*. Além disso, também foi estimada a perda da produção de leite devido a babesiose, especificamente, que foi estimada em 30,96 L por vaca lactante anualmente.

Para a detecção de parasitas nas hemácias bovinas podem ser realizados testes a fim de ver os protozoários microscopicamente, geralmente durante a fase aguda da doença, onde a reprodução de *Babesia* sp. ocorre mais rapidamente. Porém, hoje em dia, tais testes geralmente não são aplicados à babesiose bovina, pois as hemácias infectadas são difíceis de encontrar em esfregaços de sangue corados, ou seja, este tipo de teste geralmente é pouco sensível, pouco confiável e de valor limitado (Ozubek *et al.*, 2020). Outros testes que podem ser utilizados, no caso para investigar a exposição de bovinos a *Babesia* ou a transferência passiva de anticorpos pelo colostro em bezerros, são os ensaios sorológicos, como o Teste de Imunofluorescência Indireta (*Indirect Immunofluorescence Test*, RIFI), o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) e o Teste de Imunocromatografia (*Immunochromatography Test*, ICT), pois fornecem informações sobre a resposta imune humoral (Alvarez; Rojas; Figueroa, 2019). Embora sejam testes mais precisos que o esfregaço sanguíneo, ainda são procedimentos demorados e difíceis de realizar, desse modo, para obter maior confiabilidade e rapidez nos resultados, geralmente opta-se pela técnica PCR, que é um método altamente sensível e específico quando comparado a outras técnicas (Amorim *et al.*, 2014).

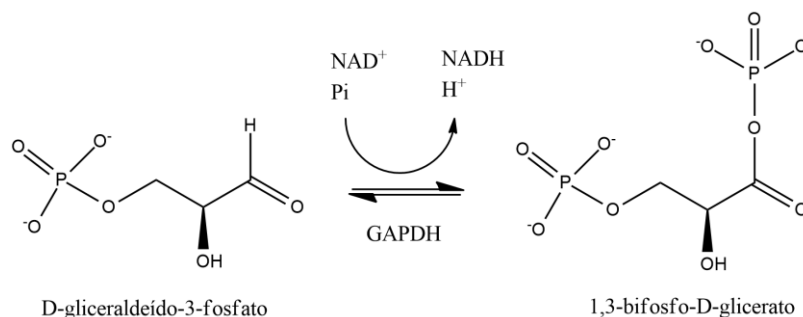
Visto que países grandes exportadores de gado, como o Brasil, são afetados por infecções causadas pela babesiose bovina, torna-se uma questão de saúde pública o controle dessa doença. Além da utilização de métodos específicos para sua detecção, a interrupção do ciclo de vida do parasita é importante, e ainda mais eficiente, pois devido à propagação transovariana, a infecção pode se perpetuar até a morte do animal. Deste modo, a busca pelo conhecimento de novos alvos possivelmente inibidores do ciclo de vida parasitário de *Babesia bovis* deve ser ampliada, como enzimas que desempenham papéis-chave, como por exemplo, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, envolvida diretamente na produção de energia para sobrevivência destes seres vivos.

3.4 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (E.C 1.2.1.12) desempenha papel fundamental na etapa de produção de energia no metabolismo dos carboidratos na via glicolítica. Conforme mostrado na Figura 6, a enzima realiza fosforilação oxidativa reversível da molécula gliceraldeído-3-fosfato ao produto 1,3-bisfosfo-D-glicerato, em presença de

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), que recebe os elétrons, e fosfato inorgânico (Pi) (Perez-Casal e Potter, 2016).

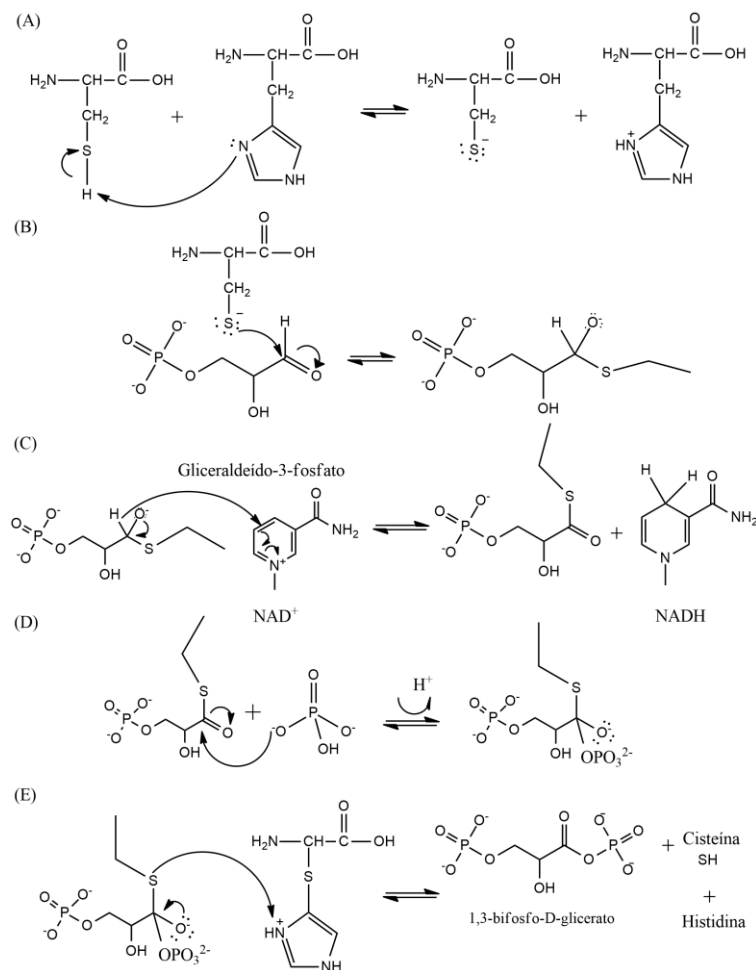
Figura 6 - Processo de catálise realizada pela GAPDH.



Fonte: a autora.

Seu mecanismo de reação pode ser descrito pela ativação da cisteína catalítica através do ataque nucleofílico de uma histidina (etapa A), seguido do ataque nucleofílico da, então, cisteína ativada no carbono carbonílico da gliceraldeído-3-fosfato (etapa B), seguido da transferência do hidreto da molécula tiohemiacetal para o NAD^+ , que é prontamente reduzido, além da formação de uma molécula tioacilada (etapa C). Além disso, ocorre a fosforilação do tioéster formado, que acontece pelo ataque nucleofílico do fosfato inorgânico na carbonila do grupo tioacilado (etapa D), levando à formação do 1,3-bifosfo-D-glicerato, juntamente com a regeneração da cisteína e histidina catalíticas (etapa E) (Castilho *et al.*, 2003). O mecanismo pode ser observado na Figura 4.

Figura 7 - Mecanismo da reação da formação do 1,3-bifosfo-D-glicerato catalisado pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.



Fonte: a autora.

A enzima é geralmente encontrada no citoplasma celular, existindo como um tetrâmero, onde cada monômero possui um peso de aproximadamente 37 kDa e um grupo tiol catalítico. Para além da sua função na via glicolítica, já foi comprovada sua atuação em diversas outras funções metabólicas, como reparo do DNA (Meyer-Siegler *et al.*, 1991), reconhecimento estrutural e sequencial de tRNA (Singh e Green, 1993), tráfego de membrana (Glaser e Gross, 1995) e apoptose celular (Hara *et al.*, 2005; Ishitani; Chuang, 1996).

Alguns inibidores de GAPDH bem consolidados e estudados são o ácido konínico (KA) e o 3-bromopiruvato (3-BrPA); o primeiro mostra-se inibir a via glicolítica e, consequentemente, reduzindo a produção de ATP (Li *et al.*, 2020), enquanto o segundo é um análogo do piruvato, que atua alquilando tióis. No entanto, muitas enzimas importantes para o organismo possuem e necessitam de grupos tióis, fazendo com que a inespecificidade deste inibidor venha a causar efeitos colaterais desagradáveis (Shoshan, 2012). Além disso, outros

compostos foram testados, como os relatados por Castilho e colaboradores (2003) em que inibidores análogos ao gliceraldeído 3-fosfato inibiram irreversivelmente a ação enzimática da GAPDH glicossômica de *Trypanosoma cruzi*.

Portanto, a escolha da GAPDH como alvo estratégico contra *Babesia bovis* se justifica não apenas por sua função central no metabolismo energético, mas também pelo seu potencial como plataforma para o desenvolvimento de inibidores seletivos capazes de comprometer a viabilidade do parasita. Nesse contexto, a elucidação da estrutura tridimensional da GAPDH de *B. bovis* torna-se fundamental, uma vez que permite a caracterização detalhada do sítio ativo e de regiões estruturais específicas que podem ser exploradas para o desenho racional de compostos com maior afinidade e seletividade pelo alvo parasitário. A inibição dessa enzima pode resultar em um bloqueio efetivo da multiplicação do protozoário, oferecendo perspectivas promissoras para novas abordagens terapêuticas contra a babesiose bovina, uma doença de difícil controle e de elevado impacto econômico no setor pecuário.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SOLUÇÕES

- Solução de azul de *Comassie*: 10% (*V/V*) ácido acético glacial (99,8% Neon), 0,25% (*m/V*) azul de *Comassie* R-250 (Vetec) e 45% (*V/V*) álcool metílico (99,8% Alphatec);
- Solução descorante: 10% (*V/V*) ácido acético glacial (99,8% Neon) e 45% (*V/V*) álcool metílico (99,8% Alphatec);
- Solução de Bradford: 1% (*m/V*) azul de *Comassie* G-250 (Acros Organics), 4,5% (*V/V*) álcool etílico (99,8% Neon), 8,5% (*V/V*) ácido ortofosfórico (85% Carlo Erba);
- Tampão de amostra 2×: 125 mmol L⁻¹ Tris-HCl (InLab, Biotec) pH 6,8, 4% dodecil sulfato de sódio (SDS; InLab), 20% (*V/V*) glicerol (Alphatec 99,8%), 2% azul de bromofenol (Nuclear), 5% β- mercaptoetanol;
- Tampão de ligação para cromatografia de afinidade: 500 mmol L⁻¹ NaCl (Reatec), 20 mmol L⁻¹ ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico (HEPES; FisherBiotech), 5% (*V/V*) glicerol;
- Tampão de eluição para cromatografia de afinidade: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 5% (*V/V*) glicerol e 500 mmol L⁻¹ imidazol (InLab);
- Tampão de ligação para cromatografia por exclusão de tamanho: HEPES 20 mmol L⁻¹ pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 2% (*V/V*) glicerol;
- Tampão de corrida de eletroforese: 0,20 mol L⁻¹ glicina (Dinâmica), 25 mmol L⁻¹ TRIS, 1% (*m/V*) SDS;
- Meio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido: 10 g L⁻¹ triptona (Acumedia), 5 g L⁻¹ extrato de levedura (Neogem) e 10 g L⁻¹ NaCl;
- Meio de cultivo Luria-Bertani (LB) sólido: 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ extrato de levedura, 10 g L⁻¹ NaCl e 15 g L⁻¹ Ágar (Vetec);
- Solução de transformação e armazenamento (TSS): 6% (*m/V*) PEG 8000 (Sigma-Aldrich), 3% (*V/V*) dimetilsulfóxido (DMSO; Biotec), 6 mmol L⁻¹ MgSO₄.7H₂O (Vetec), 6 mmol L⁻¹ MgCl₂.6H₂O (Vetec) dissolvidos em 50 mL de meio LB líquido;

- Solução KCM 5×: 0,5 mol L⁻¹ KCl, 0,15 mol L⁻¹ CaCl₂ e 0,25 mol L⁻¹ MgCl₂;
- Antibióticos: 34 µg mL⁻¹ cloranfenicol (Sigma-Aldrich) e 100 µg mL⁻¹ ampicilina (InLab);
- Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo: solução estoque 1 mol L⁻¹;
- Meio de autoindução ZYP-5052: 1% (m/V) triptona, 0,5% (m/V) extrato de levedura, 50 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ (Química Fina LTDA), 50 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ (Química Fina LTDA), 25 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ (Vetec), 25 mmol L⁻¹ MgSO₄.6H₂O, 0,5% (V/V), glicerina, 0,05% (m/V) glicose (Merck), 0,2% (m/V) D-lactose (Neon);
- Acrilamida-bis 40%: 40 g acrilamida (Dinâmica) e 1,6 g bis-acrilamida (Sigma-Aldrich) dissolvidos em 100 mL de água destilada.

4.2 RECUPERAÇÃO DO PLASMÍDEO

Os três genes trabalhados estão contidos no vetor AVA0421, que contém um promotor T7 seguido de uma sequência para expressar hexahistidina (6 His-tag) para afinidade a íons níquel na extremidade N-terminal e de um sítio de reconhecimento pela protease 3C do rinovírus humano (HRV-3C) modificado (Choi *et al.*, 2011), bem como dois sítios de restrição usados para clonagem independente de ligação (Aslanidis e Jong, de, 1990). Todos os genes foram recebidos do *Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease* (SSGCID) impregnado em papel de filtro. O procedimento de extração consistiu em excisar aproximadamente ¼ da porção em que os plasmídeos foram impregnados e adicionar 50 µL de água ultrapura a esta porção. Aguardaram-se 20 min para a extração do plasmídeo pela água. Por fim, a amostra foi centrifugada por 40 s a 20000 × g para separar a solução do papel excisado.

4.3 PREPARO DAS CÉLULAS QUIMICOMPETENTES

Bactérias *Escherichia coli* da cepa Rosetta BL21(DE3)pLysS foram inoculadas a partir do estoque em glicerol na proporção 1:1000 em meio LB, suplementadas com cloranfenicol 34 µg mL⁻¹ e cultivadas por 18 h em 37 °C e 150 rpm. Uma alíquota de 250 µL foi tomada para inocular 25 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol 34 µg mL⁻¹. Esta cultura foi

mantida sob agitação constante a 180 rpm e 37 °C até que a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) obtivesse um valor entre 0,3-0,5. Atingido o valor, o meio foi centrifugado por 5 min a $3885 \times g$ e a 4 °C. A porção sobrenadante foi descartada, enquanto o *pellet* foi ressuspensão em solução de TSS na proporção de 5% em relação ao volume de meio utilizado, daí então incubado por 10 min no gelo e acrescido de glicerol resfriado na proporção de 10% do volume final.

4.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A um microtubo foram adicionados 7 μL de água ultrapura, 2 μL da solução KCM (0,5 mol L^{-1} KCl, 0,15 mol L^{-1} CaCl_2 e 0,25 mol L^{-1} MgCl_2) e 2 μL do plasmídeo, que foram incubados por 5 min em banho de gelo. Findo o tempo, a esta mistura foram adicionados 10 μL de células quimiocompetentes e incubadas em gelo por mais 20 min. Após esse tempo, a amostra foi submetida a choque térmico em banho-maria a 46 °C por 30 s, seguido de incubação em banho de gelo por mais 40 s e, então, acrescida de 200 μL de meio LB. O meio foi mantido sob agitação por 1 h a 180 rpm e a 37 °C. Posteriormente, uma alíquota de 50 μL foi plaqueada em meio LB sólido suplementado com 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina e deixada *overnight* a 37 °C para o crescimento. Duas colônias isoladas foram tomadas separadamente para inoculação em meio LB suplementados com os antibióticos necessários e mantidas sob crescimento a 180 rpm 37 °C até que a DO_{600} atingisse um valor entre 0,3-0,5. Após o valor atingido, uma alíquota de 1 mL foi centrifugada por 3 min a $3000 \times g$, o sobrenadante foi descartado ao *pellet* foram adicionados mais 500 μL do inóculo e 500 μL de glicerol 50% (V/V); armazenou-se a -86 °C.

4.5 EXPRESSÃO PROTEICA

Um pré-inóculo acrescido de 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina foi cultivado por 18 h a 37 °C e agitação a 180 rpm. Para os testes de expressão, uma alíquota, na proporção de 1:100, foi adicionada à 25 mL de meio autoindutor ZYP-5052 (Studier, 2005) ou 25 mL de meio LB líquido, suplementados novamente com os antibióticos necessários. O crescimento em meio LB foi monitorado até a DO_{600} de 0,5-0,7, em que se procedeu a adição

de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) nas concentrações finais de 0,1, 0,5 e 1,0 mmol L⁻¹. Já o meio de autoindução não teve acompanhamento de DO₆₀₀. Ambos os ensaios foram mantidos sob agitação a 180 rpm a 37 °C, por 24 h o último, e por 4 h o primeiro. Findados os tempos, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3885 $\times$ g e a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 15 mL de tampão de ligação de cromatografia (20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 5% (V/V) glicerol) e 100 μ L de inibidor de protease (Sigma Aldrich - P8465). Essas soluções foram submetidas a sonicação em banho de gelo por 30 min (ciclos de 1 minuto com 30 s ligado e 30 s de intervalo). Após o rompimento celular, as amostras foram centrifugadas a 20000 $\times$ g por 30 min a 4 °C. A expressão foi confirmada em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Todas as proteínas trabalhadas possuem marcação His-tag, o que possibilita a posterior purificação por afinidade a íons.

4.6 PURIFICAÇÃO

A fração solúvel foi submetida a uma primeira purificação em um cromatógrafo Äkta Purifier (Healthcare GE Life Sciences) com uma coluna de íons Ni²⁺ de 5 mL (HisTrap HP - GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão de ligação em pH 7,5. A eluição da amostra ocorreu em um gradiente de imidazol (0 - 500 mmol L⁻¹) adicionado ao tampão. Para a *BbGAPDH*, as frações foram reunidas e concentradas até 5 mL em um dispositivo Vivaspin com membrana de corte de 10 kDa, enquanto para *TcValRS* a amostra foi concentrada até 1 mL. As amostras concentradas foram submetidas a uma segunda etapa de purificação utilizando a cromatografia por exclusão de tamanho. A *BbGAPDH* em 75 mL de resina (Superdex 200 - GE Healthcare Life Sciences) e a *TcValRS* em 25 mL de resina (Superdex 200 - GE Healthcare Life Sciences). As colunas foram previamente equilibradas com 2 VC de tampão de eluição (20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 2% (V/V) glicerol) e as frações eluídas no mesmo tampão. Em qualquer cromatografia, as frações coletadas foram de 1 mL. As *TcLeuRS*, *TcValRS* e *BbGAPDH* foram submetidas a cromatografias em tampão pH 7,5, que é aproximadamente uma unidade de pH acima dos seus respectivos pontos isoelétricos, 6,61, 6,38 e 6,60, respectivamente, como estimados pelo servidor ProtParam (Wilkins *et al.*, 1999).

4.7 CLIVAGEM DA HIS-TAG

A clivagem da proteína foi feita no Laboratório Nacional de Biociências do Brasil (LNBio). Após a purificação com íons Ni^{2+} a amostra proteica foi incubada com 3 mg da Protease *PreScission* e dialisada *overnight* a 4 °C em tampão 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl e 2% (V/V) glicerol em membrana de corte de 3 kDa. A amostra dialisada foi submetida a uma nova purificação com coluna de íons Ni^{2+} para remoção da His-tag e proteínas não clivadas, seguida imediatamente da purificação com uma coluna GStrap FF de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) para remoção da protease (colunas acopladas). Após essa etapa de purificação, a amostra foi concentrada e submetida a purificação por exclusão de tamanho conforme descrito no item 4.6.

4.8 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

A expressão e purificação proteica foram avaliadas em SDS-PAGE, método adaptado de Sambrook e Russel (2001). Aliquotas da amostra foram diluídas em tampão de amostra (125 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 4%(m/V) dodecil sulfato de sódio, 20% (V/V) glicerol, 2%(m/V) azul de bromofenol, 5%(V/V) β-mercaptoetanol) na proporção 1:1 e posteriormente desnaturadas por aquecimento a 98 °C durante 10 min. A eletroforese foi conduzida sob tensão de 160 V por cerca de 1 h. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de 10% (V/V) ácido acético glacial, 0,25% (m/V) azul de Coomassie R-250 e 45% (V/V) de álcool metílico por 15 min e descorado em 10% (V/V) ácido acético glacial e 45% (V/V) álcool metílico.

4.9 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

A *BbGAPDH* com cauda estava em solução 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 5% (V/V) glicerol e 500 mmol L⁻¹ imidazol, enquanto a *BbGAPDH* sem cauda estava em 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 2% (V/V) glicerol em concentrações que variaram entre 8 e 20 mg mL⁻¹ como quantificadas pelo método de Bradford (1976). Os ensaios de cristalização foram conduzidos de duas formas:

- i) Manual, pelo método de difusão de vapor de gota suspensa (McPherson e Gavira, 2014), na câmara de cristalização da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para os testes foram utilizados kits comerciais de cristalização de composições diversas de agentes precipitantes: JBScreen Pentaerythritol e Pi-Screen da Jena Bioscience e Morpheus, Structure Screen, Clear Strategy Screen, MIDAS e JCSG+ Suite da Molecular Dimensions®. Os ensaios foram conduzidos variando-se os volumes de soluções de proteína e de agentes precipitantes nas gotas, tal que a proporção final fosse de 1:1 ou 1:2. Além disso, o poço foi preenchido com 500 μL da solução precipitante. Ao final dos testes, as placas com os ensaios foram mantidas a 10 °C e 18 °C na câmara de cristalização. Inspeccionou-se rotineiramente a formação de cristais de proteína.
- ii) Automatizada, no robô Mosquito no LNBio, utilizando-se os kits comerciais de cristalização Crystal Screen HT e SaltRx HT (Hampton Research) e Wizard Classic 1 & 2, PACT premier Eco Screen, JCSG-plus Eco Screen e SG1 Eco Screen (Molecular Dimensions). As gotas (1,2 μL) continham 0,6 μL de solução proteica e 0,6 μL de agente precipitante. Cada ensaio usou a proteína na presença de seu cofator NAD^+ na proporção molar 1:1. As placas foram armazenados a 4 °C e a 18 °C e foram inspecionadas para cristais de acordo com o protocolo estabelecido pelo LNBio pelo analisador de imagens Rock Imager 1000 (Formulatrix). No total, foram testadas 576 soluções de agentes precipitantes para cada temperatura.

4.10 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS) E NANO-FLUORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (NanoDSF)

Todas as análises foram realizadas no LNBio com a proteína a 9 mg mL^{-1} em 20 mmol L^{-1} HEPES pH 7,5, 150 mmol L^{-1} NaCl e 2%(V/V) glicerol, solução previamente centrifugada por 10 min a $20000 \times g$.

A análise por DLS foi realizada em um aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) a temperatura ambiente. Já a análise de nanoDSF foi realizada em um aparelho Tycho NT.6 (Nanotemper), com 10 μL da solução da proteína no capilar. A temperatura foi variada entre 35 e 95 °C com intervalos de 1,5 °C e as intensidades de emissão por fluorescência dos

resíduos de aminoácido triptofano foram registradas nos comprimentos de onda 330 nm e 350 nm. A razão entre os valores de fluorescência nesses comprimentos de onda (A_{350}/A_{330}) foi computada automaticamente e apresentada em gráfico em função da temperatura.

4.11 COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DOS CRISTAIS DA *BbGAPDH*

Os dados de difração de raios X foram coletados no comprimento de onda de 0,9772 Å a 100 K usando a fonte de radiação síncrotron (Sirius) na estação Manacá (CNPEM - LNLS), localizada em Campinas, Estado de São Paulo. Os cristais foram montados em *cryoloops* em bases SPINE de 18 mm e imediatamente transferidos para *unipucks* imersos em nitrogênio líquido. Os discos foram transferidos para o braço robótico de 6 eixos TX60 (Stäubli), que finalmente conduziu os cristais até o feixe de raios X. Um total de 3600 imagens de difração com rotação de 0,1° foram adquiridas para uma região específica de boa difração, escolhida após varredura, do cristal com melhor difração.

4.12 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

4.12.1 Determinação Da Estrutura Cristalográfica Por Difração De Raios X

4.12.1.1 Processamento das imagens de difração

Os procedimentos de indexação e integração foram realizados com o programa DIALS (Beilsten-Edmands *et al.*, 2020), enquanto o escalonamento foi realizado com o programa aimless do pacote CCP4 (Winn *et al.*, 2011).

A correção de anisotropia foi realizada pelo programa STARANISO (STARANISO anisotropy & Bayesian estimation server., [S.d.]). Após esse procedimento, a ferramenta xtriage do programa PHENIX (Adams *et al.*, 2011) foi usada para identificar eventuais patologias cristalinas.

4.12.1.2 Atribuição inicial das fases

A sequência de aminoácidos do modelo teórico AlphaFold ID AF-S6C855-F1- (Fleming *et al.*, 2025) e da *Bb*GAPDH foram alinhadas utilizando-se o software *TCoffee* (Notredame, Higgins e Heringa, 2000) e este alinhamento foi utilizado como entrada para o programa CHAINSAW (Stein, 2008), cujo arquivo gerado foi submetido ao processo de faseamento por substituição molecular pelo programa PHASER (McCoy *et al.*, 2007).

4.12.1.3 Modelagem e refinamento

O modelo inicial da *Bb*GAPDH obtido por substituição molecular teve manualmente o ajuste de regiões e melhoria de posicionamento dos átomos na densidade eletrônica em um procedimento iterativo de ciclos de refinamento no espaço recíproco e no espaço real com os programas phenix.refine (Liebschner *et al.*, 2019) e COOT (Emsley e Cowtan, 2004), respectivamente. Os mapas empregados para visualização foram Fourier diferença mF_o-DF_c (Read, 1986) e densidade eletrônica $2mF_o-DF_c$ (Main, 1979).

4.12.1.4 Validação do modelo

Os programas usados para a validação da estrutura foram: Molprobity (Chen *et al.*, 2010), ValidationPDB (Westbrook *et al.*, 2003) e Procheck (Laskowski *et al.*, 1993). Para a avaliação do ajuste do modelo à densidade eletrônica, foi utilizado o programa edstats (Tickle, 2012a) do pacote CCP4 (Winn *et al.*, 2011).

4.12.2 Alinhamento da sequência de aminoácidos da *bbgapdh* e análise de resíduos conservados

Homólogas com estruturas tridimensionais já determinadas foram identificadas pelo servidor *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Suas sequências foram submetidas ao programa *TCoffee* (Notredame, Higgins e Heringa, 2000), que forneceu um alinhamento que foi, posteriormente, submetido ao servidor SCORECONS (Valdar, 2002) a fim de identificar resíduos incomuns ou exclusivos presentes na *BbGAPDH*. Para representação parcial deste alinhamento, foram selecionadas GAPDH's com alto percentual de identidade de diferentes organismos representativos, que foram, então, realinhadas e apresentadas com uso do programa ALINE (Bond; Schüttelkopf, 2009), colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (Barton, 1993). Os elementos de estrutura secundária foram produzidos pelo programa DSSP (Kabsch e Sander, 1983).

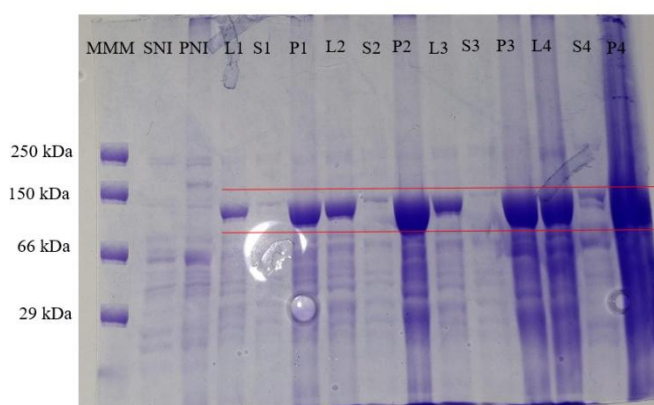
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LEUCIL-tRNA SINTETASE (*TcLeuRS*)

5.1.1 Expressão e purificação da *TcLeuRS*

Os testes de indução foram realizados na temperatura de 37 °C, em meio LB e variando-se a concentração de IPTG para 0,1, 0,5 e 1,0 mmol L⁻¹, além da condição utilizando-se meio de autoindução ZYP-5052 (Studier, 2005). A análise do perfil de expressão foi realizada através de SDS-PAGE 10%, onde foi constatado que a condição mais favorável de expressão, isto é, que apresentou maior quantidade de proteínas na fração solúvel, foi o meio autoindutor. No entanto, o meio de autoindução também produziu uma maior quantidade de proteínas inerentes a bactéria que vieram, posteriormente, a afetar a purificação das proteínas-alvo. Desse modo, a fim de diminuir a presença das proteínas bacterianas, decidiu-se utilizar o meio com IPTG na concentração de 0,5 mmol L⁻¹. Nessa condição, constatou-se a proteína-alvo devido a uma banda na posição esperada entre os marcadores de massa molecular 66 e 150 kDa (Figura 8), portanto, compatíveis com os valores de 123 kDa, como fornecidos pelo banco de dados do SSGCID.

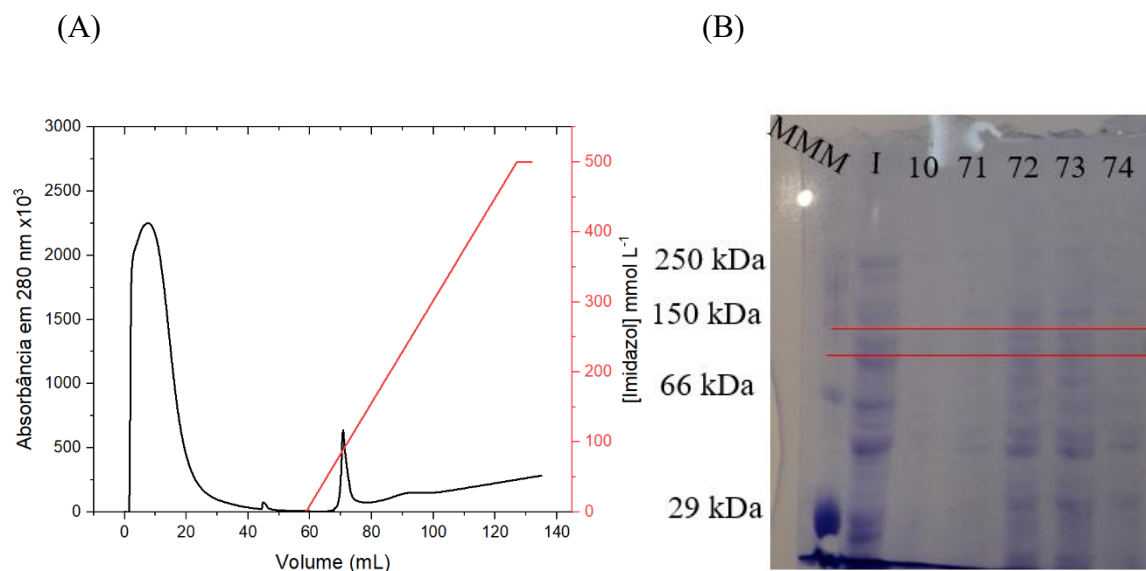
Figura 8 - (A) SDS-PAGE do teste de expressão da *TcLeuRS*. As raias se referem a: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; SNI – Sobrenadante da amostra Não Induzida; PNI – *Pellet* Não Induzido; L1, S1, P1 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (IPTG 0,1 mmol L⁻¹); L2, S2, P2 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (IPTG 0,5 mmol L⁻¹); L3, S3, P3 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (IPTG 1,0 mmol L⁻¹); L4, S4, P4 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* do meio autoinduzido.



Fonte: a autora.

Apesar da pequena quantidade da *TcLeuRS* presentes na fração solúvel, seguiu-se para as etapas de purificação por metal imobilizado utilizando íons Ni^{2+} (Figura 9A). O gel de eletroforese das amostras eluidas pode ser observado na Figura 9B.

Figura 9 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da *TcLeuRS*. (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; I – amostra Injetada; Números - indicam as frações coletadas.



Fonte: a autora.

A análise por SDS-PAGE indica que a proteína não está sendo eluída, apenas as proteínas bacterianas que apresentam afinidade pela resina com níquel. Ademais, as eletroforeses sugerem que as frações de proteínas totais (amostra obtida após lise celular e centrifugação, mas não submetidas à purificação) apresentam níveis reduzidos ou quase nulos de proteínas recombinantes, o que compromete a eficiência da purificação.

Há poucos trabalhos relatados na literatura acerca de expressão, purificação ou cristalização da proteína leucil-tRNA sintetase, de quaisquer organismos. Algumas das condições relatadas incluem o uso de: 1,0 mmol L⁻¹ IPTG em meio LB por 4 h a 37 °C (Yaremchuk *et al.*, 2000), 0,4 mmol L⁻¹ IPTG em meio LB por 4 h a 30 °C, 0,2 mmol L⁻¹ IPTG em meio LB a 22 °C (Hu *et al.*, 2013) e a 16 °C (Palencia *et al.*, 2016). Condições essas testadas neste trabalho, mas sem sucesso. Ademais, abordagens cromatográficas alternativas, como cromatografia de troca iônica (dados não mostrados), foram testadas sem sucesso. Adicionalmente, foram avaliadas múltiplas condições de tampão (HEPES, Tris e fosfato, todos em pH 7,5; CHES em pH 9,0), adição de sais divalentes como MgCl_2 , suplementação com o aminoácido cognato, presença de detergentes não iônicos (Triton X-100), inclusão de imidazol em baixas concentrações no tampão de ligação, além da variação no tempo de

incubação da amostra com a matriz (até 2 horas). Apesar dessas tentativas, o perfil cromatográfico e os resultados de SDS-PAGE permaneceram semelhantes aos mostrados nas Figuras 9.

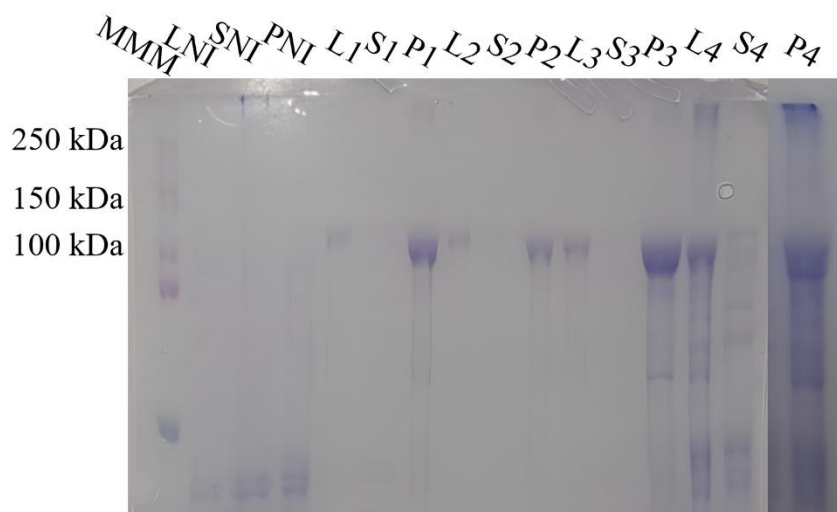
Embora a proteína tenha sido detectada na fração solúvel, apresentou-se em quantidade significativamente inferior quando comparada à quantidade na fração insolúvel. Diante desses resultados, propõe-se a otimização das condições de expressão, com o intuito de incrementar o rendimento da proteína na fração solúvel e, conseqüentemente, viabilizar sua obtenção pura em maiores quantidades.

5.2 VALIL-tRNA SINTETASE (*TcValRS*)

5.2.1 Expressão e purificação da *TcValRS*

Os testes de indução foram realizados na temperatura de 37 °C em meio LB com concentrações de IPTG de 0,1, 0,5 e 1,0 mmol L⁻¹ e em meio de autoindução ZYP-5052 (Studier, 2005). O perfil de expressão foi analisado por SDS-PAGE, que mostrou não haver diferença significativa de expressão da *TcValRS* entre os testes, seja na fração solúvel, de quantidade insignificante, ou na fração insolúvel, superexpressão, evidenciado pelas bandas de massa molecular de aproximadamente 112 kDa (Figura 10).

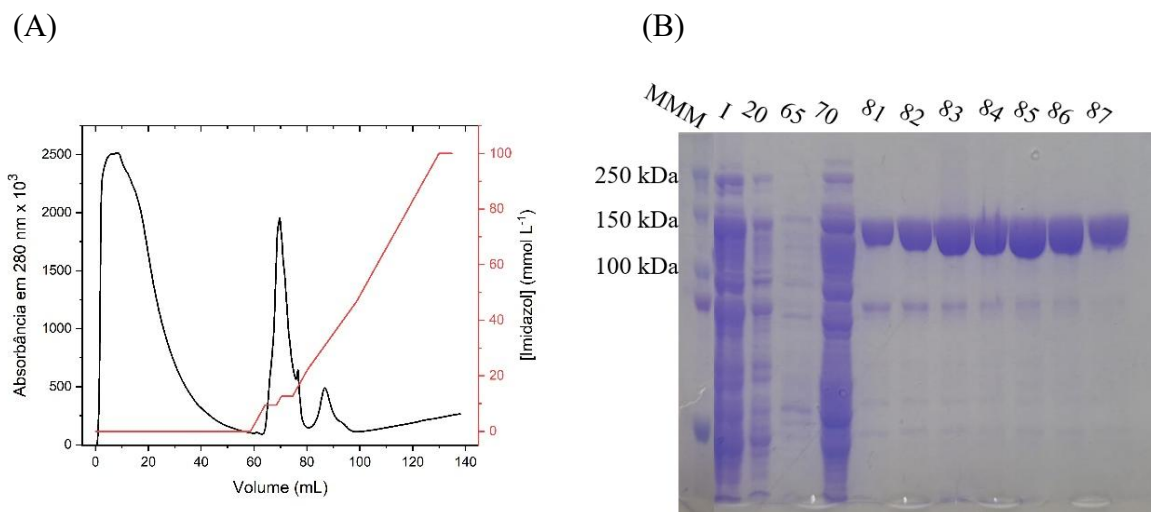
Figura 10 - (A) SDS-PAGE 10% do teste de expressão da TcValRS. As raias se referem a: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; LNI – Lisado da amostra Não Induzida; SNI – Sobrenadante da amostra Não Induzida; PNI – Pellet Não Induzido; L1, S1, P1 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,1 mmol L⁻¹); L2, S2, P2 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 0,5 mmol L⁻¹); L3, S3, P3 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (IPTG 1,0 mmol L⁻¹); L4, S4, P4 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e Pellet (meio autoinduzido).



Fonte: a autora.

Todos os testes resultaram em baixa ou nenhuma quantidade de proteína heteróloga expressa na fração solúvel, no entanto, ainda assim, procedeu-se à purificação a partir do meio de expressão autoindutor, que apresentou fraca banda na fração solúvel. O cromatograma da purificação por coluna com íons Ni²⁺ imobilizados pode ser observado na Figura 11A e o SDS-PAGE das frações coletadas na Figura 11B.

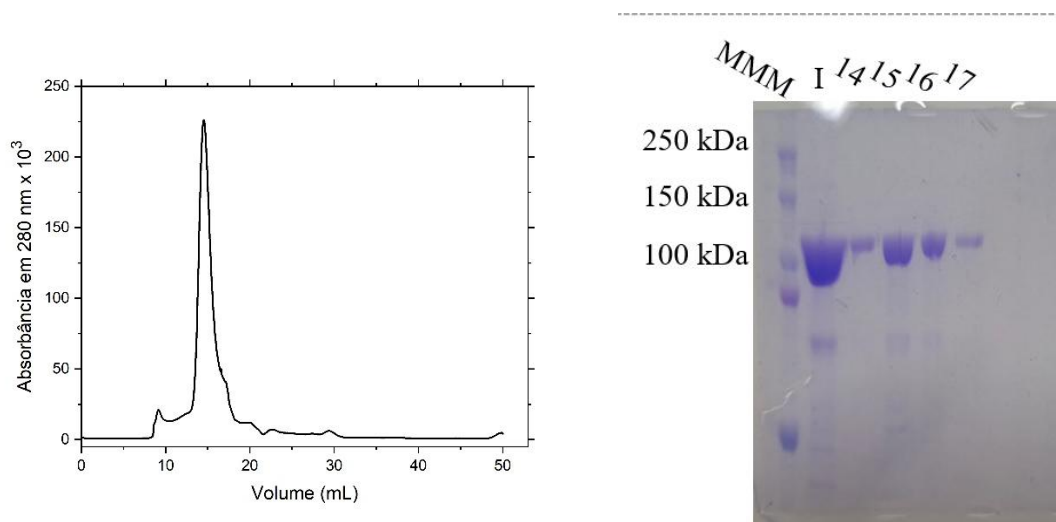
Figura 11 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da *TcValRS*. (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; I - amostra Injetada; Números - indicam as frações coletadas.



Fonte: a autora.

As frações 81 – 87 foram reunidas e submetidas a cromatografia por exclusão de tamanho (Figura 12A e 12B).

Figura 12 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da *TcValRS*. (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; I - amostra Injetada; Números - indicam as frações coletadas.



Fonte: a autora.

As frações 14 a 17 foram reunidas e concentradas a 1 mg mL^{-1} em um volume final de $750 \text{ }\mu\text{L}$. Acredita-se que já durante a preparação para a cromatografia por exclusão de tamanho, a proteína tenha agregado durante o procedimento de concentração, o que acarretou baixo rendimento final.

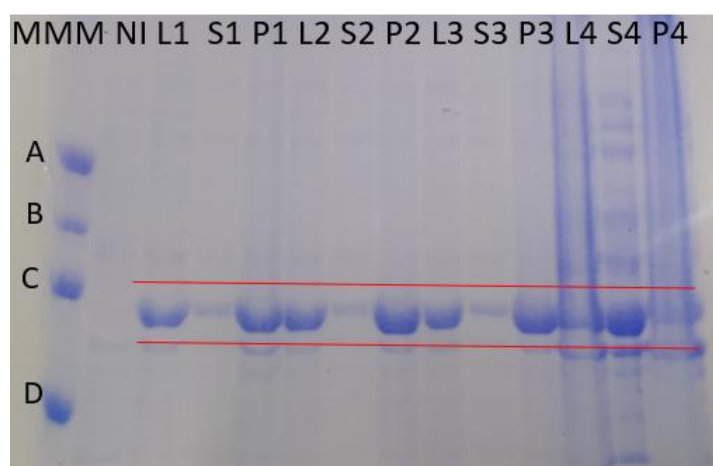
A partir dos resultados preliminares, pretende-se otimizar as etapas de purificação da *TcValRS*, a fim de se obter uma amostra com concentração viável para ensaios de cristalização e/ou CryoEM.

5.3 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

5.3.1 Expressão, purificação e cristalização da *BbGAPDH*

Os testes de indução foram realizados na temperatura de 37 °C, no meio LB com concentrações de IPTG de 0,1, 0,5 e 1,0 mmol L⁻¹, além do meio de autoindução ZYP-5052 (Studier, 2005). A análise do perfil de expressão foi realizada através de SDS-PAGE 10%, onde foi constatado que a condição mais favorável de expressão, isto é, a que apresentou maior quantidade de proteína na fração solúvel, foi a do meio autoindutor. Essa constatação é devida à intensa banda na posição esperada para massa molecular de aproximadamente 39 kDa (Figura 13), portanto, compatível com o valor de 39 kDa da proteína, fornecido pelo banco de dados do SSGCID.

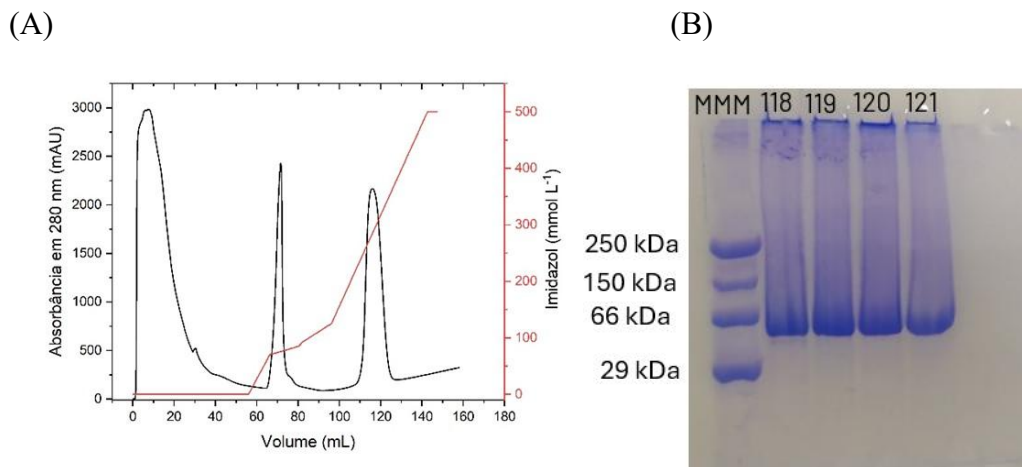
Figura 13 - SDS-PAGE 10% do teste de expressão da *BbGAPDH*. As raias se referem a: MMM - Marcadores de Massas Moleculares, A:250,0; B:150,0; C: 66,0; D:29,0 kDa. NI – fração Não Induzida; L1, S1, P1 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (IPTG 0,1 mmol L⁻¹); L2, S2, P2 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (IPTG 0,5 mmol L⁻¹); L3, S3, P3 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (IPTG 1,0 mmol L⁻¹); L4, S4, P4 – Lisado bacteriano total, fração Solúvel e *Pellet* (meio autoinduzido).



Fonte: a autora.

Diante dos indícios de que a *BbGAPDH* estaria na fração solúvel, evidenciado pela fração S4 no SDS-PAGE, procedeu-se a cromatografia por metal imobilizado com íons Ni²⁺ (Figura 14).

Figure 14 - (A) Perfil de eluição da *Bb*GAPDH (B) SDS-PAGE 10% das amostras referentes ao terceiro pico do cromatograma.



Fonte: a autora.

Ensaio de cristalização foram preparados com a proteína em solução no tampão 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 5% (V/V) glicerol e 500 mmol L⁻¹ de imidazol com a enzima *Bb*GAPDH na concentração entre 8-20 mg mL⁻¹.

Inicialmente os kits preparados foram deixados em ambiente climatizado a 18 °C, no entanto, não foram observados muitos cristais. Desse modo, as demais placas preparadas foram deixadas em ambiente a 10 °C para verificar se esta variável poderia contribuir com uma mais formação de cristais. Durante as inspeções rotineiras, foi observado crescimento de cristais nas condições 4, 6, 8, 11 e 24 do kit Structure Screen e na condição 4 do kit JBScreen Pentaerythritol (Tabela 1).

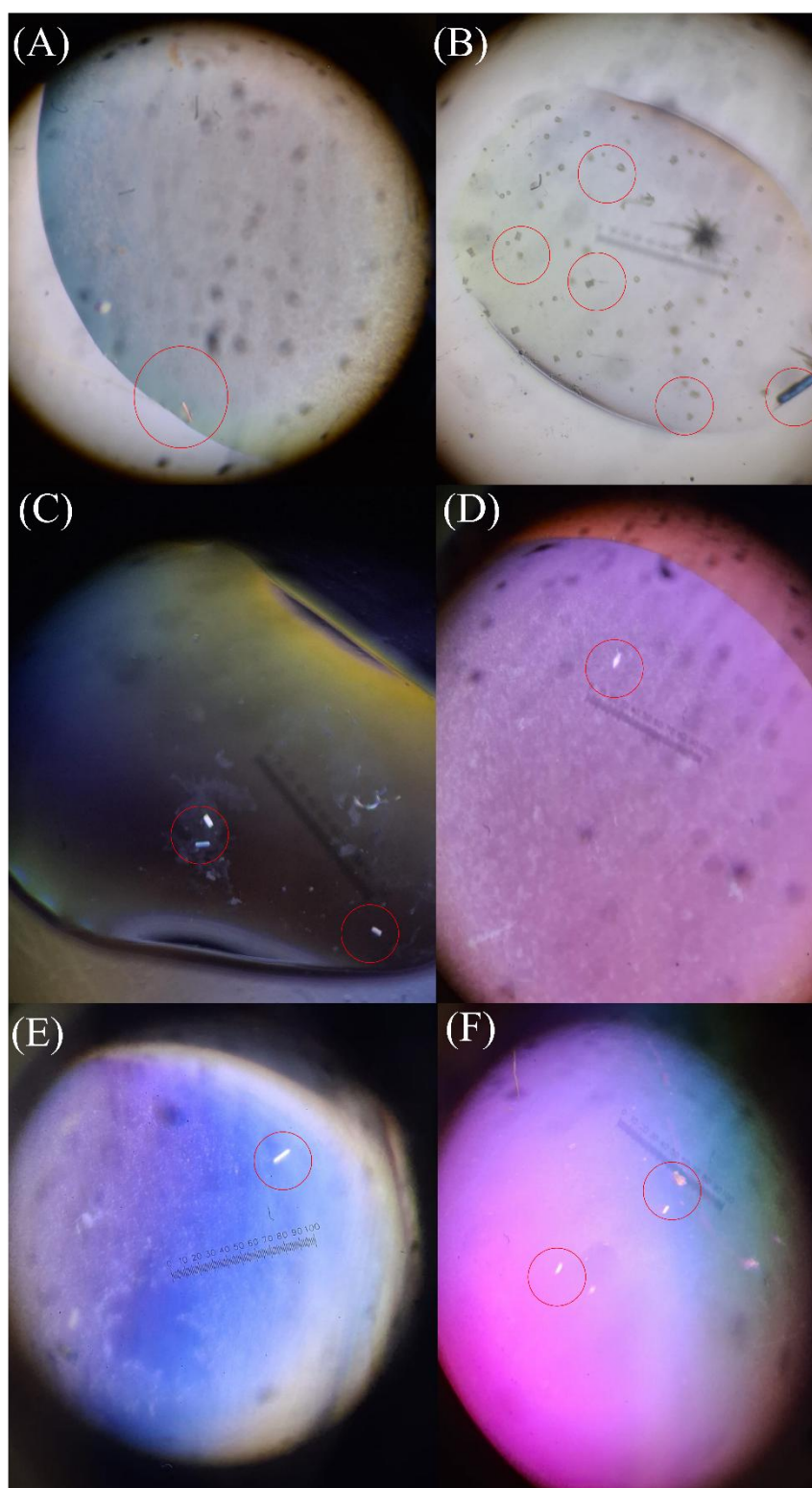
Tabela 1 - Condições iniciais em que se obtiveram cristais da *Bb*GAPDH.

Kit	Número da condição	Composição
Structure Screen	4	0,2 mol L ⁻¹ cloreto de magnésio hexahidratado, 0,1 mol L ⁻¹ Tris pH 8,5, 3,4 mol L ⁻¹ 1,6-hexanediol
Structure Screen	6	1,0 mol L ⁻¹ sulfato de lítio, 0,1 mol L ⁻¹ Tris pH 8,0, 0,01 mol L ⁻¹ cloreto de níquel (II) hexahidratado
Structure Screen	8	0,2 mol L ⁻¹ fosfato de amônio monobásico, 0,1 mol L ⁻¹ Tris pH 8,0, 50 % (V/V) MPD
Structure Screen	11	0,5 mol L ⁻¹ sulfato de amônio, 0,1 mol L ⁻¹ HEPES sódico pH 7,5, 30 % (V/V) MPD
Structure Screen	24	0,05 mol L ⁻¹ cloreto de cézio, 0,1 mol L ⁻¹ MES pH 6,5, 30 % (V/V) Jeffamine® M-600
JBScreen Pentaerythritol	4	25% (m/V) PEP 629, 100 mmol L ⁻¹ MES pH 6,5

Fonte: a autora.

Alguns dos cristais obtidos da *Bb*GAPDH nas condições descritas acima podem ser observados na Figura 15.

Figura 15 - Cristais obtidos nos kits (A) Structure Screen - condição 4 (B) Structure Screen - condição 6 (C) Structure Screen - condição 8 (D) Structure Screen - condição 11 (E) JBScreen Pentaerythritol – condição 4 (F) Structure Screen – condição 24. Os cristais estão indicados em círculos com bordas vermelhas.



Fonte: a autora.

Cristais começaram a se formar nas condições 6 e 8 do kit Structure Screen em aproximadamente uma semana após o preparo das placas, que permaneceram armazenadas a 10 °C durante todo esse período. As demais placas, preparadas na mesma data, apresentaram os primeiros cristais em cerca de duas semanas após a montagem. O rápido surgimento de cristais a 10 °C frente a 18 °C indica a influência da temperatura, uma vez que a mesma pode afetar no processo de nucleação e solubilidade da proteína, influenciando na supersaturação, que é a força motriz da cristalização (Chen *et al.*, 2015).

Partindo dos cristais obtidos em uma semana após o preparo, foi realizada uma otimização de condições referente às condições 6 e 8 do kit Structure Screen.

- i) Condição 6: manteve-se o pH constante (Tris – HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0), variaram-se a concentração do NiCl₂ de 0,002 a 0,014 mol L⁻¹ e a concentração do Li₂SO₄ de 0,4 a 1,4 mol L⁻¹;
- ii) Condição 8: manteve-se o pH constante (Tris – HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 8,0), variaram-se a concentração do NH₄H₂PO₄ de 0,1 a 0,25 mol L⁻¹ e a concentração do MPD de 35 a 60% (V/V).

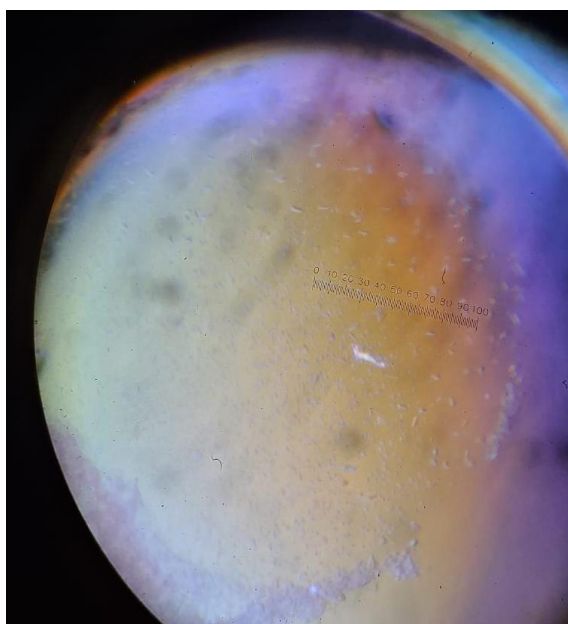
Na tabela abaixo é possível observar como as concentrações dos compostos referentes à condição de cristalização 6 variaram de acordo com cada poço da placa, totalizando 24 condições. Deixou-se 1 mL de solução em cada poço.

Tabela 2 - Concentrações utilizadas para otimização da condição 6 do kit Structure Screen.

	1	2	3	4	5	6
	0,1 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹	0,1 mol L ⁻¹
A	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,
	35% MPD	40% MPD	45% MPD	50% MPD	55% MPD	60% MPD
	0,15 mol L ⁻¹	0,15 mol L ⁻¹	0,15 mol L ⁻¹	0,15 mol L ⁻¹	0,15 mol L ⁻¹	0,15 mol L ⁻¹
B	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,
	35% MPD	40% MPD	45% MPD	50% MPD	55% MPD	60% MPD
	0,20 mol L ⁻¹	0,20 mol L ⁻¹	0,20 mol L ⁻¹	0,20 mol L ⁻¹	0,20 mol L ⁻¹	0,20 mol L ⁻¹
C	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,
	35% MPD	40% MPD	45% MPD	50% MPD	55% MPD	60% MPD
D	0,25 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹
	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,	NH ₄ H ₂ PO ₄ ,
	35% MPD	40% MPD	45% MPD	50% MPD	55% MPD	60% MPD

Fonte: a autora.

Apesar das inspeções rotineiras, nas condições realizadas conforme a Tabela 2, não foi possível observar o surgimento de muitos cristais. O crescimento mais notável pode ser observado na figura abaixo, referente a cristais obtidos na condição A5.

Figura 16 - Cristais da *BbGAPDH* obtidos na condição 0,1 mol L⁻¹ Tris – HCl pH 8,0, 0,1 mol L⁻¹ NH₄H₂PO₄, 55% MPD.

Fonte: a autora.

Na Tabela 3 é apresenta-se a variação das concentrações dos compostos referentes à abertura da condição 8 do kit Structure Screen, totalizando 24 condições em que o volume final de cada poço também foi 1 mL.

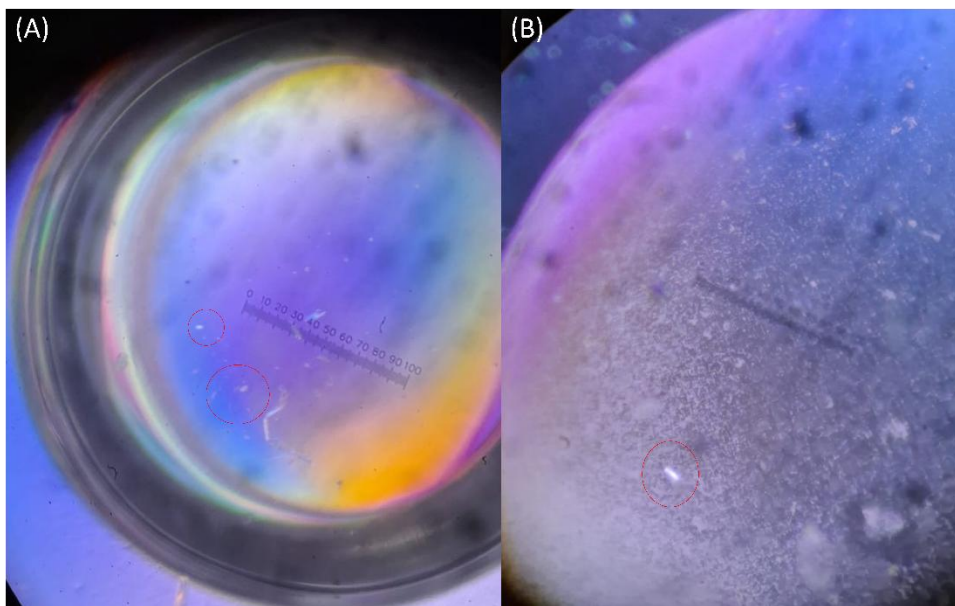
Tabela 3 - Concentrações utilizadas para otimização da condição 8 do kit Structure Screen.

	1	2	3	4	5	6
A	0,002 mol L ⁻¹ NiCl ₂ .6H ₂ O, 0,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,002 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,6 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,002 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,8 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,002 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,0 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,002 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,2 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,002 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄
B	0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,6 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,8 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,0 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,2 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,006 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄
C	0,010 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,010 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,6 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,010 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,8 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,010 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,0 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,010 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,2 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,010 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄
D	0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,6 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 0,8 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,0 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,2 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄	0,014 mol L ⁻¹ NiCl ₂ . 6H ₂ O, 1,4 mol L ⁻¹ Li ₂ SO ₄

Fonte: a autora.

Nas condições B2 e D2 foi possível observar o aparecimento de pequenos cristais (gota com proporção 1:1 de proteína e precipitante), conforme a Figura 17.

Figura 17 - Cristais obtidos (A) na condição B2 - $0,006 \text{ mol L}^{-1} \text{ NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ Li}_2\text{SO}_4$ e (B) na condição D2 - $0,014 \text{ mol L}^{-1} \text{ NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ Li}_2\text{SO}_4$.



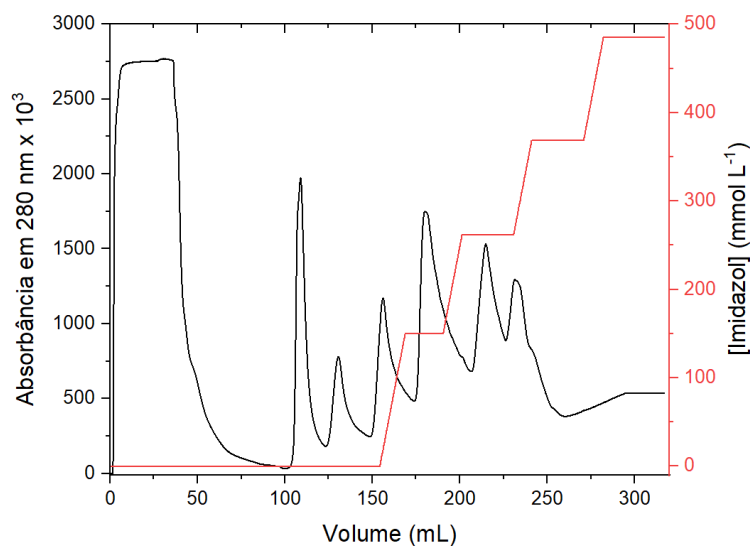
Fonte: a autora.

Todos os cristais obtidos foram submetidos à análise por difração de raios X; contudo, a análise dos padrões de difração revelou que eles não eram de natureza proteica. Até então, os ensaios de cristalização haviam sido realizados com a proteína contendo a His-tag. Assim, a partir destes resultados, novos experimentos de cristalização foram realizados com a His-tag clivada.

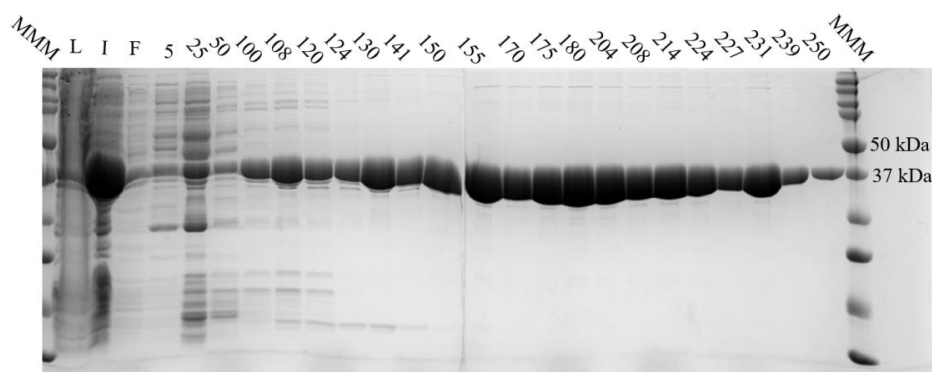
Assim, iniciou-se um novo lote de expressão e purificação. Na Figura 18, é possível se observar o perfil de eluição da *BbGAPDH* na IMAC nesse novo lote.

Figura 18 - (A) Perfil cromatográfico da eluição da *BbGAPDH*. (B) SDS-PAGE 10%: MMM - Marcadores de Massas Moleculares; L - lisado; I - amostra Injetada; F - amostra do primeiro pico (*Flow*); Números - indicam as frações coletadas.

(A)



(B)



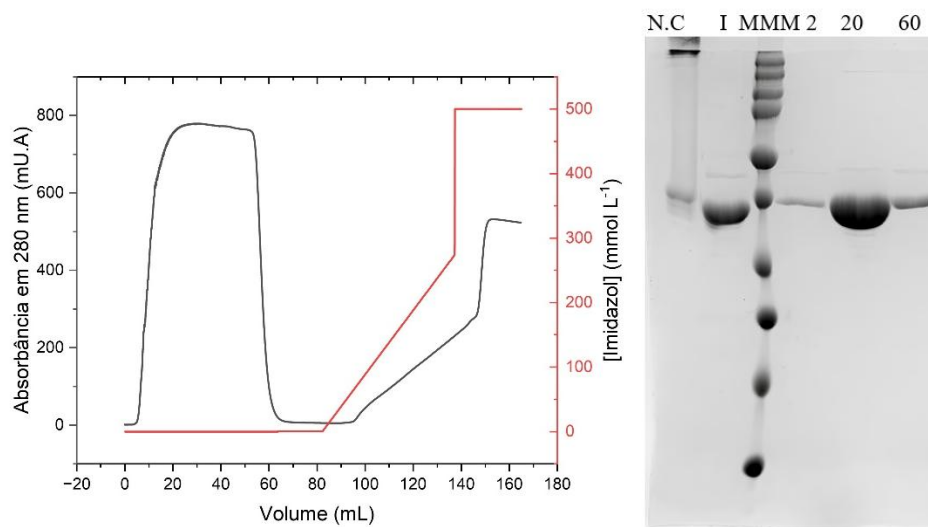
Fonte: a autora.

Embora a *BbGAPDH* tenha sido eluída em maior quantidade após o início do gradiente (Figura 18A), ela também foi eluída antes do início do mesmo, o que é evidenciado pela presença das bandas em torno de 37 kDa nas amostras referentes ao segundo e terceiro picos (Figura 18B). Hipotetiza-se que a presença da *BbGAPDH* em diversos picos, incluindo os de antes do início do gradiente, seja por saturação da coluna devido à alta quantidade de proteína injetada. Todas as frações foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 10%, que indicou elevada pureza e concentração.

As referidas amostras foram reunidas e dialisadas *overnight* com a protease *PreScission*. Após a diálise, a amostra foi submetida a uma nova etapa de purificação,

utilizando-se uma coluna de íons Ni^{2+} acoplada a uma coluna com glutatona imobilizada; a primeira coluna, para remoção de proteínas não clivadas e da própria His-tag, enquanto a segunda coluna para a remoção da protease. O perfil de eluição e o SDS-PAGE das amostras coletadas podem ser observados na Figura 19.

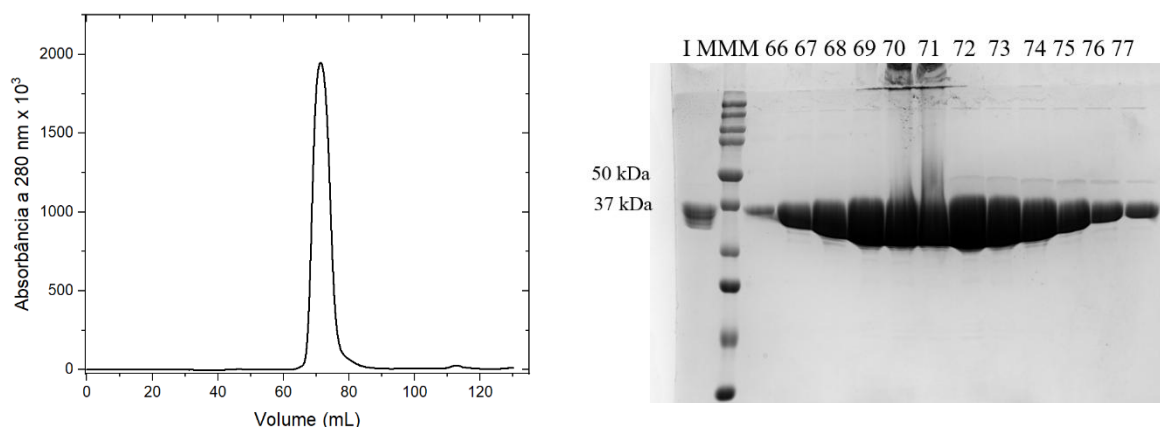
Figura 14 - (A) Perfil cromatográfico da IMAC e cromatografia de afinidade por glutatona da *Bb*GAPDH. (B) SDS-PAGE 10% das amostras coletadas do pico. I - Amostra Injetada; N.C - Não Clivado; MMM - Marcadores de Massas Moleculares; Números - indicam as frações coletadas.



Fonte: a autora.

As amostras referentes à GAPDH foram reunidas e concentradas até cerca de 5 mL para a cromatografia por gel filtração. O perfil de eluição pode ser observado na Figura 20A, onde o cromatograma e o SDS-PAGE indicam elevada pureza das amostras coletadas. Após todas as etapas, o rendimento da produção da proteína pura foi de 28 mg por litro de meio de cultura utilizado. Considerando que purificações de proteínas recombinantes frequentemente apresentam rendimentos inferiores a 20 mg L^{-1} (Al-Jubair *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2015), o valor obtido é expressivo e mais que suficiente para ensaios de cristalização e possíveis estudos cinéticos.

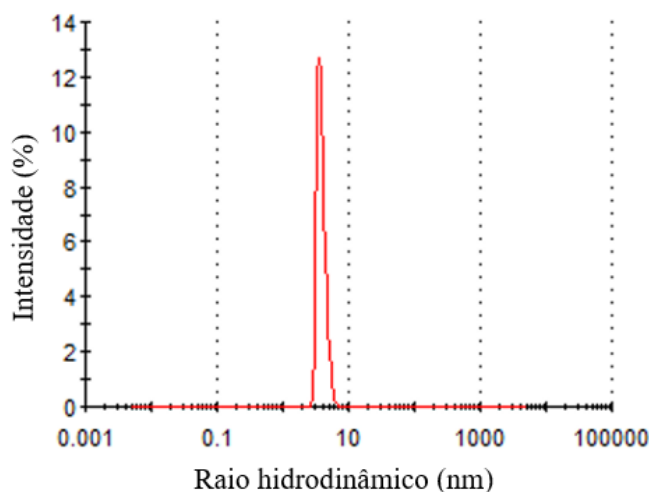
Figura 20 - (A) Perfil cromatográfico da gel filtração da *BbGAPDH*. (B) SDS-PAGE 10% das amostras coletadas do pico. I - Amostra Injetada; MMM - Marcadores de Massas Moleculares; Números - indicam as frações coletadas.



Fonte: a autora.

A fim de se verificar o estado de agregação da solução proteica, a mesma foi submetida à análise por espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) na concentração de 9,0 mg mL⁻¹. Na Figura 21, é possível observar que a população se concentrou majoritariamente em torno de 4,94 nm, indicando uma solução monodispersa sem provável agregação proteica, com um PDI de 0,250.

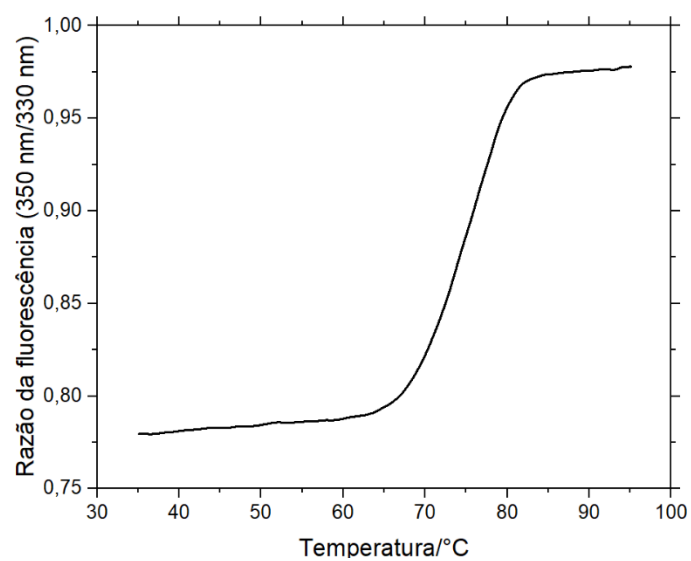
Figura 21 - Distribuição de tamanho de partículas em solução determinada por DLS.



Fonte: a autora.

A análise por nanoDSF indicou a temperatura de *melting* (T_m) como $\sim 75,3$ °C (Figura 22). Esse valor é um pouco maior do que T_m 's relatados na literatura (Baibai *et al.*, 2007; Bell, Smith e Storey, 2014; Fourrat, Iddar e Soukri, 2007); sendo próximo apenas da GAPDH de *Acropora millepora*, 63,2 °C (Perez *et al.*, 2021).

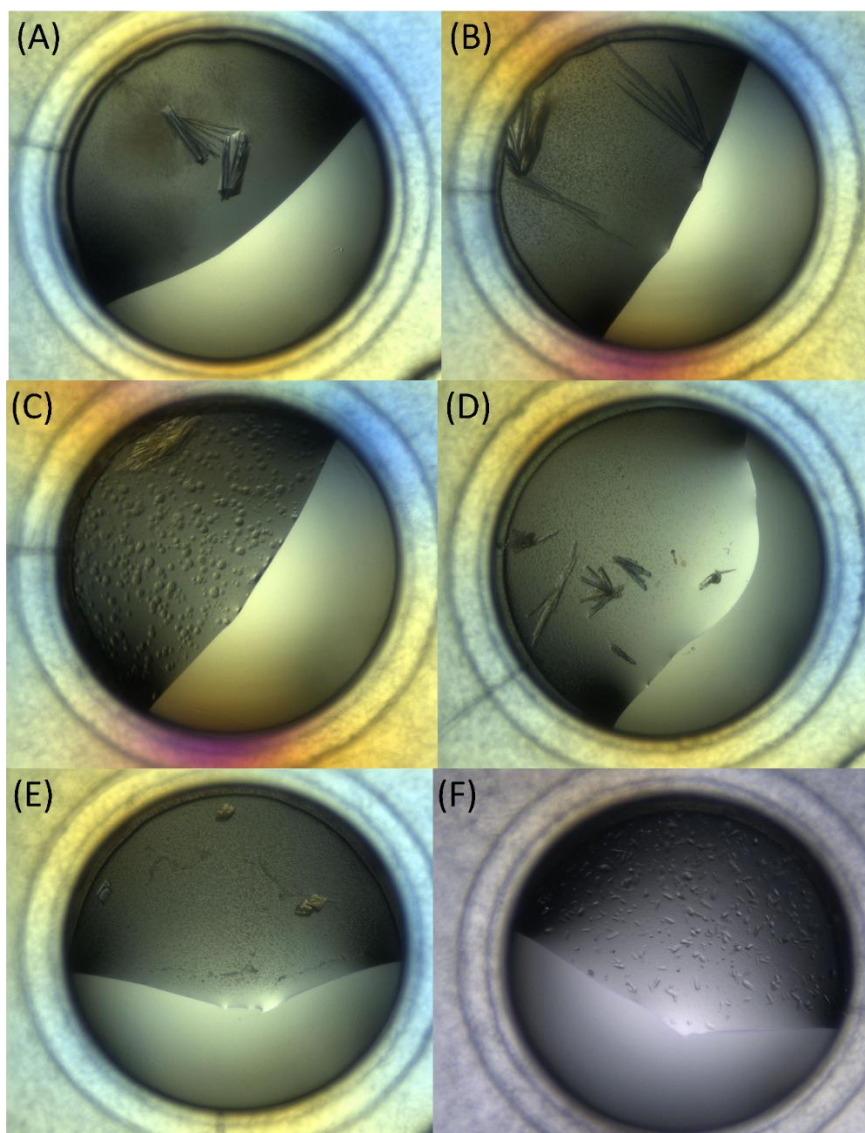
Figura 22 - Efeito da temperatura na fluorescência de resíduos Trp da *BbGAPDH*



Fonte: a autora.

Ensaio de cristalização foram então realizados, em diferentes condições. Os cristais obtidos podem ser observados na Figura 23.

Figura 23 - Cristais obtidos nas condições (A) e (B) 14 do kit JCSG-plus Eco, (C) 27 do kit PACT premier Eco Screen, (D) 87 do kit SG1 Eco Screen, (E) 90 do kit SG1, (F) 57 do kit Wizard Classic.



Fonte: a autora.

A composição da solução precipitante referente a cada imagem pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de cristalização onde se obtiveram cristais da *Bb*GAPDH sem cauda.

Kit	Número da condição	Composição
JCSG-plus Eco	14	0,2 mol L ⁻¹ tiocianato de sódio, 20% (m/V) PEG 3350
PACT premier Eco Screen	27	0,1 mol L ⁻¹ PMTP pH 6,0, 25% (m/V) PEG 1500
SG1 Eco Screen	87	0,2 mol L ⁻¹ iodeto de amônio, 20% (m/V) PEG 3350
SG1 Eco Screen	90	0,1 mol L ⁻¹ TRIS pH 8,5, 25% (m/V) PEG 3350
Wizard Classic	57	100 mmol L ⁻¹ fosfato de sódio dibásico/ácido cítrico pH 4,2, 2,0 mol L ⁻¹ sulfato de amônio

Fonte: a autora.

A literatura reporta a cristalização da GAPDH sem a necessidade de clivagem da tag, p.e., Boreiko, Silva e Iulek (2021), na composição 0,12 mol L⁻¹ etilenoglicóis, 0,1 mol L⁻¹ tampão pH 6,5 (0,1 mol L⁻¹ MES/Imidazol) e 30% de mistura de precipitantes (20% (V/V) de glicerol e 10% (V/V) PEG 40000). Miranda, Silva e Iulek (2022) também reportam a cristalização com tag, nas condições de 20% (V/V) PEG 6000, 0,1 mol L⁻¹ tampão de citrato pH 4,0 e 1,0 mol L⁻¹ cloreto de lítio, enquanto Hernández-Prieto, Martini e Iulek (2024) cristalizaram em 0,2 mol L⁻¹ sulfato de amônio, 25,5% (m/V) PEG 4000 com a presença de 0,30 mmol L⁻¹ do cofator NAD⁺ e também em 0,2 mol L⁻¹ sulfato de amônio, 0,1 mol L⁻¹ acetato de sódio pH 4,6 e 30% (m/V) PEG 2000 MME.

Na GAPDH do presente trabalho não é possível observar um padrão recorrente de condições de cristalização quando estas são comparadas com dados da literatura, como os citados acima, visto que ela foi cristalizada em diferentes pH's, 4,2, 6,0 e 8,5, bem como em diferentes sais, sulfato de amônio, tiocianato de sódio e iodeto de amônio. No entanto, observa-se a recorrência do agente precipitante PEG em diferentes massas moleculares, com predominância dos valores promediados mais baixos (1500 e 3350), em concordância com os citados acima. Esses resultados sugerem que o PEG, além de atuar como crioprotetor - papel crucial na proteção dos cristais contra danos por radiação durante a difração por raios X -, exerce influência positiva no processo de cristalização destas enzimas.

A clivagem da His-tag foi decisiva para a cristalização da *Bb*GAPDH, de modo que cristais de proteína obtidos foram obtidos somente após essa etapa. Há poucos relatos na literatura sobre a influência da clivagem da cauda no processo de cristalização da proteína, como no caso de Machado *et al.* (2016), onde a clivagem para a GAPDH de *Naegleria gruberi* foi essencial, não apenas para a cristalização, mas também para ensaios cinéticos. Embora ainda não haja um padrão definitivo, dados como esses reforçam que para a cristalização de GAPDHs de determinados organismos, a clivagem da cauda é essencial, assim como para sua atividade enzimática.

5.3.2 Procedimentos computacionais

5.3.2.1 Coleta de dados e processamento das imagens

As 3600 imagens mostraram que a difração era altamente anisotrópica. Além disso, foi possível observar a difração por policristais de gelo. Assim, as intensidades com correção de *background* foram integradas, escalonadas e promediadas até uma resolução de 2,80 Å e, em seguida, submetidas ao servidor STARANISO (STARANISO anisotropy & Bayesian estimation server, [S.d.]). Para um valor ponderado local de 1,0 para a média de $I_{\text{mean}}/\sigma(I_{\text{mean}})$, os limites de difração para os eixos elipsoidais ajustados foram de 3,403 Å nas direções a^* e $(0,894 a^* - 0,447 b^*)$ e 3,020 Å na direção c^* ; assim, o melhor limite de difração após o corte foi indicado como 3,123 Å. O grupo de espaço é $P3_121$ com dois monômeros (denominados cadeia A e cadeia B) por unidade assimétrica, com um conteúdo de solvente estimado em 45,8%. O processamento de dados, as estatísticas de refinamento e alguns parâmetros de validação da estrutura são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Estatísticas da coleta de dados e refinamento.

Dados do cristal	
PDB ID	10GI
Comprimento de onda / Å	0,9772
Faixa de resolução / Å	74,14 - 3,12 (3,51 - 3,12)*
Grupo de espaço	$P3_121$
Célula unitária	
a, b, c / Å	85,61, 85,61, 155,06
Reflexões totais	187253(28101)*
Reflexões únicas &	9849 (1414)
Completeza (%) &	90,9 (63,7)
Média $[I/\sigma(I)]$ &	7,2 (1,2)
R_{pim} (%)	9,4 (90,0)
$CC_{1/2}$ (%)	99,3 (48,6)
Wilson B -factor / Å ²	111,20
Refinamento	
Faixa de resolução / Å	74,14 – 3,12 (3,44 – 3,12)*
R_{work} (%)	28,97 (38,18)*
R_{free} (%)	34,05 (39,23)*
Monômeros por Unidade Assimétrica	2
Número de Resíduos de Proteína	675
Número de átomos que não são Hidrogênios	
Total	5092
Macromoléculas	4979
Solvente	25
Fator B médio	
Global / Å ²	107,85
Macromoléculas / Å ²	108,10
Solvente / Å ²	92,27
RMSD	
Comprimentos de Ligação / Å	0,001
Ângulos de ligação / °	0,385
Ajuste geral da densidade proteica	
RSZO	1,160
RSZD	0,428
Gráfico de Ramachandran	

Favoráveis (%)	89,27
Adicionalmente Permitidos (%)	10,43
Generosamente permitidos (%)	0,3

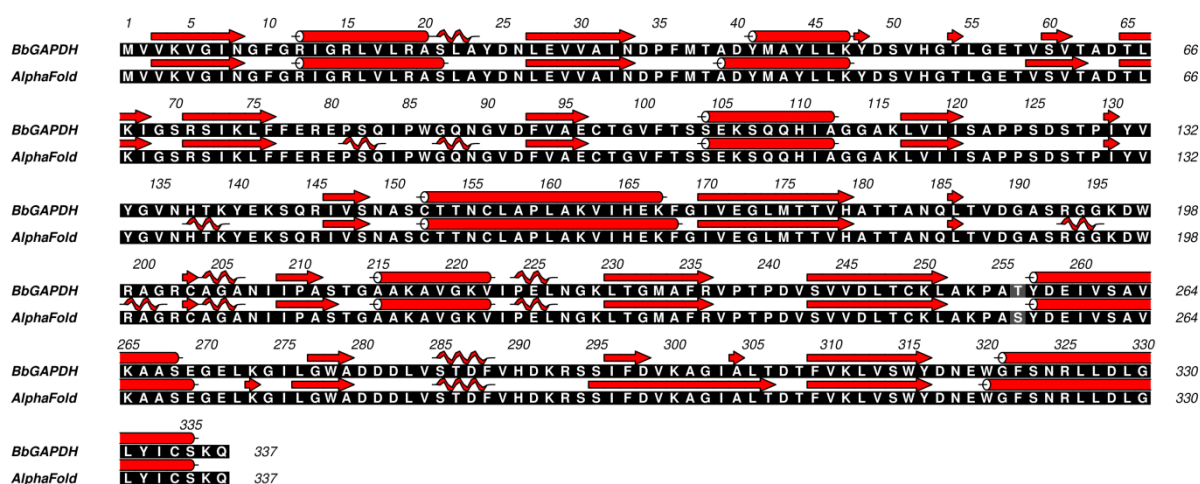
* Em parênteses estão os valores para a faixa de resolução mais alta.

& Valores depois do recorte pelo STARANISO.

5.3.2.2 Substituição molecular e faseamento inicial

A estrutura selecionada como modelo para substituição molecular foi o modelo teórico da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Babesia Bovis*, disponível no Database do AlphaFold (Fleming *et al.*, 2025), ID AF-S6C855-F1. Quase todos os aminoácidos são idênticos; a exceção é o resíduo 256, o qual a *BbGAPDH* apresenta uma treonina, enquanto o modelo do AlphaFold apresenta uma serina. Essa diferença decorre das sequências de referência utilizadas: o gene da *BbGAPDH* fornecido pelo SSGCID foi baseado na sequência UNIPROT A7ATE8, ao passo que o AlphaFold utilizou a sequência UNIPROT S6C855, que divergem nesse resíduo. O alinhamento entre as duas sequências para ilustrar divergências entre estruturas secundárias estimadas pelo programa DSSP (Kabsch e Sander, 1983) pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 - Alinhamento de sequências da *BbGAPDH*. As setas vermelhas representam fitas- β , os cilindros vermelhos representam hélices- α e as espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π .



Fonte: a autora.

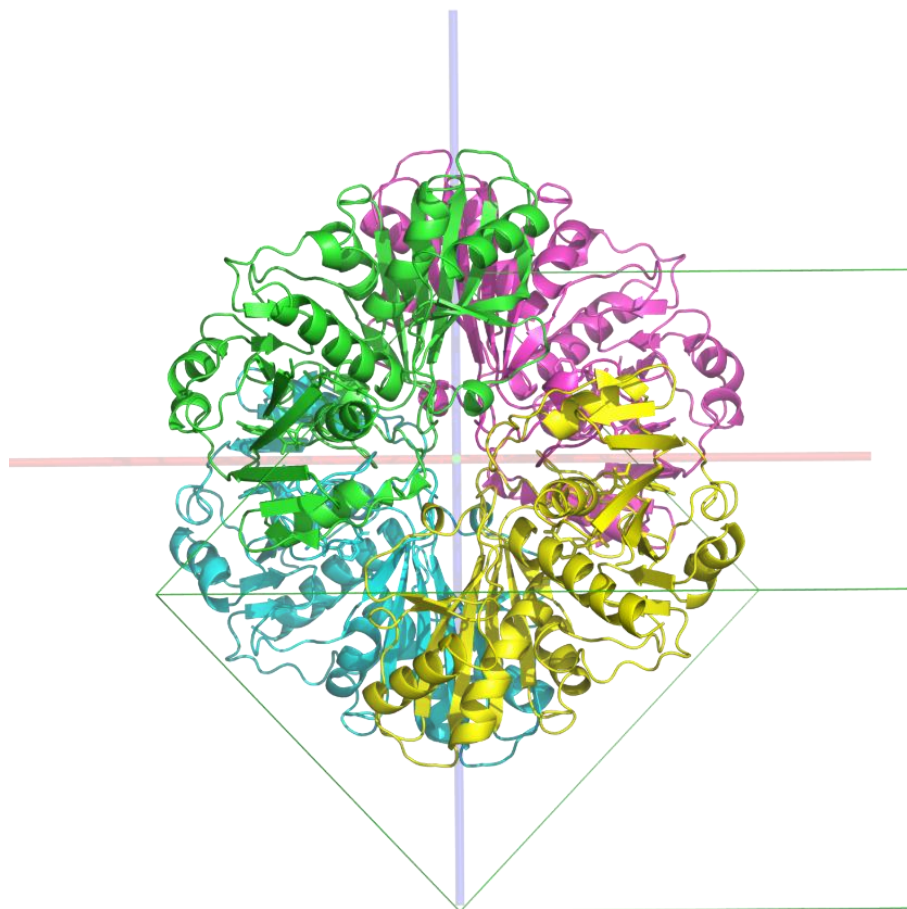
O programa Phaser apresentou a solução para as duas moléculas na unidade assimétrica.

5.3.2.3 Modelagem e refinamento

O modelo foi refinado com valores finais de R_{work} 28,97% e R_{free} 34,05% para um total de 675 resíduos proteicos, dois cofatores NAD^+ e 25 moléculas de água. Na cadeia B foi possível modelar o resíduo 0, proveniente do sistema de expressão. Busca automatizada de grupos TLS foi realizada no programa phenix.refine. Por outro lado, algumas tentativas de se usar restrições de simetria não cristalográficas não mostraram melhoria significativa no modelo, portanto, não foram utilizadas. Devido a desordem, 47 resíduos não tiveram duas cadeias laterais completamente modeladas.

As GAPDHs são tipicamente homotetrâmeros com simetria interna 222. O tetrâmero da *Bb*GAPDH é obtido com a operação cristalográfica $y, x, -z$ do grupo de espaço; ele é mostrado na Figura 25 com seus três eixos ortogonais de ordem 2, destacados relativos às arestas da célula unitária. Um eixo está perpendicular à página; o eixo vertical (azul) na figura corresponde ao eixo cristalográfico de ordem 2 do grupo de espaço que divide ao meio o ângulo entre as arestas a e b da célula unitária.

Figura 25 - O tetrâmero da *Bb*GAPDH e seus três eixos ortogonais de ordem 2.



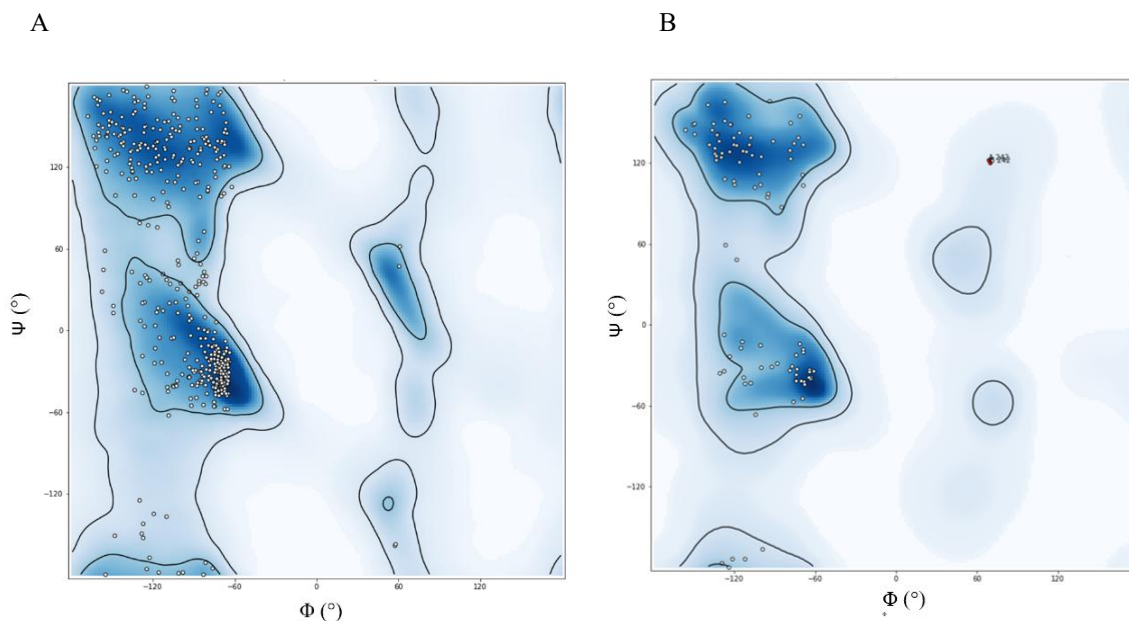
Fonte: a autora.

A estrutura foi depositada no RSCB PDB sob o ID pdb_000010GI.

5.3.2.3 Validação

Dos 675 aminoácidos analisados, 89,27% estão nas regiões mais favoráveis, 10,43% nas regiões adicionalmente permitidas e 0,3% nas regiões não permitidas (Val242 de ambas cadeias, um resíduo classicamente em região não permitida em GAPDHs) do gráfico de Ramachandran de acordo com o programa Molprobity (Chen *et al.*, 2010). A Figura 26 traz os gráficos para: A) o caso geral (excluindo Gly, Pro, Pré-Pro, Ile e Val) e B) específico para Ile e Val.

Figura 26 - Gráfico de Ramachandran para o modelo refinado final da *Bb*GAPDH. (A) Geral excluindo Gly, Pro, Pré-Pro, Ile (B) apenas para Val/Ile.



Fonte: a autora.

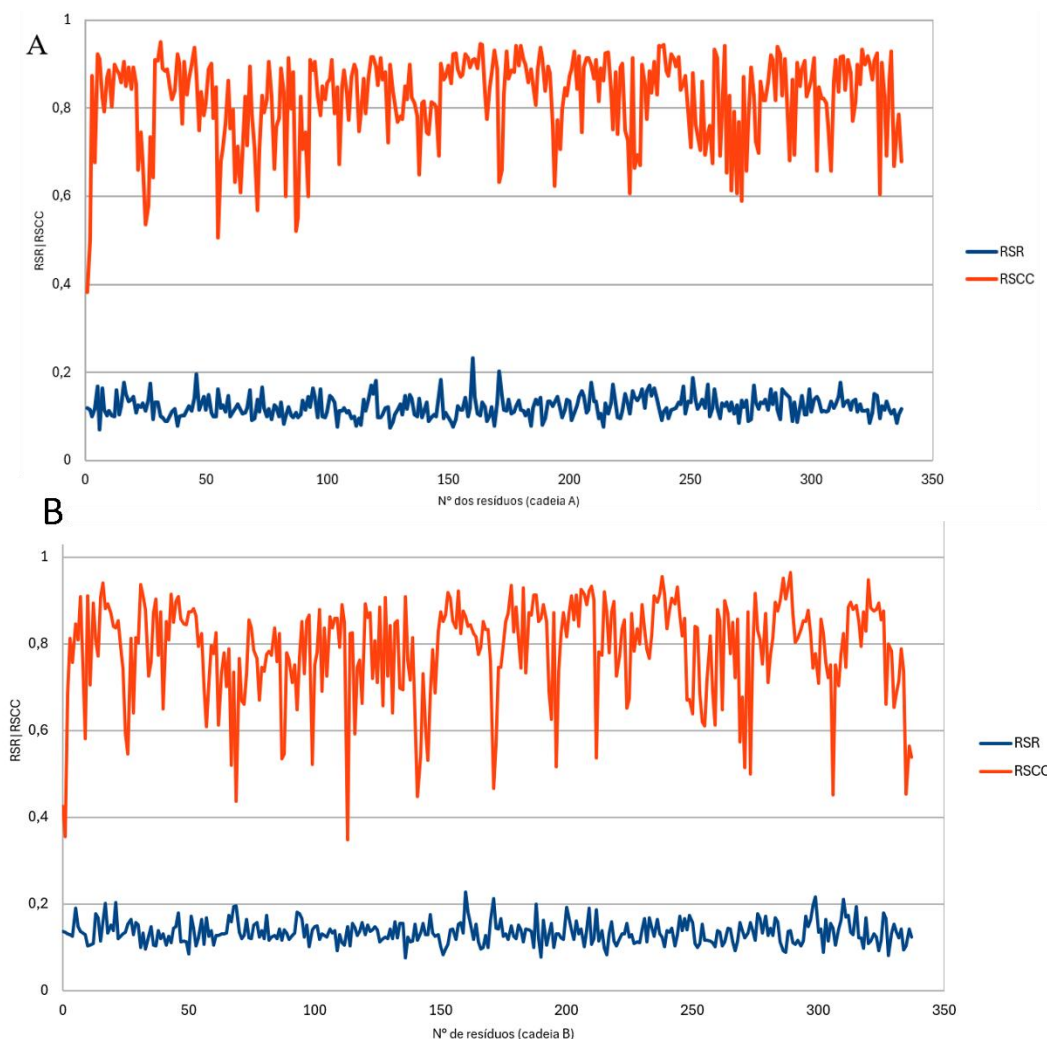
Para verificar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, calcularam-se os índices RSZO, RSZD, RSR e RSCC globais por cadeia proteica (incluindo o respectivo NAD^+) e por resíduos individuais da *Bb*GAPDH. Os índices globais são apresentados na Tabela 6 e os índices referentes ao ajuste de cada resíduo na densidade eletrônica são mostrados na Figura 27.

Tabela 6 - Valores de RSZO, RSZD, RSR e RSCC para os monômeros da *Bb*GAPDH.

Cadeia	RSZO	RSZD	RSR	RSCC
A	1,160	0,428	0,122	0,821
B	0,947	0,317	0,134	0,788

Fonte: a autora.

Figura 27 - Representação gráfica dos valores de RSCC e RSR, em azul e vermelho, respectivamente, calculados para o modelo refinado da *BbGAPDH* por resíduo na (A) cadeia A (B) cadeia B.



Fonte: a autora.

Os índices RSCC e RSR são indicadores de qualidade que avaliam a concordância entre um modelo e o mapa de densidade eletrônica e que podem ser aplicados localmente a fragmentos selecionados do modelo, como resíduos individuais. O RSCC compara a densidade eletrônica observada calculada a partir dos dados de difração, ρ_{obs} , com a calculada a partir do modelo atômico, calculando seu coeficiente de correlação, enquanto o RSR corresponde a uma diferença normalizada entre a densidade eletrônica observada e calculada, novamente calculado em uma grade selecionada de pontos (Wlodawer *et al.*, 2013)

Já os índices RSZD e RSZO são métricas baseadas na exatidão e precisão do modelo, respectivamente. O RSZD mede a discrepância local em termos de desvios padrão. Ele avalia se há excesso ou falta de densidade eletrônica em uma região específica, enquanto o RSZO

avalia a qualidade da densidade observada para um resíduo, normalizada pelo ruído do mapa (Tickle, 2012b).

A proteína apresenta regiões localmente desordenadas, com comportamento consistente entre as cadeias A e B, de modo que a cadeia A possui índices melhores que a cadeia B, conforme Figura 27 e Tabela 6.

5.3.2.4 Comparações estruturais e de sequência da *bbgapdh* com suas homólogas

Atualmente, o Protein Data Bank (PDB) apresenta estruturas de 158 GAPDHs de diferentes organismos. As sequências dessas proteínas foram submetidas a um alinhamento utilizando-se o servidor *T-coffee*, seguido de análise pela ferramenta Scorecons para identificar substituições na *BbGAPDH*. Para representação parcial deste alinhamento, foram selecionadas GAPDH's com maior percentual de identidade de diferentes organismos representativos, que foram, então, realinhadas: i) dos protozoários, *Cryptosporidium parvum* (CpGAPDH, PDB ID: 3CPS) e *Naegleria gruberi* (NgGAPDH, PDB ID: 5UR0); ii) da levedura *Paracoccidioides lutzii* (PlGAPDH, PDB ID: 8DE5) e iii) dos mamíferos *Homo sapiens* (HsGAPDH – somática, PDB ID: 1U8F) e *Bos taurus* (BtGAPDH, PDB ID: 7U5M), este último o principal hospedeiro da *Babesia bovis*. Como as enzimas são homólogas, um objetivo é obter uma visão das diferenças nas sequências de aminoácidos para fomentar o desenvolvimento de inibidores específicos para a *BbGAPDH*. Isso é fundamental para garantir que eventuais compostos inibidores não interfiram na enzima do hospedeiro, para evitar efeitos colaterais indesejados. A Tabela 7 mostra alguns dados das proteínas homólogas selecionadas para o alinhamento mostrado.

Tabela 7 - Dados das proteínas homólogas à enzima *BbGAPDH* obtidos a partir do alinhamento de sequências

PDB ID	Resolução / Å	Organismo	Identidade (%)
7U5M	2,28	<i>Bos Taurus</i>	64,58
1U8F	2,10	<i>Homo sapiens</i>	64,18
3CPS	1,90	<i>Cryptosporidium parvum</i>	67,95
8DE5	2,02	<i>Paracoccidioides lutzii</i>	63,88
1UR0	1,94	<i>Naegleria gruberi</i>	61,40

Fonte: a autora.

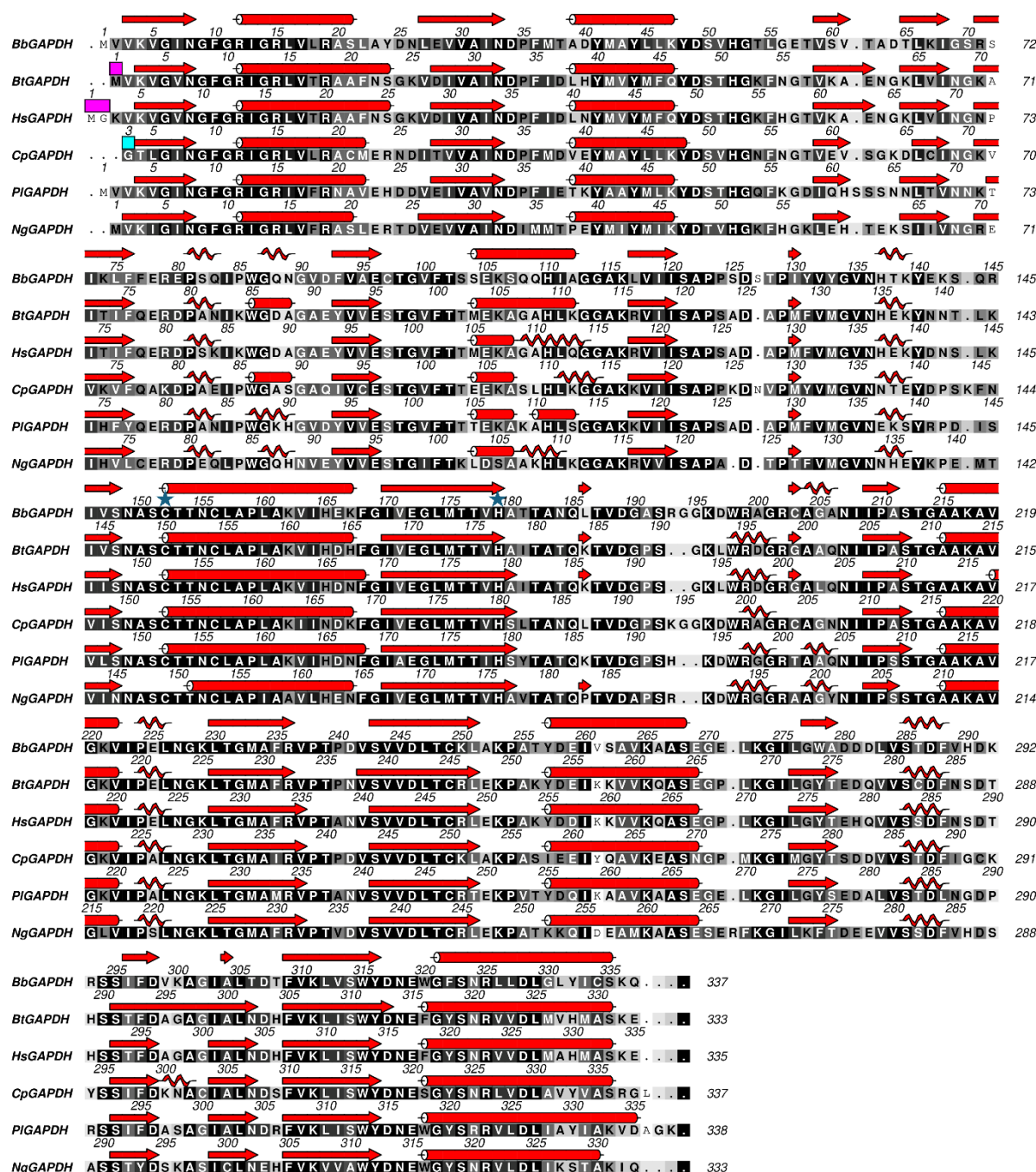
De forma geral, as GAPDH's existem na forma de homotetrâmeros. Cada monômero é constituído por um domínio N-terminal que vai aproximadamente do resíduo 1-151, abrangendo o domínio de ligação ao cofator NAD^+ , e um domínio C-terminal catalítico, que vai do do resíduo 152-337 (Seidler, 2013).

No alinhamento (Figura 28), é possível verificar a conservação da maioria dos aminoácidos que estão pelo sítio de ligação do NAD^+ (distância de corte de 4,0 Å): Asn8, Gly9, Phe10, Gly11, Arg12, Ile13, Asn33, Asp34, Pro35, Phe36, Met37, Arg79, Cys97, Thr98, Thr99, Phe101, Ser121, Ala122, Cys152, Thr182, Thr183, Asp318 e Glu319 (numeração baseada na sequência de *BbGAPDH*).

O resíduo Cys97 está muito próximo do sítio de ligação através do seu oxigênio carboxílico, enquanto o Met37 está muito próximo através do seu átomo C ϵ . Por outro lado, quanto à sequência global, alguns resíduos são únicos ou quase únicos na *BbGAPDH* em relação às outras 158 estruturas 3D de GAPDH atualmente disponíveis, a saber: Tyr24, Glu57, Phe77, Asn89, Ser104, Leu117, Ser127, Ala279 e Gly330. A maioria corresponde a substituições conservativas, indicando conservação funcional, com exceção do resíduo Leu117, localizado no início da fita β 7 (Zhang *et al.*, 2020), onde em todas as outras estruturas encontram-se os aminoácidos básicos lisina (majoritariamente) ou arginina, com uma única exceção de alanina. Se esta última substituição promoverá uma alteração local significativa, poder-se-á comprovar através de novos estudos, como de dinâmica molecular e de inibição.

Esta comparação da sequência de GAPDH de *Babesia bovis* com a de seu hospedeiro principal, *Bos taurus*, aliada à disponibilidade da estrutura de GAPDH de *Babesia bovis* (este trabalho), juntamente com a estrutura de *Bos taurus* (Morgan *et al.*, 2022), deve fornecer informações sobre as diferenças estruturais, essenciais para o projeto de inibidores diferenciais, que devem ser posteriormente confirmados por ensaios experimentais.

Figura 28 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da *Bb*GAPDH com *Bt*GAPDH (PDB ID: 7U5M), *Hs*GAPDH (PDB ID: 1U8F), *Cp*GAPDH (PDB ID: 3CPS), *Pl*GAPDH (PDB ID: 3DE5) e *Ng*GAPDH (PDB ID: 5UR0).



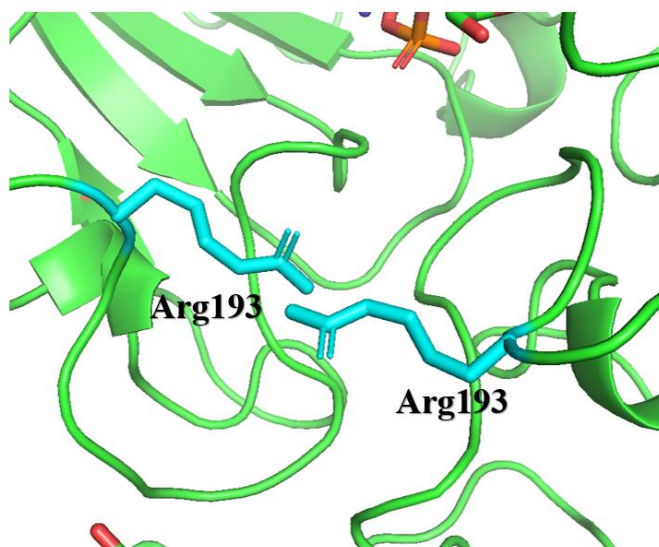
Legenda: As barras em magenta indicam resíduos que não foram modelados na estrutura correspondente, o quadrado em ciano indica a alteração do aminoácido Ala3 para Gly3 em relação às sequências UNIPROT a PDB, as estrelas azuis indicam os resíduos catalíticos, as setas vermelhas representam fitas β , os cilindros vermelhos representam hélices α e as espirais vermelhas representam hélices 3_{10} ou π .

Fonte: a autora.

Os resíduos catalíticos, Cys152 e His179 para *Bb*GAPDH, se mantêm conservados. Eles são implicados na funcionalidade da enzima, uma vez que o primeiro prepara o segundo para realizar o ataque nucleofílico na carbonila do substrato (Perez-Casal e Potter, 2016).

Em particular, a estrutura experimental da *Bb*GAPDH revela que a Arg193, presente em um dos loops da *Bb*GAPDH, das cadeias A e B interagem entre si (Figura 29).

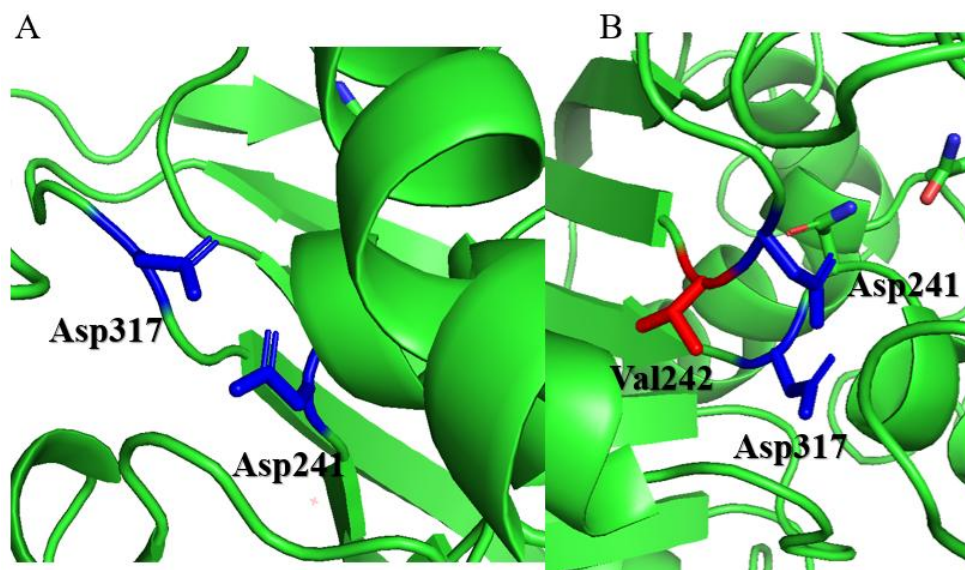
Figura 29 - Arg193 das cadeias A e B (em ciano).



Fonte: a autora.

O grupo carboxílico de Asp241 tem sua cadeia lateral orientada para Asp317 (Figura 30A). Hipotetiza-se sua protonação para possibilitar ligações de hidrogênio entre os grupos -COO^- , estabilizando a região local. Efetivamente, nesse "núcleo ácido", o programa propKa (Bas, Rogers e Jensen, 2008) estima valores de pK_a para o Asp241 de 13,03 na cadeia A e 11,09 na cadeia B.

Figura 30 - Posição dos resíduos (A) Asp241 e Asp317, em azul (B) Val242, em vermelho.



Fonte: a autora.

Adicionalmente, levanta-se a hipótese de que no processo da proteína assumir um estado de energia global mínimo quando enovelada, a tensão local induzida pelos resíduos Asp214/317 poderia contribuir para tensionar os ângulos diedros ψ e Φ da Val242, fazendo com que esteja em uma região energeticamente desfavorável no gráfico de Ramachandran. A proximidade dos aminoácidos Asp214/317 e Val242 pode ser observada na Figura 30B.

5.3.2.5 Comparações estruturais do modelo experimental com o modelo teórico

Nesta estrutura experimental, identificamos alguns resíduos, especialmente aqueles com cadeias laterais mais longas, que apresentam conformações diferentes das modeladas teoricamente, conforme indicado pela ferramenta phenix StructureComparison. Alguns casos proeminentes são mostrados na Tabela 8, com os respectivos índices RSZO, RSZD e RSR dos resíduos.

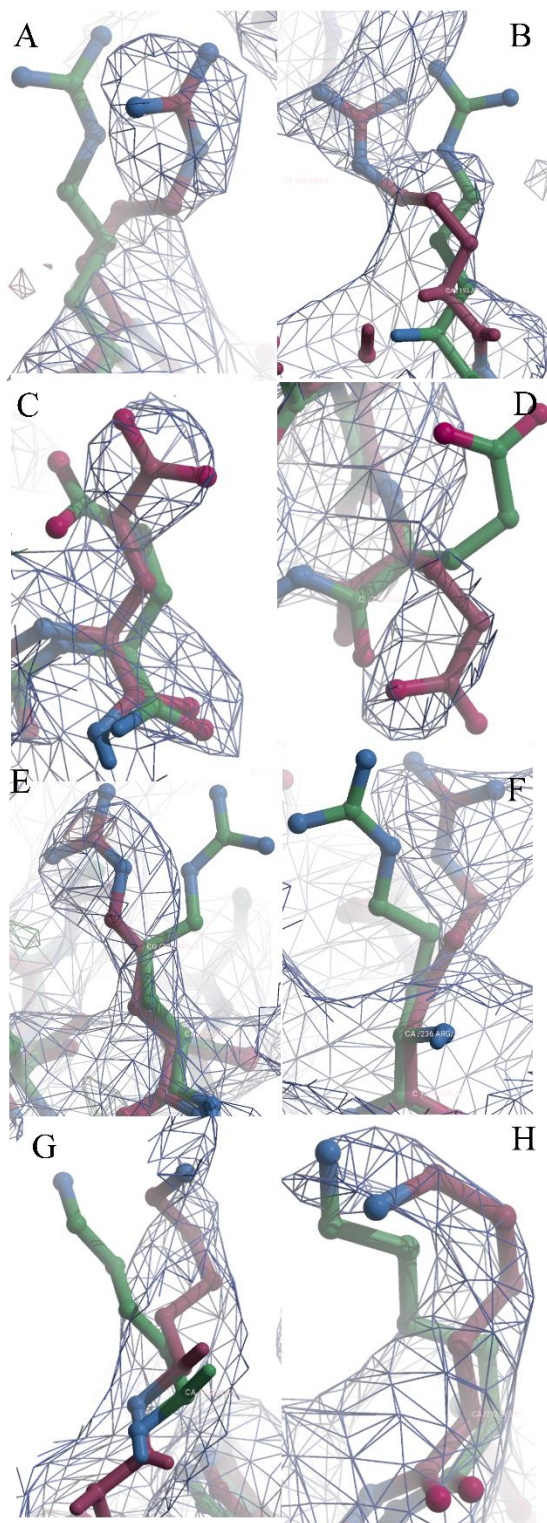
Tabela 8 - Comparação entre os rotâmeros, modelo teórico e estrutura experimental.

Resíduo/cadeia	Rotâmero mais próximo, modelo teórico	Rotâmero mais próximo, estrutura experimental	RSZO	RSZD	RSR
Arg193/A	mtt180	mtt90	1,6	1,1	0,110
Arg193/B	mmt180	mmt90	1,3	0,1	0,114
Lys196/A	mttt	mtp	1,6	0,2	0,103
Glu225/A	mp0	mt-10	1,3	0,4	0,106
Glu225/B	mp0	tm-30	1,0	0,0	0,111
Arg236/A	mmt180	mtt90	1,8	1,6	0,123
Arg236/B	mmt180	mtp85	1,2	0,3	0,139
Lys292/A	pttt	tpp	1,5	0,0	0,086
Lys292/B	pttt	mtmp	1,2	0,2	0,105

Fonte: a autora.

As densidades eletrônicas de cada um desses rotâmeros podem ser observadas na Figura 31.

Figura 31 - Visualização do ajuste das cadeias laterais na densidade eletrônica. Em verde, a conformação do modelo teórico, e em rosa, a estrutura experimental. (A) Arg193 cadeia A (B) Arg193 cadeia B (C) Glu225 cadeia A (D) Glu225 cadeia B (E) Arg236 cadeia A (F) Arg236 cadeia B (G) Lys292 cadeia A (H) Lys292 cadeia B.



Legenda: Os mapas de densidade eletrônica 2mFo-DFc estão representados como modelo de arame, coloridos em azul e correspondem ao nível de 1 σ .

Fonte: a autora.

Outros autores já realizaram a comparação de modelos experimentais com os modelos teóricos disponibilizados pelo AlphaFold3 (AF 3). Wee; Wei (2024) avaliaram estruturas de complexos proteína-proteína com mutações disponíveis pelo AF3 e que também tinham suas estruturas 3D experimentalmente resolvidas e depositadas no PDB. Os autores constataram que as estruturas de complexos do AF3 levaram a um aumento de 8,6% no RMSE da predição em comparação com as estruturas de complexos originais do PDB. Além disso, algumas das estruturas complexas do AF3 apresentam grandes erros, que não foram capturados em sua métrica de desempenho ipTM. Por fim, os autores constataram que as estruturas complexas do AF3 não são confiáveis para regiões ou domínios intrinsecamente flexíveis.

Carugo (2024) compara as distâncias N-O de cadeias principais curtas em estruturas cristalinas de alta resolução com aquelas em modelos tridimensionais baseados em IA AlphaFold/ColabFold, considerando especificamente seus erros padrão estimados. O autor constata que os erros padrões estimados das posições atômicas nos modelos construídos com o ColabFold podem chegar a 3,5 a 6,0 vezes maiores que os dados experimentais.

6 CONCLUSÃO

A *TcLeuRS*, embora superexpressa, foi obtida quase que exclusivamente na fração insolúvel. A partir disso, diversas estratégias foram empregadas visando o êxito de sua produção, tais como variação das condições de expressão (temperatura, agitação, tempo de incubação) e alterações em protocolos de purificação. Apesar dos diversos protocolos tentados, não foi possível produzi-la solúvel em quantidade minimamente necessária, o que impossibilitou os ensaios de purificação e consequentemente cristalização.

Para a *TcValRS*, não houve diferenças significativas no tocante a maior quantidade de proteína solúvel produzida ao se variar os meios de expressão. O meio de indução ZYP-5052 foi o escolhido para produção em grandes quantidades, visando a purificação, que foi então executada. Todavia, na purificação, a proteína foi obtida em baixo rendimento, o que impossibilitou os ensaios de cristalização. Desse modo, novas estratégias serão ensaiadas para se tentar obter maior rendimento e se poder realizar ensaios de cristalização.

Para a *BbGAPDH*, as metodologias de expressão e purificação foram desenvolvidas para produzi-la com sucesso na forma solúvel, obtendo-se quase 1,0 g de proteína pura por litro de meio de expressão. A importância da remoção da cauda de histidina (His-tag) para a cristalização está realçada, juntamente com seu protocolo correspondente; antes dessa remoção, nenhum cristal de proteína foi obtido. Um cristal da proteína sem cauda forneceu imagens de difração de raios X que permitiram a resolução da estrutura da enzima a 3,12 Å. A análise comparativa da sequência da *BbGAPDH* com as de proteínas relacionadas mostra que a *BbGAPDH* é exclusiva em relação a alguns resíduos, como a Leu117, localizada no início da fita β 7, onde resíduos de lisina são predominantemente encontrados em outras GAPDHs. Além disso, os dados experimentais obtidos revelaram que a estrutura real apresenta várias cadeias laterais em conformações bem diferentes daquelas previstas pelo modelo teórico, o que é atestado pelos índices de precisão e exatidão na densidade eletrônica RSZO, RSZD e RSR. A grande quantidade de proteína purificada, aliada aos dados estruturais iniciais (RCSB PDB ID pdb_000010GI), deve fornecer suporte para ensaios de inibição enzimática e para cristalização de complexos (proteína com inibidores), o que deverá orientar os esforços para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da babesiose.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D. *et al.* The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 94–106, 1 set. 2011.
- AL-JUBAIR, T. *et al.* High-yield overproduction and purification of human aquaporins from *Pichia pastoris*. **STAR Protocols**, v. 3, n. 2, p. 101298, 17 jun. 2022.
- AMORIM, L. S. *et al.* Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 328–336, 2014.
- ANTONIO ALVAREZ, J.; ROJAS, C.; FIGUEROA, J. V. Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 143, 1 set. 2019.
- ASLANIDIS, C.; JONG, P. J. DE. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). **Nucleic acids research**, v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 25 out. 1990.
- BAIBAI, T. *et al.* Purification and Characterization of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from European Pilchard <italic>*Sardina pilchardus*</italic>. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 12, p. 947–954, 1 dez. 2007.
- BARTON, G. J. Alscript: A tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 6, n. 1, p. 37–40, jan. 1993.
- BAS, D. C.; ROGERS, D. M.; JENSEN, J. H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 73, n. 3, p. 765–783, 15 nov. 2008.
- BEILSTEN-EDMANDS, J. *et al.* Scaling diffraction data in the DIALS software package: Algorithms and new approaches for multi-crystal scaling. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. 76, p. 385–399, 1 abr. 2020.
- BELL, R. A. V.; SMITH, J. C.; STOREY, K. B. Purification and properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the skeletal muscle of the hibernating ground squirrel, *ictidomys tridecemlineatus*. **PeerJ**, v. 2014, n. 1, p. e634, 2014.
- BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: A WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. 5, p. 510–512, 18 abr. 2009.
- BOREIKO, S.; SILVA, M.; IULEK, J. Structure determination and analyses of the GAPDH from the parasite *Schistosoma mansoni*, the first one from a platyhelminth. **Biochimie**, v. 184, p. 18–25, 1 maio 2021.
- CARUGO, O. Accuracy of AlphaFold models: Comparison with short N...O contacts in atomic resolution protein crystal structures. **Computational Biology and Chemistry**, v. 110, p. 108069, 1 jun. 2024.
- CASTILHO, M. S. *et al.* Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the thioacyl intermediate for the trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-

catalyzed reaction, from its crystal structure. **Biochemistry**, v. 42, n. 23, p. 7143–7151, 17 jun. 2003.

CHEN, R. Q. *et al.* An ignored variable: Solution preparation temperature in protein crystallization. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 19 jan. 2015.

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

CHOI, R. *et al.* Structural Biology and Crystallization Communications Immobilized metal-affinity chromatography protein-recovery screening is predictive of crystallographic structure success. **laboratory communications Acta Cryst**, p. 67, 2011.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12 I, p. 2126–2132, dez. 2004.

ESTEVE-GASENT, M. D. *et al.* Research on Integrated Management for Cattle Fever Ticks and Bovine Babesiosis in the United States and Mexico: Current Status and Opportunities for Binational Coordination. **Pathogens 2020, Vol. 9, Page 871**, v. 9, n. 11, p. 871, 23 out. 2020.

FLEMING, J. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database and 3D-Beacons: New Data and Capabilities. **Journal of Molecular Biology**, v. 437, n. 15, p. 168967, 1 ago. 2025.

FLORIN-CHRISTENSEN, M. *et al.* Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1563–1592, 2014.

FOURRAT, L.; IDDAR, A.; SOUKRI, A. Purification and characterization of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the dromedary camel. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 39, n. 2, p. 148–154, 2007.

GANESH, R. B.; MAERKL, S. J. Biochemistry of Aminoacyl tRNA Synthetase and tRNAs and Their Engineering for Cell-Free and Synthetic Cell Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 918659, 1 jul. 2022.

GLASER, P. E.; GROSS, R. W. Rapid Plasmenylethanolamine-Selective Fusion of Membrane Bilayers Catalyzed by an Isoform of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Discrimination between Glycolytic and Fusogenic Roles of Individual Isoforms. **Biochemistry**, v. 34, n. 38, p. 12193–12203, 1995.

GOMEZ, M. A. R.; IBBA, M. Aminoacyl-tRNA synthetases. **RNA**, v. 26, n. 8, p. 910, 1 ago. 2020.

GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

HAKIMI, H.; VEROCAI, G. G. Babesia bovis. **Trends in Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 708–709, 1 ago. 2023.

HARA, M. R. *et al.* S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **NATURE CELL BIOLOGY**, v. 7, n. 7, p. 665, 2005.

HERNÁNDEZ, C. *et al.* High-Resolution Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in 2 Large Outbreaks of Acute Chagas Disease in Colombia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 8, p. 1252–1255, 15 out. 2016.

HERNÁNDEZ-PRIETO, J. H.; MARTINI, V. P.; IULEK, J. Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Paracoccidioides lutzii* in complex with an aldonic sugar acid. **Biochimie**, v. 218, p. 20–33, 1 mar. 2024.

HU, Q. H. *et al.* Discovery of a potent benzoxaborole-based anti-pneumococcal agent targeting leucyl-tRNA synthetase. **Scientific Reports** 2013 3:1, v. 3, n. 1, p. 2475-, 20 ago. 2013.

ISHITANI, R.; CHUANG, D. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9937–9941, 3 set. 1996.

J. MOSQUEDA *et al.* Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1504–1518, 9 mar. 2012.

JACOB, S. S. *et al.* Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 283, p. 109136, 1 jul. 2020.

_____. Bovine babesiosis in India: Estimation of prevalence by systematic review and meta analysis. **Experimental Parasitology**, v. 239, p. 108318, 1 ago. 2022.

JALOVECKA, M. *et al.* Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 5, p. 356–368, 1 maio 2019.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, 1 dez. 1983.

KALIDAS, S. *et al.* Genetic Validation of Aminoacyl-tRNA Synthetases as Drug Targets in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 4, p. 504, 2014.

KAMINSKY, R.; MÄSER, P. Global impact of parasitic infections and the importance of parasite control. **Frontiers in Parasitology**, v. 4, p. 1546195, 10 mar. 2025.

KANN, S. *et al.* Chagas Disease: Comparison of Therapy with Nifurtimox and Benznidazole in Indigenous Communities in Colombia. **Journal of Clinical Medicine** 2024, Vol. 13, Page 2565, v. 13, n. 9, p. 2565, 26 abr. 2024.

KUSHWAHA, V.; CAPALASH, N. Aminoacyl-tRNA synthetase (AARS) as an attractive drug target in neglected tropical trypanosomatid diseases-Leishmaniasis, Human African Trypanosomiasis and Chagas disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 251, p. 111510, 1 set. 2022.

KWON, N. H.; FOX, P. L.; KIM, S. Aminoacyl-tRNA synthetases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 8, p. 629–650, 1 ago. 2019.

- LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **urn:issn:0021-8898**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.
- MAIN, P. A theoretical comparison of the β,γ' and 2Fo–Fc syntheses. **urn:issn:0567-7394**, v. 35, n. 5, p. 779–785, 1 set. 1979.
- MCCOY, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 13 jul. 2007.
- MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 70, n. 1, p. 2–20, 2014.
- MEYER-SIEGLER, K. *et al.* A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 19, p. 8460–8464, 1 out. 1991.
- MIRANDA, R. R.; SILVA, M.; IULEK, J. Expression, purification, crystallization and structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Candida albicans*, main causative agent of candidiasis. **Chemical Data Collections**, v. 39, p. 100860, 1 jun. 2022.
- MORGAN, C. E. *et al.* Toward structural-omics of the bovine retinal pigment epithelium. **Cell Reports**, v. 41, n. 13, 27 dez. 2022.
- NASIM, F.; QURESHI, I. A. Aminoacyl tRNA Synthetases: Implications of Structural Biology in Drug Development against Trypanosomatid Parasites. **ACS Omega**, v. 8, n. 17, p. 14884–14899, 2 maio 2023.
- NEWBERRY, K. J.; HOU, Y. M.; PERONA, J. J. Structural origins of amino acid selection without editing by cysteinyl-tRNA synthetase. **EMBO Journal**, v. 21, n. 11, p. 2778–2787, 3 jun. 2002.
- NORMAN, F. F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagas disease: Comments on the 2018 PAHO Guidelines for diagnosis and management. **Journal of Travel Medicine**, v. 26, n. 7, 14 out. 2019.
- NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205–217, 8 set. 2000.
- OZUBEK, S. *et al.* Bovine Babesiosis in Turkey: Impact, Current Gaps, and Opportunities for Intervention. **Pathogens 2020, Vol. 9, Page 1041**, v. 9, n. 12, p. 1041, 11 dez. 2020.
- PALENCIA, A. *et al.* Cryptosporidium and Toxoplasma Parasites Are Inhibited by a Benzoxaborole Targeting Leucyl-tRNA Synthetase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5817–5827, 1 out. 2016.
- PANG, L.; WEEKS, S. D.; AERSCHOT, A. VAN. Aminoacyl-tRNA Synthetases as Valuable Targets for Antimicrobial Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 1750**, v. 22, n. 4, p. 1750, 10 fev. 2021.

PEREZ, A. M. *et al.* Thermal stability and structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the coral *Acropora millepora*. **RSC Advances**, v. 11, n. 17, p. 10364–10374, 10 mar. 2021.

PÉREZ DE LEON, A. A. *et al.* Integrated strategy for sustainable cattle fever tick eradication in USA is required to mitigate the impact of global change. **Frontiers in Physiology**, v. 3 JUN, p. 23918, 14 jun. 2012.

PEREZ-CASAL, J.; POTTER, A. A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1012–1017, 17 fev. 2016.

PERONA, J. J.; HADD, A. Structural diversity and protein engineering of the aminoacyl-tRNA Synthetases. **Biochemistry**, v. 51, n. 44, p. 8705–8729, 6 nov. 2012.

PHAM, J. S. *et al.* Aminoacyl-tRNA synthetases as drug targets in eukaryotic parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 1 abr. 2014.

PONTES, V. M. O. DE *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.

READ, R. J. Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. **urn:issn:0108-7673**, v. 42, n. 3, p. 140–149, 1 maio 1986.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, out. 2013.

SCHIMMEL, P. Development of tRNA synthetases and connection to genetic code and disease. **Protein Science**, v. 17, n. 10, p. 1643–1652, 1 out. 2008.

SEIDLER, N. W. GAPDH: Biological Properties and Diversity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 985, 2013.

SHOSHAN, M. C. MINI-REVIEW 3-bromopyruvate: Targets and outcomes. 2012.

SINGH, K. *et al.* Economic impact of predominant ticks and tick-borne diseases on Indian dairy production systems. **Experimental Parasitology**, v. 243, p. 108408, 1 dez. 2022.

SINGH, R.; GREEN, M. R. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Science**, v. 259, n. 5093, p. 365–368, 1993.

STARANISO anisotropy & Bayesian estimation server. Disponível em: <https://staraniso.globalphasing.org/staraniso_FAQ.html>. Acesso em: 16 jan. 2026.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **urn:issn:0021-8898**, v. 41, n. 3, p. 641–643, 8 abr. 2008.

SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1–2, p. 109–125, 4 ago. 2011.

- THOMAS, D. B. *et al.* Tracking the Increase of Acaricide Resistance in an Invasive Population of Cattle Fever Ticks (Acari: Ixodidae) and Implementation of Real-Time PCR Assays to Rapidly Genotype Resistance Mutations. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 113, n. 4, p. 298–309, 20 jul. 2020.
- TICKLE, I. J. Statistical quality indicators for electron-density maps. **urn:issn:0907-4449**, v. 68, n. 4, p. 454–467, 16 mar. 2012a.
- VALDAR, W. S. J. Scoring residue conservation. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 48, n. 2, p. 227–241, 1 ago. 2002.
- WEE, J. J.; WEI, G. W. Evaluation of AlphaFold 3's Protein–Protein Complexes for Predicting Binding Free Energy Changes upon Mutation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 64, n. 16, p. 6676–6683, 26 ago. 2024.
- WEISS, L. M. Zoonotic parasitic diseases: Emerging issues and problems. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1209–1210, 1 set. 2008.
- WESTBROOK, J. *et al.* Validation of Protein Structures for Protein Data Bank. **Methods in Enzymology**, v. 374, p. 370–385, 1 jan. 2003.
- WILKINS, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 112, p. 531–552, 1999.
- WINN, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235–242, abr. 2011.
- WLODAWER, A. *et al.* Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. **The FEBS journal**, v. 280, n. 22, p. 5705, nov. 2013.
- WU, Z. S. *et al.* High yield and efficient expression and purification of the human 5-HT_{3A} receptor. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 8, p. 1024–1032, 6 ago. 2015.
- YAMASAKI, M. *et al.* Intracellular diminazene aceturate content and adenosine incorporation in diminazene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* isolate in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 183, p. 92–98, 1 dez. 2017.
- YAREMCHUK, A. *et al.* Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase and its complexes with leucine and a non-hydrolysable leucyl-adenylate analogue. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 56, n. Pt 5, p. 667–669, 2000.
- ZHANG, L. *et al.* Characterization and structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase type 1 from *Escherichia coli*. **Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications**, v. 76, n. Pt 9, p. 406, 1 set. 2020.