

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*:
da sequência à estrutura**

Mestrado em Bioquímica
Bioquímica Médica

Ana Rita Sebastião Mendes Cavaco

Dissertação orientada por:
Doutora Marta Sousa Silva
Doutor Carlos Cordeiro

2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e em particular ao Departamento de Química e Bioquímica por me ter acolhido ao longo dos últimos cinco anos.

A realização deste trabalho não teria sido possível sem os meus dois orientadores, a quem eu gostaria de expressar o meu agradecimento. À Doutora Marta Sousa Silva, por me ter ensinado quase tudo o que sei fazer no laboratório, por ter acreditado em mim, pelo apoio, simpatia e otimismo e por ter acreditado nas minhas ideias. Ao Doutor Carlos Cordeiro, por tudo aquilo que me ensinou, por ter acreditado em mim e nas minhas ideias, por todo o apoio e otimismo e pelas conversas. A ambos tenho ainda a agradecer o facto de me terem dado a oportunidade de descobrir todo um novo mundo que está para lá da bancada.

Quero também agradecer aos restantes elementos do grupo, ao Doutor António Ferreira, pela ajuda prestada com a análise da superfície de proteínas e por ter ajudado sempre a trazer os parasitas para a faculdade e ao Doutor Gonçalo Costa pelo apoio, simpatia e conselhos. Aos meus colegas, Tiago, Susana e Katja, pelo apoio, pela paciência, pela palhaçada, por se terem tornado, mais do que colegas, bons amigos para a vida.

Quero também prestar a minha gratidão para com o grupo de Parasitologia Molecular do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto. Em particular, agradeço à Doutora Ana Tomás, enquanto chefe do grupo, pela cedência dos parasitas e à Doutora Helena Castro, pela transfeção e pelo crescimento dos mesmos.

Porque a experiência universitária e a minha vida nunca teriam sido as mesmas sem eles, quero agradecer a todos os membros do G2: Andreia, Carolina, Catarina e Rafael, pela amizade, pela paciência, pelo apoio, pelos momentos de relativa palermice e pontual procrastinação. Quero ainda agradecer a um membro extra-G2, Fadhil, com ênfase nos momentos de pontual procrastinação. Obrigada por estarem sempre do meu lado e venham mais anos disto.

Finalmente, em último mas nunca derradeiro lugar, quero agradecer à minha família por todo o apoio que me deram ao longo do meu percurso. Aos meus pais, a quem todo o agradecimento é pouco, por me terem dado sempre total apoio e liberdade para seguir os meus próprios objetivos, pela paciência e por me terem sempre motivado quando eu precisei. À minha irmã, por todo o apoio e amor incondicionais, até ao ponto de me trazer *snacks* enquanto eu escrevia.

Resumo

O óxido nítrico (NO) tem um grande impacto nos seres vivos. No Homem, o NO participa em vários processos fisiológicos, como a regulação da pressão sanguínea, a neurotransmissão e a resposta imune. Nestes processos, o NO funciona como uma molécula sinalizadora. No entanto, em níveis mais elevados, este radical pode ter efeitos tóxicos nas células, fazendo parte da resposta de defesa contra microrganismos patogénicos. De facto, há um consenso de que, nas infeções por *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, o NO produzido pelos macrófagos infetados medeia a morte dos parasitas. Em parasitas do género *Leishmania*, o NO é ainda importante na interação entre o parasita e o hospedeiro. Para além disso, sabe-se atualmente que a concentração de NO produzido pelos parasitas varia ao longo do seu ciclo de vida, sendo tanto maior quanto maior é a sua infetividade. Assim, o NO assume um papel importante no estabelecimento da infeção por *Leishmania*. O enzima sintase do óxido nítrico (NOS, EC: 1.14.13.39), que catalisa a reação de formação de NO a partir de L-arginina, é, portanto essencial para o parasita. Atualmente, sabe-se que não existe homologia de sequência entre o NOS de *Leishmania infantum* (LiNOS) e de humano. Neste sentido, o LiNOS surge como um potencial alvo terapêutico para o combate da leishmaniose visceral, doença pela qual o parasita é responsável.

Neste projeto foi demonstrado, pela primeira vez, que o LiNOS expresso nativamente forma um homotetrâmero. Foi ainda possível concluir que o tetrâmero de LiNOS é estabilizado na presença de heme e de tetrahidrobiopterina.

Através da análise da sequência da proteína em estudo, foi prevista a existência de uma região desordenada entre os resíduos 210 e 270 e de um segmento transmembranar entre os resíduos 424 e 446. Na análise das regiões desordenadas do LiNOS, foi também identificado um local de ligação a montante e/ou a jusante desta região, sendo esta ligação potencialmente estabelecida com a caveolina.

A estrutura tridimensional do monómero de LiNOS foi ainda prevista por homologia, tendo sido possível prevê-la para a maioria da sequência (resíduos 95-584).

Os resultados obtidos permitiram gerar informação crucial para dirigir os próximos passos experimentais no sentido da sua elucidação total, assim como de outros aspetos relacionados com a função.

Palavras-chave: sintase do óxido nítrico, *Leishmania infantum*, estrutura, análise bioinformática, espectrometria de massa

Abstract

Nitric oxide (NO) exerts a great impact on living beings. On human cells, NO participates in several physiological processes, such as blood pressure regulation, neurotransmission and immune response. In these processes, NO works as a signaling molecule. However, when in higher levels, this radical can exert toxic effects on cells as part of the immune response against pathogenic microorganisms. In fact, that is a consensus that, in infections by *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, NO produced by infected macrophages mediates parasite death. In *Leishmania* genus parasites, NO is also important for the parasite-host interaction. Besides, it is now known that the concentration of NO produced by the parasites varies during its life cycle and it increases as the parasite's infectivity increases. Hence, NO plays an important role on the establishment of the infection by *Leishmania*. The enzyme nitric oxide synthase (NOS, EC: 1.14.13.39), which catalyzes the synthesis of NO from L-arginine, is essential for the parasite. At this time, it is known that *Leishmania infantum* NOS (*LiNOS*) has no sequence homology with human NOS. Therefore, *LiNOS* arises as a potential therapeutic target for the treatment of visceral leishmaniasis, the disease for which the parasite is responsible.

It was established during this project, for the first time, that natively expressed *LiNOS* folds as a homotetramer. It was also possible to conclude that the tetramer is stabilized when in presence of heme and tetrahydrobiopterine.

A protein sequence analysis revealed the existence of a disordered region between residues 210 and 270 and a transmembrane region between residues 424 and 446 was predicted. When analysing disordered regions in *LiNOS* a potential binding site upstream and/or downstream the predicted region was identified and the bond might be established with caveoline.

The tridimensional structure of *LiNOS* monomer was predicted by homology, and it was possible to predict it for the majority of the sequence (residues 95 to 584).

The acquired results led to the generation of crucial information to lead the next experimental steps for the structure's complete elucidation, as well as other function related aspects.

Key words: nitric oxide synthase, *Leishmania infantum*, structure, bioinformatics analysis, mass spectrometry

Abreviaturas

BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
eNOS	NOS endotelial
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FT	<i>Flow-through</i>
FMN	<i>Flavin mononucleotid</i>
FTICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
HCA	<i>Hydrophobic Cluster Analysis</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
iNOS	NOS indutível
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L-Arg	L-arginina
LB	Luria-Bertani
L-Cit	L-citrulina
LiNOS	NOS de Leishmania infantum
L-NAME	<i>N-nitro-L-arginine methyl ester</i>
LT-PAGE	<i>Low temperature SDS-PAGE</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
Met-Hb	Metahemoglobina
MS	Espectrometria de massa
Myr	Miristoilação
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NNA	<i>N-nitro-L-arginine</i>
nNOS	NOS neuronal
NOS	Sintase do óxido nítrico
Palm	Palmitoilação
PDZ	<i>PSD-95 discs large / ZO-1 homology</i>
PSD-95	<i>Post synaptic density protein 95</i>
Oxi-Hb	Oxihemoglobina
PBS	Tampão fosfato salino
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	Tampão Tris salino
TBST	TBS com tween 20
TCA	Ácido tricloroacético

V	Velocidade limite
VIH	Virus da imunodeficiência Humana
ZIP	<i>Zippers</i> de leucina

Índice

1	– Introdução	10
1.1	– O sintase do óxido nítrico (NOS) e a formação de óxido nítrico (NO).....	10
1.1.1	– Isoformas humanas de NOS	13
1.1.2	– Síntese e sinalização do NO em tripanossomatídeos.....	15
1.2	– Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	17
1.3	– Leishmaniose visceral.....	20
1.3.1	– Leishmaniose visceral enquanto problema de saúde pública.....	22
1.3.2	– Abordagens Terapêuticas Atuais.....	24
1.4	– NOS de <i>Leishmania infantum</i> : um Potencial Alvo Terapêutico	25
2	– Objetivos	26
3	– Material e Métodos.....	27
3.1	– Expressão do NOS recombinante de <i>Leishmania infantum</i>	27
3.2	– Preparação do extrato de <i>E. coli</i> BL21-plus a expressar <i>LiNOS</i> recombinante	27
3.3	– Purificação do <i>LiNOS</i> recombinante	28
3.3.1	– Estratégia 1.....	28
3.3.2	– Estratégia 2.....	29
3.4	– Crescimento dos parasitas <i>Leishmania infantum</i>	29
3.5	– Preparação dos extratos proteicos de <i>Leishmania infantum</i>	30
3.6	– Purificação do <i>LiNOS</i> a partir do extrato de <i>Leishmania infantum</i>	30
3.6.1	– Estratégia 1.....	30
3.6.2	– Estratégia 2.....	30
3.6.3	– Estratégia 3.....	31
3.7	– Estudo da estrutura quaternária do <i>LiNOS</i>	31
3.8	– Estudo da influência do BH ₄ e da hemina na estrutura quaternária do <i>LiNOS</i>	32
3.9	– Hidrólise das proteínas e análise por MALDI-FTICR.....	32
3.10	– SDS-PAGE	33
3.11	– LT-PAGE.....	34
3.12	– Análise por <i>Western Blot</i>	34
3.13	– Doseamento proteico	35
3.14	– Ensaio cinéticos	35
3.15	– Estudos estruturais <i>in silico</i>	36
3.15.1	– Organização da proteína em domínios	36
3.15.2	– Previsão das regiões desordenadas	36

3.15.3	- Previsão da estrutura da proteína	37
4	- Resultados e Discussão.....	38
4.1	- Otimização da purificação do <i>LiNOS</i> recombinante	38
4.2	- Otimização da purificação do <i>LiNOS</i> de <i>Leishmania infantum</i>	42
4.3	- Caracterização funcional do <i>LiNOS</i>	46
4.3.1	- Determinação dos parâmetros cinéticos	46
4.3.2	- Ensaio cinéticos com o inibidor NNA	47
4.3.3	- Determinação da atividade específica nos parasitas pTEX_NOS	47
4.4	- Estrutura quaternária do <i>LiNOS</i> expresso em <i>Leishmania infantum</i>	48
4.5	- Influência da hemina e do BH ₄ na estrutura quaternária do <i>LiNOS</i>	49
4.6	- Previsão dos domínios do <i>LiNOS</i>	53
4.7	- Organização estrutural e funcional do <i>LiNOS</i>	55
4.8	- Previsão da estrutura da proteína	67
5	- Conclusões e Perspetivas	72
6	- Referências	76
7	- Anexos	84

1 – Introdução

1.1 – O sintase do óxido nítrico (NOS) e a formação de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena com uma enorme importância nos seres vivos. No Homem, o NO exerce vários papéis em processos fisiológicos normais, incluindo a regulação da pressão sanguínea (como vasodilatador), a neurotransmissão e a resposta imune, sendo uma importante molécula sinalizadora (Jing, Q. *et al.* 2014, Tejero, J. & Stuehr, D. 2013, Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* b) 2003). Esta molécula afeta também interações célula-célula, mecanismos homeostáticos (Genestra, M. *et al.* 2006), entre outras funções, dependendo da célula que a produz (Genestra, M. *et al.* b) 2003). A sua produção está implicada na sinalização em numerosos estados de doença (Jing, Q. *et al.* 2014), como choque séptico, acidente vascular cerebral, Diabetes *mellitus* e artrite reumatoide (Genestra, M. *et al.* b) 2003).

A forma clássica de sinalização pelo NO consiste na ativação do enzima guanilato ciclase, que catalisa a formação de cGMP (do inglês *cyclic guanosine monophosphate*). Como consequência, são desencadeadas cascatas de fosforilação, dando origem a uma resposta por parte da célula (Martinez-Ruiz, A. *et al.* 2011). Existem também formas não clássicas de sinalização mediada pelo NO. Por exemplo, esta molécula regula a atividade de várias proteínas através da nitrosilação dos seus grupos tiol (Stuehr, D. J. 1999).

No que diz respeito à resposta imunitária, o NO assume um papel importante na debelação de bactérias, fungos e protozoários no interior da célula fagocitária, como acontece em caso de infeção por *Leishmania* (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Genestra, M. *et al.* c) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997).

O NO é sintetizado a partir da catálise enzimática da L-arginina a L-citrulina pelo enzima sintase do óxido nítrico (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*, EC 1.14.13.39 (Jing, Q. *et al.* 2014, Tejero, J. & Stuehr, D. 2013, Calegari-Silva, T. C. *et al.* 2009, Genestra, M. *et al.* b) 2003, Genestra, M. *et al.* c) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997), (Fig. 1).

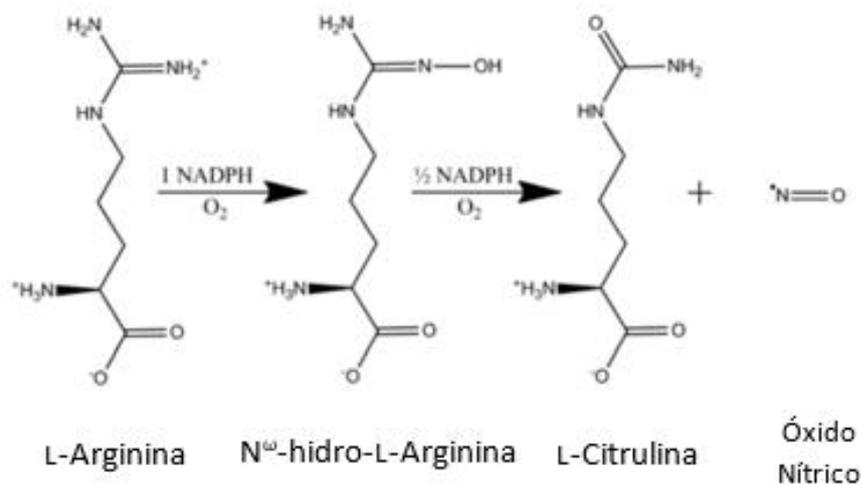


Fig. 1 - Reação catalisada pelo enzima NOS. O substrato (L-Arginina) é convertido a L-Citrulina e NO, havendo formação de um intermediário, a N^ω -hidroxi-L-arginina. Adaptado de Wegener, G. & Volke V. 2010

A oxidação da L-argina a L-citrulina e NO dá-se em dois passos (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013). No primeiro passo, a L-arginina é hidroxilada a N^ω -hidroxi-L-arginina, sendo necessárias uma molécula de NADPH e uma molécula de oxigénio por mol de L-arginina. No segundo passo, a N^ω -hidroxi-L-arginina é oxidada a L-citrulina e NO, sendo necessárias uma molécula de oxigénio e 0,5 de NADPH por mol de N^ω -hidroxi-L-arginina (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013), (Fig. 1).

O enzima NOS humano é uma proteína hémica que está ativa sob a forma de homodímero, distinguindo-se em cada monómero dois domínios (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013), o domínio oxigenase e o domínio redutase. O domínio oxigenase catalisa a oxidação da L-arginina a L-citrulina. Já o domínio redutase, é responsável pela transferência de eletrões para o domínio oxigenase (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013), (Fig. 2).

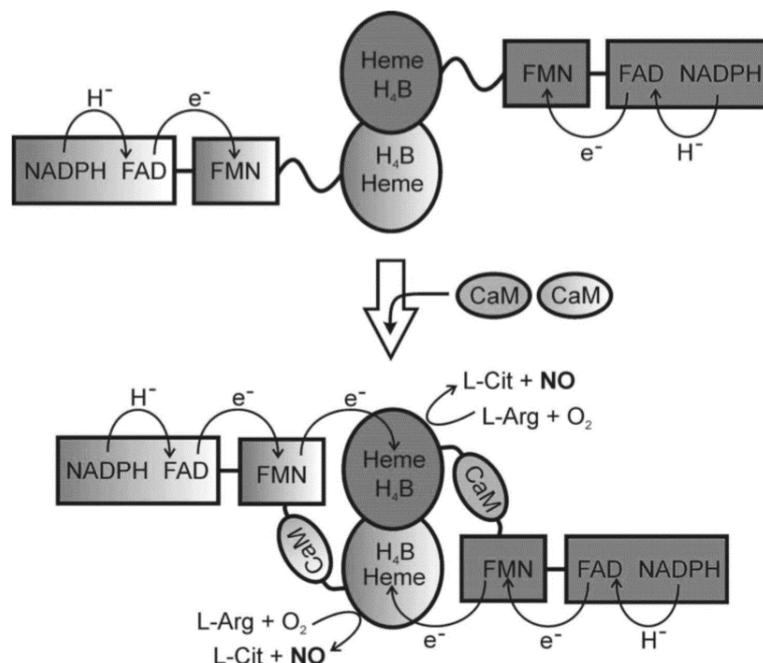


Fig. 2 – Representação esquemática da organização comum do homodímero de NOS humano em domínios e da transferência eletrônica. Retirado de Tejero, J. & Stuehr, D. 2013. Ovais com heme – domínio oxigenase; retângulos – domínio redutase. H₄B, tetrahydrobiopterina (também vulgarmente referida como BH₄); CaM, calmodulina; FAD, dinucleótido de flavina e adenina; FMN, mononucleótido de flavina; NADPH, fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; L-Arg, L-arginina; L-Cit, L-citrulina; NO, óxido nítrico.

O NOS humano é estabilizado pela tetrahydrobiopterina (BH₄), devendo-se a estabilização ao facto de, no domínio oxigenase, esta molécula se ligar à interface de contacto entre os dois monómeros (Fig. 2). Atualmente, sabe-se que é necessária a presença de BH₄ para a síntese de NO, com a estequiometria de uma molécula de BH₄ por subunidade de NOS. Durante a catálise da oxidação da L-arginina, que leva à formação do intermediário da reação, ocorre a formação de um radical BH₄, o que indica o papel ativo do cofator neste passo da formação de NO (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013). O BH₄ tem ainda um papel na oxidação da N^w-hidroxi-L-arginina, dado que direciona a reação para a formação de NO em vez de NO⁻ (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013).

A ligação da calmodulina (CaM) permite a transferência de eletrões a partir do domínio redutase. O NADPH reduz o FAD através da transferência de um hidreto, seguindo-se a transferência de um eletrão para o FMN. A presença de CaM regula, portanto, o enzima (Genestra, M. *et al.* 2006), pois contribui para a estabilização da conformação que permite a transferência do eletrão do FMN para o grupo Heme, permitindo assim a catálise da síntese de NO (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013) (Fig. 2).

O centro ativo do NOS é semelhante ao de outros enzimas hémicos, como o citocromo P450. Nestes enzimas, o centro ativo encontra-se protegido no centro do monómero pelas hélices envolventes (Genestra, M. *et al.* c) 2003) (Fig. 3).

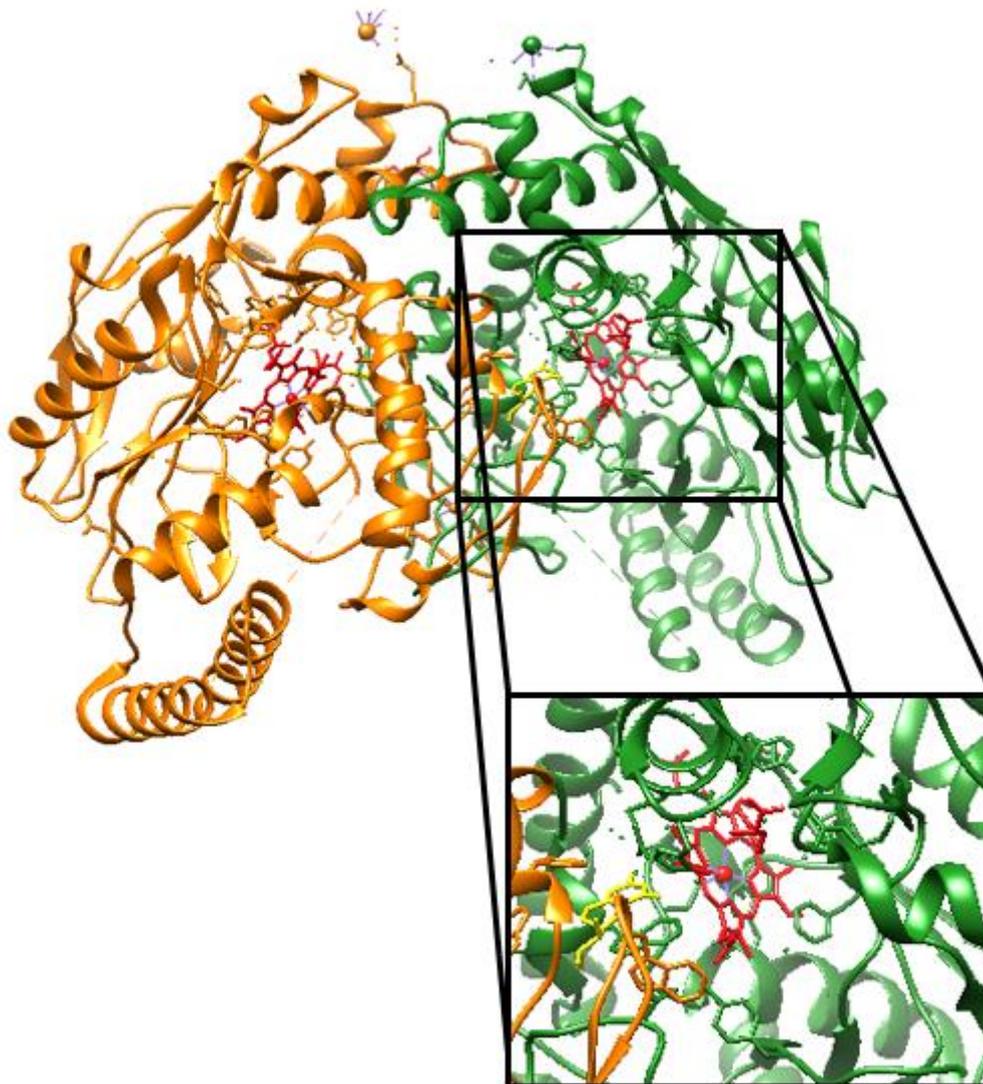


Fig. 3 – Estrutura de uma das isoformas humanas de NOS (neuronal; PDB ID4D1O (Li, H. *et al.* 2014)) com destaque para o seu centro ativo. O grupo Heme encontra-se representado a vermelho; O BH₄ encontra-se representado a amarelo. Imagem preparada utilizando o UCSF Chimera (Pettersen, E. F. *et al.* 2004).

1.1.1 – Isoformas humanas de NOS

No Homem, o enzima NOS existe em três isoformas: neuronal, endotelial e indutível (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013, Genestra, M. *et al.* b) 2003, Genestra, M. *et al.* c) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997). Estas têm homologia de sequência mas diferem no que diz respeito à localização e à regulação (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013, Genestra, M. *et al.* c) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997). Assim, para os enzimas humanos, a sequência de DNA dos genes que codificam para as diferentes isoformas tem uma identidade de 55 a 60%, enquanto que a sequência de DNA dos genes que codificam para a mesma isoforma em diferentes espécies apresenta uma identidade de 85 a 92%. As regiões mais conservadas entre as isoformas encontram-se nos domínios catalíticos. Na região

do C-terminal existe uma elevada identidade de sequência nas três isoformas, sendo esta identidade menor no N-terminal (Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* a) 2003) (Fig. 4).

A isoforma neuronal (NOS-1, NOS tipo 1 ou nNOS, UniProt ID P29475) é expressa principalmente no tecido nervoso. Esta isoforma é citosólica (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997) e o seu monómero apresenta uma massa de 150 a 160kDa (Bredt, D. & Snyder, S. 1990). Na região N-terminal, o nNOS possui um domínio PDZ (do inglês *PSD-95 discs large / ZO-1 homology domain*; PSD-95 significa *post synaptic density protein 95*), (Fig. 4), que permite à proteína ligar-se ao citosqueleto (Ranganathan, R. & Ross, E. M. 1997). Este domínio medeia também a associação do nNOS a membranas (Alderton, W. K. *et al.* 2001).

A isoforma endotelial (NOS-3, NOS tipo 3 ou eNOS, UniProt ID P29474) é encontrada nas células do endotélio vascular e o seu monómero tem uma massa molecular de cerca de 135kDa. O eNOS é alvo de miristoilação e palmitoilação (Fig. 4), duas modificações pós-traducionais que regulam a sua localização na membrana celular (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997), mais precisamente em pequenos microdomínios denominados caveolae (Alderton, W. K. *et al.* 2001).

Tanto a isoforma neuronal como a endotelial são expressas constitutivamente e em ambas a ligação à calmodulina (CaM) é dependente da concentração de cálcio (Ca^{2+}) (Bredt, D. & Snyder, S. 1990, Forstermann, U. *et al.* 1991, Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* a) 2003, Genestra, M. *et al.* b) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997). Na estrutura destas isoformas está presente um *loop* auto-inibitório entre as regiões de ligação do FMN no domínio redutase (Fig. 4).

Existe ainda uma isoforma indutível (NOS-2, NOS tipo 2 ou iNOS, UniProt ID P35228), com massa molecular de 125 a 135kDa para cada monómero. Esta isoforma tem um papel importante na resposta imunitária. A sua expressão, por exemplo, nos macrófagos, pode ser induzida por mediadores inflamatórios (Stuehr, D. *et al.* 1991), ocorrendo a sua regulação principalmente ao nível transcripcional (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013, Genestra, M. *et al.* a) 2003). Apesar de não ser dependente dos níveis fisiológicos de Ca^{2+} , este íão constitui também um cofator do iNOS. A sua localização celular é citosólica (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Basu. N. K. *et al.* 1997).

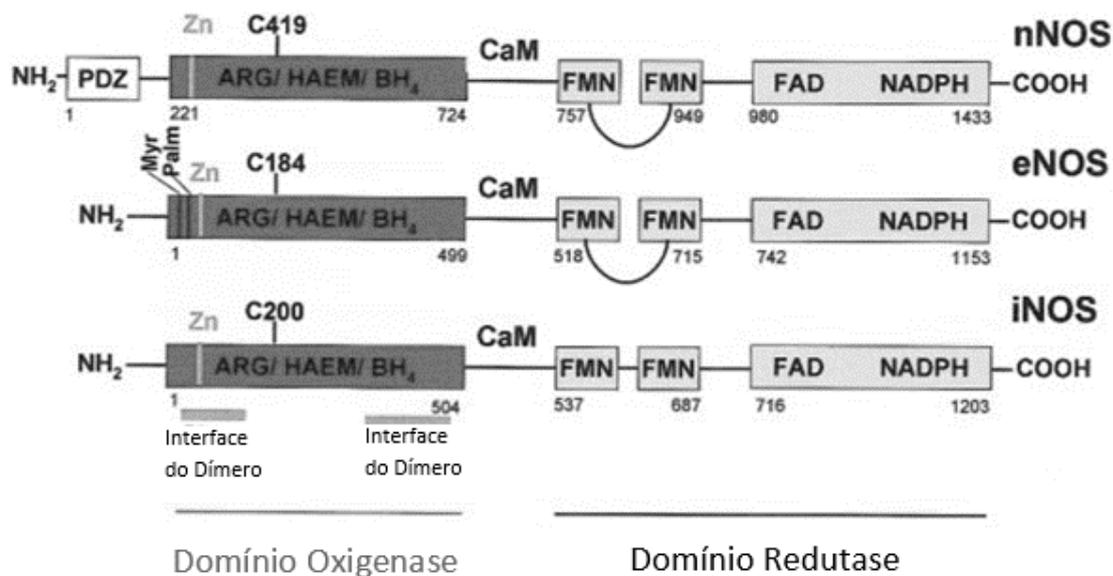


Fig. 4 – Organização e localização dos domínios das três isoformas humanas de NOS com indicação do local de ligação dos cofatores e cosubstratos Heme, tetrahydrobiopterina (BH₄), calmodulina (CaM), FMN, FAD e NADPH, e da L-Arginina (ARG). Os domínios oxigenase, redutase e PDZ (do inglês *PSD-95 discs large / ZO-1 homology domain*) estão representados como retângulos; a posição dos aminoácidos onde inicia/termina o domínio está indicado pelos números; o resíduo de cisteína que estabelece a ligação entre o grupo Heme e o local de ligação à CaM está indicado para cada isoforma; os locais de miristoilação e palmitoilação no eNOS estão representados por Myr e Palm, respectivamente; a posição do resíduo de cisteína que se liga ao zinco está representada para cada isoforma (Zn); Nas isoformas nNOS e eNOS estão representados os *loops* auto-inibitórios entre as regiões onde se liga o FMN no domínio redutase. Adaptado de Alderton, W. K. *et al.* 2001.

1.1.2 – Síntese e sinalização do NO em tripanossomatídeos

A síntese de NO catalisada pelo NOS em mamíferos e invertebrados é vastamente conhecida (Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* a) 2003). No entanto, este mecanismo não está completamente elucidado em tripanossomatídeos, incluindo os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

A primeira evidência de síntese de NO em tripanossomatídeos foi observada em 1995 por Paveto e colaboradores em *Trypanosoma cruzi* (Paveto, C. *et al.* 1995). Mais tarde, em 2003, o NO foi quantificado em várias espécies de *Leishmania* (Genestra, M. *et al.* b) 2003). Neste estudo, os autores sugeriram que a catálise da formação de NO em *Leishmania amazoniensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* requer a presença de Ca²⁺ (Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* b) 2003). Foi ainda observado que, na presença de baixas concentrações de Ca²⁺, a disponibilidade do enzima era menor (Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* a) 2003). Somente em 2010 se descobriu um enzima em *L. infantum* capaz de produzir NO a partir da L-arginina (Silva, F. S. 2010). Trata-se uma proteína com 64 kDa, sem qualquer

homologia com as isoformas humanas. O *LiNOS* é um enzima constitutivo, dependente de cálcio, activo nos diferentes estadios do ciclo de vida de *L. infantum*, e cuja actividade é regulada pelo cofactor tetrahydrobiopterina (Sabino, F. M. R. 2012). Utilizando a proteína recombinante, produzida em bactéria, mostrou-se que este enzima de *L. infantum* forma um homotetrâmero *in vitro* estabilizado pela adição de heme e BH₄ (Sabino, F. M. R. 2012).

A descoberta de um NOS de *Leishmania* constitutivo permite levantar a possibilidade da existência de um tipo semelhante de relação entre o Ca²⁺ e o sistema de sinalização de NO em eucariotas inferiores como *Leishmania* (Basu, N. K. *et al.* 1997).

Atualmente sabe-se que, em *Leishmania*, a produção de NO é importante na interação parasita-hospedeiro (Soares-Bezerra, R. J. *et al.* 2008). Para além disso, já foi observado em *Leishmania amazoniensis* que a produção de NO pelos parasitas é tanto maior quanto maior é o número de promastigotas metacíclicos (estadio em que o parasita se encontra pronto para entrar no organismos do hospedeiro e infetá-lo) em cultura (Genestra, M. *et al.* b) 2003). Foi também observado que amastigotas axénicos desta espécie produzem NO e apresentam atividade de NOS (Soares-Bezerra, R. J. *et al.* 2008, Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* b) 2003), sendo neste estadio que a produção de NO é maior (Genestra, M. *et al.* 2006). Intracelularmente, o NO parece regular alguns processos metabólicos em *L. infantum* através da nitrosilação de proteínas, uma modificação pós-traducional que ocorre em resíduos de cisteína específicos (Nunes, J. P. C. 2013).

As diferenças na produção de NO pelo parasita ao longo do seu ciclo de vida constituem um aspeto importante a ter em conta na investigação e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, uma vez que é no estadio de amastigota que o parasita se encontra quando está no interior das células fagocitárias (McConville, M. J. & Naderer, T. 2011, Dutta, S. *et al.* 2012, Genestra, M. *et al.* 2006). Por outro lado, pode sugerir-se que a produção de NO pela célula do parasita é tanto maior quanto maior é a sua infetividade (Genestra, M. *et al.* b) 2003).

A presença de NOS constitutivo observada em *Leishmania infantum* (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Sabino, F. M. R. 2012) levanta a possibilidade da existência de semelhança e interação entre os sistemas de sinalização de NO das células do hospedeiro (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Genestra, M. *et al.* c) 2003) e de *Leishmania* ou inibição indireta do iNOS pelo NO produzido pelo parasita. A produção de NO pelo parasita pode estar envolvida em: a) internalização do promastigota na célula fagocitária e/ou b) indução da diminuição da produção de NO pelas células fagocitárias (Genestra, M. *et al.* b) 2003, Genestra, M. *et al.* c) 2003), e c) regulação da actividade de proteínas específicas através da nitrosilação (Nunes, J. P. C. 2013).

1.2 - Ciclo de vida de *Leishmania infantum*

Os indivíduos da espécie *Leishmania infantum* são parasitas protozoários (Dea-Ayuela, M. A. *et al.* 2009) pertencentes à família dos tripanossomatídeos (McConville, M. J. & Naderer, T. 2011, Jong, E. C. & McMullen, R. 2003, Desjeux, P. 2004). Estes parasitas são endêmicos na Bacia do Mediterrâneo, sendo nesta região responsáveis pela leishmaniose visceral no Homem e nos cães (Kanellopoulos, P. *et al.* 2014, Moncaz, A. *et al.* 2014, Silva, F. S. 2010). Os parasitas são transmitidos através da picada da mosca da areia (Soares-Bezerra, R. J. *et al.* 2013, Calegari-Silva, T. C. *et al.* 2009, Akopyants, N.S. *et al.* 2009), o principal vetor do parasita (Palatnik-de-Sousa, C. B. & Day, M. J. 2011, Reis, A. B. *et al.* 2010) (Fig. 5), sendo o cão o maior reservatório de infecção para o homem (Maia, C. *et al.* 2013, Lopes, A. P. *et al.* 2013, Figueiredo, M. M. *et al.* 2013).

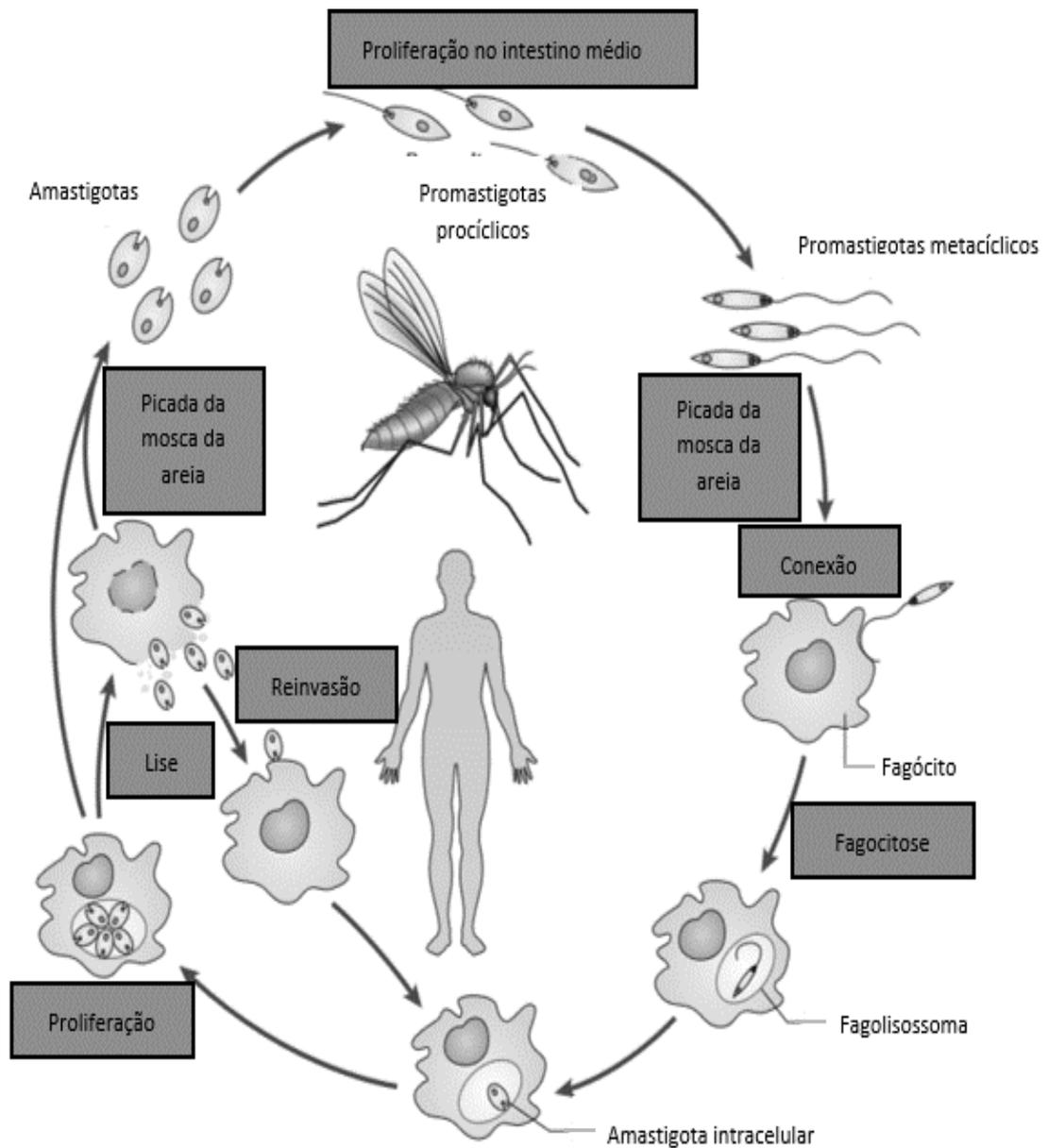


Fig. 5 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Adaptado de Kaye, P. & Scott, P. 2011.

O ciclo de vida dos parasitas do género *Leishmania* (Fig. 5) é heterogéneo e difásico, envolvendo um hospedeiro mamífero e um vetor invertebrado, a mosca da areia do género *Phlebotomus* ou *Lutzomya* (Dea-Ayuela, M. A. *et al.* 2009, Akopyants, N. S. *et al.* 2009). Neste ciclo de vida, o vetor invertebrado desempenha um papel de disseminação, enquanto o hospedeiro permite a proliferação do parasita (Haldar, A. K. *et al.* 2011).

No trato intestinal da mosca, o parasita encontra-se no estadiu de promastigota (Figs. 5 e 6), com uma forma alongada (10-15 μm) e flagelada (Akopyants, N. S. *et al.* 2009). Nesta fase, a sua localização é extracelular e a sua reprodução é sexuada. Posteriormente, dá-se a diferenciação de promastigota procíclico para promastigota metacíclico. Assim, num processo de metaciclogénese, o parasita assume a forma infecciosa para o mamífero, na qual não ocorre divisão celular

(Kaye, P. & Scott, P. 2011). Após este processo, os parasitas migram para a cavidade bucal da mosca, estando prontos para serem injetados no organismo do hospedeiro (Tomás, A. M. & Romão, S. F. 2008, Jong, E. C. & McMullen, R. 2003, Neuber, H. 2008).

Após a picada da mosca, os parasitas, assim como componentes salivares e proteofosfoglicanos parasitários imunomodulatórios (Dea-Ayuela, M. A. *et al.* 2009), passam para a corrente sanguínea do hospedeiro (Fig. 5). Consequentemente, os parasitas são fagocitados e, uma vez no interior das células fagocitárias, dão-se alterações morfológicas e bioquímicas, que levam à sua diferenciação em amastigotas (Figs. 5 e 7). Este processo de diferenciação permite a adaptação ao meio de menor pH das vesículas fagocíticas. Neste estágio, tornam-se parasitas intracelulares obrigatórios. Os amastigotas não possuem flagelo e adotam uma forma circular ou oval e menor que os promastigotas (2-3 μm) (McConville, M. J. & Naderer, T. 2011, Jong, E. C. & McMullen, R. 2003). A proliferação dos parasitas decorre de forma assexuada (McConville, M. J. & Naderer, T. 2011) nos fagolisossomas (Genestra, M. *et al.* a) 2003), até à lise da célula fagocitária (Fig. 5). Na sequência deste fenómeno, os amastigotas passam para a corrente sanguínea e invadem outras células fagocitárias. Aquando de uma nova picada da mosca, esta recolhe células fagocitárias com amastigotas no seu interior. Nas condições do trato intestinal do vetor, os parasitas diferenciam-se novamente em promastigotas (Gilles, H. M. 1999, Tomás, A. M. & Romão, S. F. 2008) e o ciclo recomeça (Fig. 5).

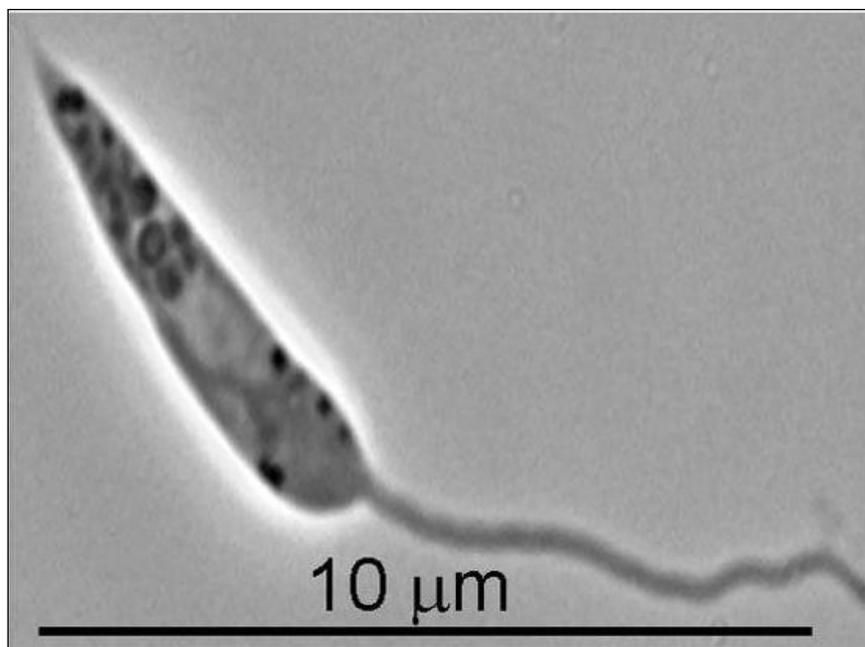


Fig. 6 – *Leishmania infantum* no estágio de promastigota. Adaptado de Dutta, S. *et al.* 2012.

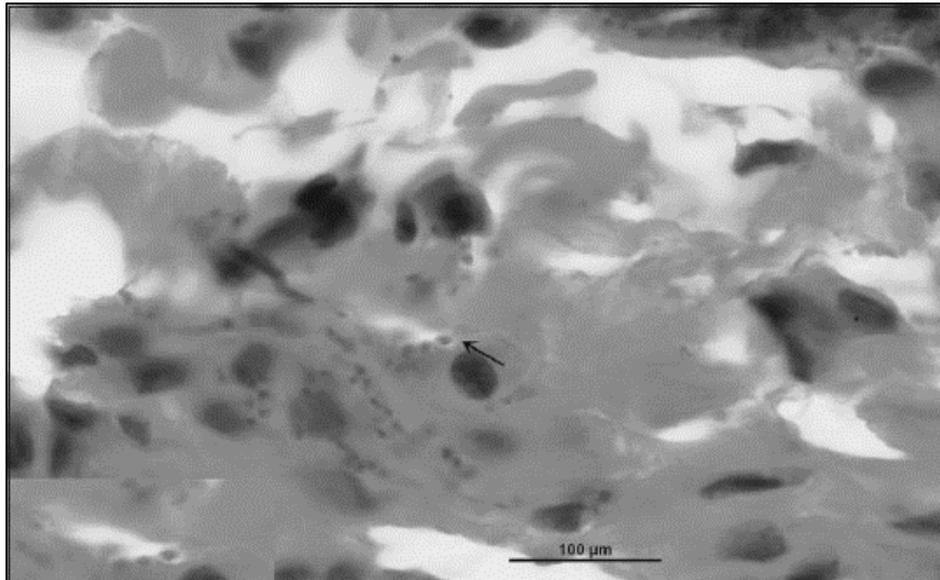


Fig. 7 – *Leishmania infantum* no estadio de amastigota (seta), no interior de macrófagos. Retirado de Hooja, S. *et al.* 2014.

De modo a evadir-se das defesas imunitárias do hospedeiro, o *Leishmania infantum* tem uma variedade de mecanismos de virulência (Ejghal, R. *et al.* 2014, Genestra, M. *et al.* c) 2003), levando à repressão das funções normais das células fagocitárias perante uma infeção (Genestra, M. *et al.* c) 2003). Os parasitas no estadio de promastigota inibem a aquisição de características lisossomais dos fagossomas (Dea-Ayuela, M. A. *et al.* 2009). Entre outros efeitos, estes têm a capacidade de provocar alterações em cascatas de sinalização, levando, por exemplo, à inibição da produção de agentes antimicrobianos, como o NO (Calegari-Silva, T. C. *et al.* 2009). A inibição da produção de NO pode dever-se à regulação da expressão da isoforma indutível do sintase de óxido nítrico pelos proteofosfoglicanos parasitários. Contudo, pouco se sabe acerca dos mecanismos que levam a esta inibição (Genestra, M. *et al.* c) 2003).

O mecanismo de ação do NO sobre o *Leishmania* não se encontra estabelecido. No entanto, sabe-se que o NO pode atuar sinergisticamente com outras espécies reativas de oxigénio na degradação de DNA, proteínas e lípidos. Com efeito, o NO estabelece interações covalentes com o ferro intracelular, interagindo assim com grupos prostéticos de Fe-S de proteínas, levando à sua degradação (Genestra, M. *et al.* b) 2003).

1.3 - Leishmaniose visceral

Como referido, o parasita *L. infantum* é o agente causador da leishmaniose visceral na bacia do Mediterrâneo, também conhecida como kala-azar, a forma mais severa da doença e a mais frequentemente fatal (Ejghal, R. *et al.* 2014). Assim, esta

forma da doença é responsável pela maioria das cerca de 70 000 mortes anuais causadas por leishmaniose (Dea-Ayuela, M. A. *et al.* 2009).

A ocorrência deste tipo de leishmaniose deve-se à invasão do sistema reticuloendotelial do hospedeiro, resultando na danificação de órgãos vitais (Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. 1996, Tiunan, T. S. *et al.* 2011).

Os seus sintomas fazem-se sentir dois a oito meses após a picada da mosca da areia e consistem no aumento de volume do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia), devido à proliferação dos parasitas nos macrófagos nestes órgãos (Jong, E. C. & McMullen, R. 2003, Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. 1996, Tiunan, T. S. *et al.* 2011, Palatnik-de-Sousa, C. B. & Day, M. J. 2011).

No caso de não tratamento da doença, dada a danificação que ocorre no fígado e no baço, pode observar-se a ocorrência de efeitos colaterais, como febres altas, redução da imunidade celular, hiperglobulinémia, pancitopenia, xerose e anemia (Jong, E. C. & McMullen, R. 2003, Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. 1996, Tiunan, T. S. *et al.* 2011, Palatnik-de-Sousa, C. B. & Day, M. J. 2011). Nesta situação a doença evoluiu para uma leishmaniose visceral sistémica (Savoia, D. 2015). O desenvolvimento de xerose, assim como o aumento da atividade melanoblástica, levam ao escurecimento da pele. Este fenómeno está por detrás da designação *kalaazar*, que significa febre negra (Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. 1996, Tiunan, T. S. *et al.* 2011). A leishmaniose visceral tem uma maior incidência no Este de África, no subcontinente indiano (causada pelo *Leishmania donovani*), na Ásia central, na América Latina (causada pelo *Leishmania chagasi*) e na Bacia do mediterrâneo (causada pelo *Leishmania infantum*) (Moncaz, A. *et al.* 2014, Silva, F. S. 2010) (Fig. 8).

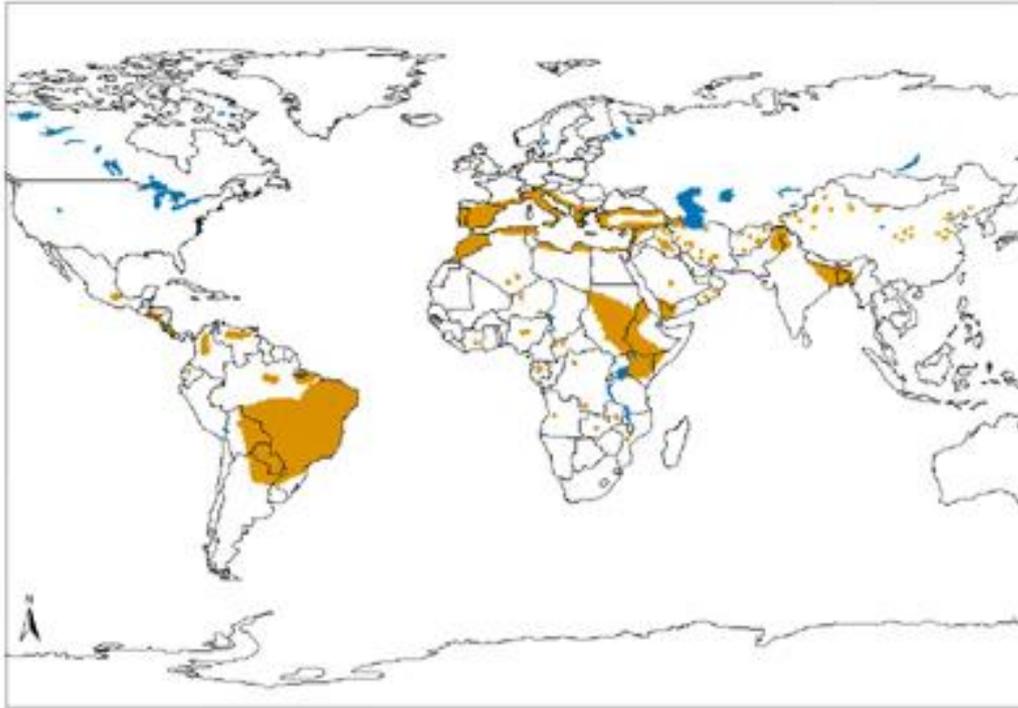


Fig. 8 – Distribuição geográfica da incidência de leishmaniose visceral a nível mundial. Dados de 2010. Retirado de World Health Organization, 2010.

1.3.1 – Leishmaniose visceral enquanto problema de saúde pública

Em 61 países de quatro continentes, cerca de 200 milhões de pessoas estão em risco. A incidência da leishmaniose visceral é de cerca de 0,5 milhões de casos por ano, continuando a ser um problema de saúde pública em muitos países (Ejghal, R. *et al.* 2014).

Enquanto o *Leishmania donovani* pode afetar igualmente indivíduos de qualquer faixa etária (Chappuis, F. *et al.* 2007), o parasita *L. infantum* infeta mais frequentemente indivíduos mais novos e/ou imunossuprimidos (Palatnik-de-Sousa, C. B. & Day, M. J. 2011, Quinnell, R. J. & Courtenay, O. 2009). No que diz respeito à debilidade do sistema imunitário no contexto da leishmaniose visceral, é de destacar a co-infecção por *L. infantum* e VIH. No caso da Europa, este aspeto confere à leishmaniose visceral uma importância crescente. Entre o início da década de 80 e 2001, foram observados mais de 1900 casos de co-infecção. Em muitos doentes, observou-se que a infeção por *L. infantum* acontecera anteriormente à infeção por VIH. Desta forma, pode considerar-se o *L. infantum* um parasita oportunista, uma vez que, anteriormente à infeção por VIH, estes doentes não apresentavam quaisquer sintomas de leishmaniose visceral, que apenas se começaram a manifestar após a infeção pelo vírus (Dujardin, J. C. *et al.* 2008).

Esta questão ganha uma dimensão superior nas regiões onde o risco do aumento da proliferação do parasita e do aumento do número de indivíduos

assintomáticos é maior. Este risco deve-se ao controlo insuficiente tanto do vetor, como do principal hospedeiro, o cão. Para além disso, a propagação da área de atividade humana, nomeadamente urbanização e desflorestação, também contribui para o aumento da área de risco de proliferação do *L. infantum* (Moncaz, A. *et al.* 2014, Silva, F. S. 2010).

Desta forma, a leishmaniose visceral continua a ser um problema crescente de saúde pública, que requiere medidas de prevenção. As medidas de prevenção passam pelo controlo das populações de mosca da areia e do cão, enquanto maior reservatório de transmissão do parasita ao homem, e da utilização de redes mosquiteiras impregnadas em inseticida. No que diz respeito ao vetor, o seu controlo consiste na utilização de DDT (dicloro-difenil-dicloroetano, do inglês: *dichloro-diphenyl-trichloroethane*) em quantidades residuais nas casas nos abrigos de animais. No caso do cão, o controlo deve passar pelo condicionamento da reprodução e pela vacinação, apesar de esta não ser ainda completamente eficaz (Chappuis, F. *et al.* 2007).

1.3.2 - Abordagens Terapêuticas Atuais

As terapias e vacinas que existem atualmente para a combater e prevenir as infeções causadas por *L. infantum* não são totalmente eficazes.

Sabe-se que uma grande parte dos antigénios dos parasitas estão identificados, o que permite o desenvolvimento de vacinas específicas para impedir a infeção por diferentes espécies de *Leishmania*. Contudo, o facto de a incidência desta doença ocorrer maioritariamente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, faz com que a investigação e produção destas vacinas se torne mais difícil e que a leishmaniose continue a ser uma doença negligenciada (Palatnik-de-Sousa, C. B. & Day, M. J. 2011). Assim, a prática mais comum de imunização da população passa por um processo de “leishmanização”, em que os indivíduos são inoculados com parasitas intactos, crescidos em cultura. No entanto, dada a heterogeneidade de fatores que levam às diferentes reações do organismo do hospedeiro à presença do parasita, é difícil prever o desfecho desta imunização (Kaye, P. M. & Aebischer, T. 2011), variando a sua eficiência entre 0 e 6% no caso da leishmaniose visceral (Coler, R. N. & Reed, S. G. 2005).

As principais limitações das terapêuticas existentes relacionam-se com a toxicidade, a resistência do parasita e o elevado custo monetário (Sundar, S. *et al.* 2008).

Os compostos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose visceral inibem, de forma ainda desconhecida, o metabolismo glicolítico e de ácidos gordos do parasita (Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. 1996, Goto, H. & Lindoso, J. A. 2010). Estes compostos estão associados a uma elevada toxicidade. Consequentemente, a sua aplicação é responsável por uma taxa de mortalidade de 3 a 5% (Sundar, S. *et al.* 2008).

Na Europa são principalmente usadas soluções lipossomais de Anfotericina B (Chappuis, F. *et al.* 2007, Goto, H. & Lindoso, J. A. 2010). Estes fármacos têm como alvo o ergosterol existente na parede celular da célula do parasita, aumentando a sua permeabilidade e, consequentemente, causando o seu rebentamento (Goto, H. & Lindoso, J. A. 2010). Este medicamento está também associado a toxicidade e ocorrência de efeitos secundários. Para além disso, o seu custo monetário é muito elevado, o que inviabiliza a sua disseminação nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Sundar, S. *et al.* 2008, Goto, H. & Lindoso, J. A. 2010).

Ao longo do tempo, tem-se vindo a observar que os parasitas desenvolvem resistência aos fármacos existentes, nomeadamente devido ao uso prolongado que é exigido pelas características da doença (Sundar, S. *et al.* 2008, Genestra, M. *et al.* c) 2003). Os principais mecanismos envolvidos na resistência do parasita aos fármacos consistem na alteração da permeabilidade da membrana celular, que resulta na diminuição do influxo da molécula do fármaco na célula, assim como em modificações qualitativas ou quantitativas no alvo terapêutico (Genestra, M. *et al.* c) 2003).

Por último, nenhum dos medicamentos existentes atualmente para o tratamento da leishmaniose visceral leva à sua cura completa (Goto, H. & Lindoso, J. A. 2010).

Tendo em conta as limitações das terapêuticas aplicadas atualmente, existe uma necessidade premente de encontrar novos alvos terapêuticos para o combate das infecções causadas por *L. infantum*. A pesquisa deste alvo terapêutico deve ser feita no sentido de diminuir a toxicidade e a resistência dos parasitas ao tratamento e ainda permitir que a sua acessibilidade seja a maior possível.

1.4 - NOS de *Leishmania infantum*: um Potencial Alvo Terapêutico

No desenvolvimento de novos fármacos, torna-se vantajoso tomar partido das diferenças bioquímicas entre o parasita e o hospedeiro, nomeadamente ao nível do metabolismo e do proteoma.

Na procura de um novo alvo terapêutico, o enzima NOS de *L. infantum* surge como um potencial alvo terapêutico para a leishmaniose visceral, uma vez que este enzima não possui homologia de sequência com qualquer isoforma do NOS humano (Silva, F. S. 2010).

Desta forma, pode levantar-se a hipótese de ser possível inibir o NOS de *Leishmania infantum* sem inibir o NOS humano com o objetivo de debelar o parasita.

A sua caracterização funcional também foi realizada, constatando-se que é funcionalmente semelhante ao NOS de mamífero e necessita dos mesmos cofatores e cosubstratos para que a sua atividade seja máxima (Silva, F. S. 2010, Sabino, F. M. R. 2012).

Genestra, M. e colaboradores observaram que, quando os parasitas de *Leishmania* cresciam num meio com L-NAME, um análogo da L-arginina que inibe o NOS, a percentagem de macrófagos de murganho infetados decrescia de 93% para 6% (Genestra, M. *et al.* a) 2003). Estes resultados sugerem que a formação de NO pelo parasita é importante para o estabelecimento da infeção. Por outro lado, sabe-se que em *L. infantum*, o NO reage com proteínas através de um processo denominado nitrosilação, possivelmente regulando a sua função (Nunes, J. P. C. 2013). De entre as proteínas nitrosiladas identificadas, destacam-se os processos de *fold*ing proteico, a resposta ao stress e o metabolismo dos glúcidos (Nunes, J. P. C. 2013). Assim, estas observações corroboram a hipótese de que o NOS de *Leishmania infantum* tem um elevado potencial como alvo terapêutico na leishmaniose visceral.

2 – Objetivos

Atualmente, sabe-se que existem evidências acerca da existência de uma via L-arginina/NO em *Leishmania*, assim como da importância do NO no estabelecimento da infecção pelo parasita. Neste contexto, torna-se essencial o estudo da formação de NO em *Leishmania infantum* e, portanto, do enzima *LiNOS*.

Assim, o objetivo deste projeto foi, numa primeira análise, a caracterização do *LiNOS* ao nível funcional e estrutural. No que diz respeito ao estudo funcional, pretendeu-se fazer a caracterização cinética do enzima e da composição em domínios. Quanto à caracterização estrutural, pretendeu-se estudar a arquitetura dos seus domínios e fazer uma aproximação às suas estruturas terciária e quaternária.

A longo prazo, este projeto tem como objetivo a identificação do *LiNOS* como alvo terapêutico da leishmaniose visceral.

3 – Material e Métodos

3.1 - Expressão do NOS recombinante de *Leishmania infantum*

De modo a escolher a colónia com maior expressão de NOS de *Leishmania infantum* (*LiNOS*) recombinante (com uma cauda de 6 histidinas no N-terminal), foi realizado um teste de expressão com 9 colónias diferentes de *E. coli* BL21-plus transformadas anteriormente como descrito em (Silva, F. S. 2010). Para esse efeito foram preparadas pré-culturas de 3mL e crescidas *over-night* a 37°C em meio LB (NZYTech), suplementado com 30µg/µL cloranfenicol (Sigma), 15µg/µL canamicina (Sigma) e 0,1% (m/v) glucose. Após o crescimento mediu-se a densidade óptica a 600nm de cada cultura, tendo-se seleccionado as 4 que apresentavam um crescimento mais elevado. Seguidamente, as culturas seleccionadas foram utilizadas para inocular 10mL de meio LB suplementado da mesma forma que a pré-cultura, de modo a obter uma suspensão com OD_{600nm} de aproximadamente 0,1. As culturas foram crescidas a 37°C até atingirem a fase exponencial (OD_{600nm} entre 0,4 e 0,6) e a expressão foi induzida com 0,2mM IPTG e 6µM hemina durante 3 horas a 37°C.

Após o crescimento, separou-se, por centrifugação (10min, 7000rpm, 4°C), o meio de cultura das células que foram ressuspensas em PBS (10mM Na₂HPO₄.7H₂O, 1,8mM KH₂PO₄, 136,8mM NaCl, 2,7mM KCl) pH7,4 à razão de 50mL por litro de cultura. De seguida, as células foram rebentadas por sonicação (Sonicador UP200S, Hielscher Ultrasound Technology), (15x, amplitude de 70%, ciclos de 0,7 durante 10s) e foram separadas as fracções solúvel e insolúvel por centrifugação (15min, 10000rpm, 4°C). A fracção solúvel é constituída pelo sobrenadante e a fracção insolúvel pelo *pellet*, tendo este sido ressuscendido em PBS pH 7,4 à mesma razão utilizada anteriormente. As fracções total (anterior à separação), solúvel e insolúvel das culturas seleccionadas foram analisadas por SDS-PAGE, tendo-se seleccionado as duas culturas que apresentavam uma maior expressão de *LiNOS*.

3.2 - Preparação do extrato de *E. coli* BL21-plus a expressar *LiNOS* recombinante

Após a seleção das culturas, foi feito o *scale up* para 1L nas mesmas condições de crescimento. Depois de separadas as células do meio, os *pellets* foram ressuscendidos em PBS pH 7,4 e as células foram lisadas como referido na secção anterior. O lisado celular foi centrifugado (15min, 13000g, 4°C), tendo-se eliminado o sobrenadante, uma vez que se observou que o *LiNOS* recombinante é uma proteína insolúvel.

De forma a recuperar a proteína do *pellet*, este foi suspenso, sequencialmente, em PBS pH 7,4 com 4M ureia e PBS pH 7,4 com 8M ureia, tendo sido realizadas centrifugações intermédias (7min, 13000g, 4°C). A obtenção do *LiNOS* nas frações solubilizadas com ureia foi monitorizada por SDS-PAGE.

3.3 - Purificação do *LiNOS* recombinante

O processo de purificação foi realizado, tirando partido do facto de ter sido introduzido uma cauda de seis resíduos de histidina na sequência da proteína. Foram utilizadas duas estratégias, uma em que a proteína foi purificada na sua forma renaturada (após eliminação da ureia), e outra em que a proteína foi purificada na forma desnaturada.

3.3.1 – Estratégia 1

De modo a proceder à purificação de *LiNOS* recombinante presente no sobrenadante obtido após a centrifugação do *pellet* ressuspenso em PBS pH 7,4 com 8M ureia, começou-se por realizar uma diálise com o objetivo de retirar a ureia do meio, levando à renaturação da proteína. A diálise foi realizada com membranas pré-ativadas (Snake Skin, Pierce) contra PBS pH 7,4 com concentrações decrescentes de ureia: 4M, 2M e 1M, tendo o último passo decorrido na ausência de Ureia. Às últimas duas soluções de diálise acrescentou-se BH_4 a uma concentração final de 5 μM , de modo a estabilizar a estrutura quaternária da proteína. Cada incubação decorreu a 4°C com agitação, durante cerca de 12h.

De seguida, procedeu-se a uma cromatografia de afinidade, usando *beads* magnéticas revestidas de níquel (PureProteomeTM, Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, a solução contendo a proteína foi incubada com as *beads* (previamente equilibradas em PBS pH 7,4) durante 2h, à temperatura ambiente, com ligeira agitação, com a razão de 330 μL de *beads* para 10mL de solução proteica. A eluição do enzima foi feita incubando as *beads* durante 2min à temperatura ambiente com ligeira agitação, em PBS pH 7,4 com concentrações crescentes de imidazole (5mM, 25mM, 50mM, 250mM, 500mM e 1M) à razão de 4mL de tampão para 30mL de extrato. Na última incubação foi acrescentado BH_4 numa concentração final de 5 μM .

Após a cromatografia, as frações recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot* (com um anticorpo anti-*LiNOS*), de modo a localizar as frações onde o *LiNOS* foi obtido. Consequentemente, as frações selecionadas foram agrupadas e a proteína foi concentrada com recurso a amicons ultra de *cut-off* 50kDa (Millipore).

3.3.2 – Estratégia 2

De modo a proceder à purificação do enzima, que se encontra no sobrenadante obtido após ressuspensão do *pellet* em PBS pH 7,4 com 8M ureia, recorreu-se a um processo de cromatografia de afinidade em *batch*. A resina Ni-NTA agarose (Quiagen) foi equilibrada em PBS pH 7,4 com 8M ureia, tendo-se deixado a resina assentar. Este processo foi repetido duas vezes. De seguida, o sobrenadante foi incubado com a resina à razão de 1mL de resina para 22,5mL de sobrenadante, durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação. A mistura foi colocada num suporte (coluna) e a eluição do enzima foi realizada com PBS pH 7,4 com 8M ureia e concentrações crescentes de imidazolo: 5mM, 250mM, 500mM e 1M, tendo sido usados 4 volumes de coluna para cada concentração de imidazolo. As frações contendo o *LiNOS* foram identificadas por SDS-PAGE.

As frações contendo o *LiNOS* foram agrupadas e foi feita uma diálise para retirar a ureia da solução, diminuindo gradualmente a concentração de ureia na solução, de modo semelhante ao realizado na estratégia 1.

Após a diálise, a proteína foi concentrada do mesmo modo ao realizado na estratégia 1.

3.4 - Crescimento dos parasitas *Leishmania infantum*

Os parasitas *wild-type (WT) Leishmania infantum* em estadio promastigota (clone MHOM/MA67ITMAP263), foram crescidos a 25°C em meio RPMI 1640 com GlutaMAX (Invitrogen), suplementado como descrito em (Silva, M. S. *et al*, 2005), de forma a obter um total de 1×10^9 células.

Os parasitas transfetados pTEX_NOS e pTEX_NOS-His6 (Sabino, F. M. R., 2012) cresceram em placas com agar contendo 15µg/mL geneticina (Sigma), 10µg/mL higromicina (Invitrogen) e 17,5µg/mL pleomocina (Sigma). Após 2 a 3 semanas, as colónias foram recolhidas e transferidas para meio líquido. O restante procedimento é idêntico ao realizado para os parasitas *WT*, mas mantendo os antibióticos no meio de cultura.

As culturas de parasitas *WT* e transfetados (pTEX_NOS e pTEX_NOS-His6) foram fornecidos sob a forma de *pellet* pelo grupo de Parasitologia Molecular do IBMC, Porto.

3.5 - Preparação dos extratos proteicos de *Leishmania infantum*

As células foram ressuspensas em PBS pH 7,4 à razão de 50mL por litro de cultura e foram lisadas por sonicação (15x, amplitude de 70%, ciclos de 0,7s durante 10s). O lisado celular foi centrifugado (10000rpm, 4^oC, 15min), tendo-se recolhido o sobrenadante, uma vez que o *LiNOS* é uma proteína solúvel quando expressa no parasita.

3.6 - Purificação do *LiNOS* a partir do extrato de *Leishmania infantum*

Para a purificação do *LiNOS* nativo, foram utilizadas duas linhas celulares parasitas transfetados, pTEX_NOS-His6 e pTEX_NOS. Na primeira, a proteína foi expressa com uma sequência de 6 histidinas no N-terminal, sendo purificada por cromatografia de afinidade. Na segunda, a proteína foi expressa sem qualquer *tag*, sendo purificada por duas abordagens diferentes.

3.6.1 – Estratégia 1

As proteínas de menor dimensão foram eliminadas do extrato com recurso a amicons ultra com *cut-off* de 50kDa.

O extrato foi, de seguida, purificado com recurso a cromatografia de afinidade. O procedimento utilizado é idêntico ao indicado na estratégia 2 da purificação da proteína recombinante, com a diferença de que o tampão utilizado na purificação a partir do extrato de *Leishmania infantum* não continha ureia, dada a solubilidade da proteína.

As frações contendo a proteína (identificadas por SDS-PAGE e *western blot*) foram agrupadas e a proteína foi doseada, à semelhança do que foi feito para a proteína recombinante.

3.6.2 – Estratégia 2

As proteínas de dimensão inferior a 50kDa foram eliminadas do extrato, à semelhança da estratégia 1.

De seguida, recorreu-se a um processo de precipitação das proteínas com sulfato de amónio. O extrato foi sucessivamente incubado com sulfato de amónio com 10%, 20%, 35%, 50% e 75% de saturação durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação (a quantidade de sulfato de amónio foi determinada como descrito por Green, A. A. & Hughes, H. L. 1955). Após cada incubação procedeu-se a uma

centrifugação (10000rpm, 4°C, 15 minutos), tendo os *pellets* sido ressuspensos em PBS.

As frações correspondentes a cada percentagem de saturação foram dialisadas, de modo a extrair o sulfato de amónio das amostras, usando para esse efeito membrana de diálise de celulose regenerada Snake Skin® (Thermo Scientific) com um *cut-off* de massa molecular de 10kDa. A solução de diálise utilizada foi o tampão PBS pH 7,4 com 5µM BH₄, que foi trocada quatro vezes ao longo de 24h. Após a diálise, as frações foram analisadas por *Western Blot* (com um anticorpo anti-*LiNOS*), de modo a identificar as frações que continham a proteína.

As frações que continham o *LiNOS* foram agrupadas e procedeu-se a uma cromatografia de troca iónica. Para tal, foi utilizada uma coluna de troca aniónica HiTrap Q HP num sistema de purificação de proteínas ÄKTA start (GE – Healthcare). A coluna começou por ser equilibrada com 10 volumes de tampão PBS pH 7,4 com um fluxo de 1mL/min. De seguida, a solução contendo a proteína foi aplicada com o mesmo fluxo, tendo-se recolhido o conteúdo que não permaneceu na coluna. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5 volumes de PBS pH 7,4, seguindo-se um gradiente contínuo de NaCl com a duração de 10 volumes de coluna, durante o qual se recolheram frações. Neste passo, a concentração de NaCl no tampão foi aumentando gradualmente de 0 a 500mM.

Após a cromatografia, as frações recolhidas foram analisadas por *Western Blot*, de modo a identificar aquelas em que foi obtido o *LiNOS*. As selecionadas foram agrupadas e a proteína foi doseada, à semelhança do que foi feito para a proteína recombinante.

3.6.3 – Estratégia 3

As proteínas de dimensão inferior a 50kDa foram eliminadas do extrato, à semelhança da estratégia 1.

O extrato resultante foi separado por diretamente cromatografia de troca iónica (sem precipitação prévia). O procedimento utilizado é idêntico ao indicado na estratégia 2, com a diferença de que, no gradiente de NaCl a concentração variou de 0 a 1M.

As frações recolhidas foram analisadas por *Western Blot*. As frações selecionadas foram agrupadas e a proteína foi doseada.

3.7 - Estudo da estrutura quaternária do *LiNOS*

A estrutura quaternária do *LiNOS* foi determinada com recurso a LT-PAGE (*Low-temperature SDS-PAGE*), descrito numa secção mais à frente. Para realizar este estudo,

foram analisados 5µg de proteína do extrato de *Leishmania infantum* pTEX_NOS-His6 fervido e não fervido.

O extrato foi separado em gel de gradiente (4-20%, GE Healthcare) e tampão MES a pH 7,3 (num sistema Amersham™ ECL™ da GE Healthcare), a 4º C, seguindo-se uma análise por *Western Blot* com o anticorpo anti-LiNOS.

3.8 - Estudo da influência do BH₄ e da hemina na estrutura quaternária do LiNOS

De modo a estudar a influência do grupo heme e do BH₄ na estabilidade da estrutura quaternária do enzima LiNOS, começou-se por incubar uma solução com 5 µg de proteína recombinante purificada a 37⁰C durante 30min com agitação. A incubação foi realizada na presença e ausência de heme e BH₄, assim como na presença de apenas um deles (concentração de hemina: 100µM; concentração de BH₄: 1mM). De seguida, as amostras, fervidas e não fervidas, foram analisadas num gel de gradiente (4-20%, GE Healthcare) por LT-PAGE, como descrito anteriormente. Esta análise foi realizada em duplicado, tendo-se, por um lado, analisado a proteína por *Western Blot* e, por outro lado, excisado as bandas correspondentes ao LiNOS para análise por espectrometria de massa.

3.9 - Hidrólise das proteínas e análise por MALDI-FTICR

A proteína a analisar por espectrometria de massa foi separada por LT-PAGE ou por SDS-PAGE. O gel foi corado com Nitrato de Prata e a zona onde se encontrava a proteína de interesse foi excisada manualmente com uma lâmina de bisturi.

O protocolo utilizado foi baseado no método de Shevchenko e colaboradores (Shevchenko, A. *et al.* 2006). Os pedaços de gel foram lavados 2 vezes durante 30 minutos com agitação com 50% (v/v) acetonitrilo e desidratados 2 vezes durante 5 minutos com agitação com 100% (v/v) acetonitrilo, tendo-se seguidamente deixado secar ao ar. O processo de lavagem decorreu à temperatura ambiente.

As proteínas foram reduzidas com 10mM DTT (Sigma) em 100mM hidrogenocarbonato de amónio, durante 45 min a 56⁰C com agitação. Seguidamente, as amostras foram alquiladas com o volume necessário para cobrir os pedaços de gel de 55mM iodoacetamida em 100mM hidrogenocarbonato de amónio durante 30 min à temperatura ambiente no escuro. As bandas foram lavadas 2 vezes com 100% (v/v) acetonitrilo e secaram ao ar.

Para realizar a hidrólise *in gel*, as partículas de gel foram reidratadas com o volume necessário para cobrir as partículas de 6,7ng/μL tripsina (*sequencing grade modified*, Promega) em 50mM hidrogenocarbonato durante 30 min em gelo. O excesso de solução não absorvida foi removido e foi adicionado o volume necessário para cobrir as partículas de gel do mesmo tampão sem tripsina e as amostras foram incubadas durante 16h a 37°C.

Para análise por *MALDI-FTICR*, as soluções contendo os péptidos, após serem acidificadas com 2% (v/v) TFA, foram injetadas em microcolunas de resina R2 construídas em pontas GELoader (Eppendorf) e eluídas com 1μL de matriz (50% (v/v) acetonitrilo, 0,1% (v/v) ácido fórmico, ácido hidroxicinamico-4-ciano (Sigma) saturado) diretamente para a placa de *MALDI (MALDI target AnchorChip*, Brüker Daltonics).

O espectro de massa foi obtido por *MALDI-FTICR* num espectrómetro de massa *Apex Ultra, Apollo II Combi-Source* (Brüker Daltonics), com magneto de 7 Tesla (Magnex Corporation). O espectro foi calibrado utilizando a mistura *Peptide Calibration II* (Brüker Daltonics), aplicada com a mesma matriz na placa de *MALDI*. A determinação das massas monoisotópicas foi conseguida utilizando o algoritmo SNAP2, do software *Data Analysis 4.0* (Brüker Daltonics).

3.10 - SDS-PAGE

Depois de fervidas as soluções proteicas durante 10 minutos com tampão de aplicação (62,5mM Tris-HCl, 25% (v/v) Glicerol, 2% (v/v) SDS, 5% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,02% (m/v) Azul de bromofenol pH 6,8) à razão de 1:4, foram aplicados 15μg de proteína em gel de poliacrilamida de 12% (com gel de concentração a 4% de poliacrilamida). A separação foi realizada num sistema *mini-Protein* (Bio-Rad) em tampão Tris-Glicina (25mM Tris, 188mM Glicina, 0,1% (m/v) SDS, pH 9,0) a 80V até o tampão de aplicação atingir o gel de separação e 120V até este atingir o final do gel. Juntamente com as amostras foi separado um marcador de massa molecular *Precision Plus Protein Standards (Dual color*, BioRad). O protocolo utilizado é baseado no método desenvolvido por Laemmli (Laemmli, U. K. 1970).

A visualização das proteínas no gel foi conseguida por coloração com azul de *Coomassie* (solução de coloração: 0,25% (m/v) Azul brilhante de *Coomassie R-250* (Bio-Rad), 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético; solução de descoloração: 40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético). Nos casos em que não foi possível a visualização de bandas após coloração com solução de azul de *Coomassie*, a observação das proteínas foi conseguida por coloração com nitrato de prata. Para tal foi utilizado o *PlusOne Silver Staining Kit* (GE Healthcare), tendo-se seguido as instruções do fabricante.

3.11 - LT-PAGE

O procedimento LT-PAGE (do inglês *Low Temperature* SDS-PAGE, baseado no método de Klatt *et al*, 1995) é idêntico ao realizado para SDS-PAGE, com a diferença de que os géis utilizados são de gradiente (4 a 12%) (Amersham™ ECL™ Gel 4-12% GE Healthcare) e a corrida foi feita a 4°C e 120V em tampão MES pH 7,3 (sistema NuPAGE, Invitrogen).

Esta técnica foi utilizada para separar as proteínas do extrato de *L. infantum* (15µg de proteína), e analisar a proteína *LiNOS* recombinante (5µg de proteína).

Nos casos em que se pretendeu analisar a proteína na sua forma nativa ou estudar o efeito de cofatores na estabilidade da estrutura quaternária, as amostras correspondentes não foram fervidas. Assim, a estas amostras foi adicionado um tampão de aplicação sem agentes redutores, ou seja, sem β-mercaptoetanol. No caso das amostras que continham Ureia, estas também não foram fervidas, mesmo com um tampão de aplicação com redutores.

3.12 - Análise por Western Blot

O método usado para a separação por Western Blot é baseado no descrito por Mahmood, T. & Yang, P.-C. 2012. Após a separação por SDS-PAGE ou LT-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A transferência foi realizada num sistema *Mini Trans-BlotCell* (Bio-Rad) (durante 70 minutos a 100V) em tampão de transferência (47,9mM Tris, 38,6mM Glicina, 0,037% (m/v) SDS, 20% (v/v) metanol). Após a transferência a membrana foi bloqueada durante 1 hora com uma solução de 5% leite magro em pó (Molico) em tampão de lavagem TBS-T (100mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20, pH 7,5) à temperatura ambiente. Seguidamente, a membrana foi incubada com uma solução de anticorpo anti-*LiNOS*, produzido em ratos Winstar pelo grupo de Parasitologia Molecular (IBMC, Porto), previamente purificado com membrana contendo a proteína recombinante (Sabino, F. M. R. 2012), diluído 1:200 numa solução de 5% leite magro em pó em tampão TBS-T, *over night*, a 4°C. A membrana foi lavada 3 vezes 10 minutos à temperatura ambiente com tampão TBS-T, seguindo-se uma incubação com anticorpo secundário anti-rato (Sigma) diluído 1:3000 numa solução de 5% leite magro em pó em tampão TBS-T, durante 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi lavada nas mesmas condições 4 vezes 10 minutos. Para fazer a revelação das proteínas, foi utilizado o sistema de deteção Amersham™ ECL™ *Western Blotting Detection Kit* (GE Healthcare). De seguida, as proteínas foram expostas à quimioluminescência, utilizando o *ImageQuant LAS 500* (GE Healthcare).

3.13 - Doseamento proteico

O doseamento proteico foi feito através do método de Bradford (Bradford, M. M. 1976), recorrendo ao reagente Bio-Rad *Protein assay*, segundo as instruções do fabricante.

3.14 - Ensaio cinéticos

A formação de NO foi seguida a 30°C através da conversão de oxi-hemoglobina em met-hemoglobina, por cálculo da diferença entre a absorvência a 421 e 401nm, usando o coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{421-401nm} = 77.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Salter, M. & Knowles, R. G. 1998). A oxi-hemoglobina foi preparada como descrito em (Sabino, F. M. R. 2012).

Foram realizados ensaios com concentração variável de L-arginina, para determinação dos parâmetros cinéticos do *iNOS* recombinante e com concentração variável do inibidor de NOS, *N*-nitro-L-arginina (NNA). Para os ensaios com extratos proteicos totais, utilizou-se uma concentração fixa de L-arginina. Assim, nos ensaios com concentração variável de L-arginina, foram utilizadas as seguintes condições: 15µg de *iNOS* recombinante, com adição de 6µM oxi-hemoglobina, 1,5mM CaCl₂, 1µM FAD, 1µM FMN, 0,1µM CaM bovina, 200µM BH₄, 150µM NADPH e concentrações variáveis de L-arginina (0,5, 2, 10 e 20µM), num volume total de 800µL. Os ensaios cinéticos na presença do inibidor NNA foram realizados nas mesmas condições descritas, com a diferença de que foram aplicados 12µg de proteína recombinante hémica, 50µM L-arginina e NNA com concentração variável (0, 50, 200, 400 e 800µM). A determinação da atividade específica em pTEX_NOS foi feita utilizando 30µg de extrato proteico total, tendo sido feito um controlo sem extrato. Os gráficos da velocidade da reação versus a concentração de L-arginina e os parâmetros cinéticos foram obtidos utilizando o programa GraphPadPrism (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

Para cada ensaio começou-se por adicionar à cuvette o tampão 50mM HEPES pH 7,4, a oxi-hemoglobina e o CaCl₂. De seguida, colocou-se a cuvette em agitação, tendo-se adicionado a L-arginina, as flavinas, a calmodulina, e o BH₄. Com esta solução foi medido o branco do ensaio, tendo-se, seguidamente, iniciado a reação com a adição da proteína. Os ensaios cinéticos foram realizados num espectrofotómetro de matriz de díodos Agilent HP 8453, com temperatura controlada e agitação magnética na cuvette. As atividades foram calculadas com base na diferença entre os declives registados antes e após desta adição.

3.15 - Estudos estruturais *in silico*

3.15.1– Organização da proteína em domínios

De modo a fazer uma previsão teórica da organização do *LiNOS* em domínios, a sua sequência foi submetida nos servidores Pfam (Finn, R. D. *et al.* 2014) e InterPro (Mitchell, A. *et al.* 2015). Os resultados foram obtidos sob a forma de esquema.

3.15.2- Previsão das regiões desordenadas

O método utilizado para a previsão de regiões desordenadas foi baseado no revisto por Ferron, F. e colaboradores (Ferron, F. *et al.* 2006).

De modo a fazer uma previsão das regiões desordenadas da proteína, começou-se por fazer uma análise da sua sequência. Nesta análise foram procuradas regiões de baixa complexidade, utilizando a ferramenta bioinformática SEG (Wootton, J. C. 1994), assim como *coiled-colis* utilizando a ferramenta Paircoil2 (McDonnell A. V. *et al.* 2006), segmentos transmembranares utilizando as ferramentas DAS-TMfilter server (Cserzo, M. *et al.* 2002), Phobius (Käll, L. *et al.* 2004) e Tmpred (Hofmann, K. & Stoffel, W. 1993), péptidos sinal utilizando a ferramenta SignalIP 4.1 (Petersen, T. N. *et al.* 2011), *zipper*s de leucina com a ferramenta ZZIP (Bornberg-Bauer, E. *et al.* 1998), e o estado dos resíduos de cisteína utilizando a ferramenta DiANNA (Ferrè, F. & Clote, P. 2006, Ferrè, F. & Clote, P. 2005). Foi ainda produzido um gráfico de análise de *clusters* hidrófobos (Callebaut, I. *et al.* 1997, Eudes, R. *et al.* 2007) (HCA, do inglês Hydrophobic Cluster Analysis), de modo a observar quais as regiões que, provavelmente estão mais ordenadas, tendo em conta a sequência da proteína.

De seguida, foram utilizados métodos *ab initio* de previsão de desordem PONDR (Dunker, A. K. *et al.* 2001, Garner E. *et al.* 1998, Li X. *et al.* 1998, Li X. *et al.* 2000, Romero P. *et al.* 2001), DisEMBL (Linding, R. *et al.* 2003) e RONN (Yang, Z. R. *et al.* 2005), de forma a identificar um consenso quanto às regiões da proteína teoricamente desordenadas. Tendo em conta os domínios putativos previstos, foi corrido, para cada um destes, um método de carga-hidropatia (através do PONDR), de modo a observar o grau de desordem de cada um.

Finalmente, foi feita a comparação dos métodos de previsão de desordem com a arquitetura dos domínios e com os itens encontrados na análise da sequência da proteína, o que permitiu fazer um delineamento teórico mais preciso dos limites entre as regiões ordenadas e desordenadas no gráfico HCA.

3.15.3- Previsão da estrutura da proteína

A previsão da estrutura do *LiNOS* foi feita com base na homologia com outras proteínas. Para tal, recorreu-se ao servidor HHpred (Söding, J. 2005, Söding, J. *et al.* 2005), que se baseia no modelo estatístico *Hidden Markov Model* (Eddy, S. R. 2004).

A sequência da proteína em estudo foi submetida no servidor, tendo-se obtido uma lista de proteínas candidatas a *template*, ordenadas segundo a pontuação atribuída, com base na semelhança com a sequência submetida. A estrutura escolhida para *template* foi a do enzima NADPH-citocromo P450 redutase humano (PDB ID 3QE2).

Após a escolha do *template* mais adequado (com base na pontuação atribuída), procedeu-se ao cálculo teórico da estrutura quaternária da proteína. Para esse fim, recorreu-se à ferramenta Modeller (Sali, A. *et al.* 1995), tendo a estrutura sido calculada com base no alinhamento entre a sequência do *LiNOS* e o *template* selecionado.

4 – Resultados e Discussão

4.1 - Otimização da purificação do *LiNOS* recombinante

O sintase de óxido nítrico de *Leishmania infantum* (*LiNOS*) é um enzima que sintetiza o NO a partir da L-arginina. O *LiNOS* recombinante foi expresso em *E. coli* na presença de hemina na fração insolúvel em condições previamente definidas (Sabino, F. M. R., 2012), como se mostra na figura 9.

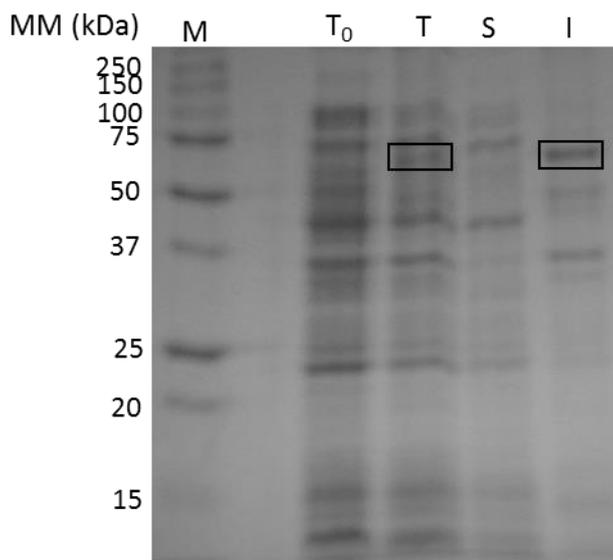


Fig. 9 – Análise por SDS-PAGE da expressão de *LiNOS* nas frações celulares de *E. coli*. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; T₀ – Fração total sem indução da expressão; T – Fração total com indução da expressão; S – Fração solúvel; I – Fração insolúvel; A posição do *LiNOS* (MM 64 kDa) encontra-se destacada por um retângulo.

Este fenómeno de expressão em corpos de inclusão é frequente quando são expressas grandes quantidades de proteína, principalmente quando se trata de uma proteína de um eucariota em bactéria. Os procariontes carecem de maquinaria essencial para a ocorrência de modificações pós-traducionais e da assistência ao *folding* de algumas proteínas dos organismos eucariotas (Singh, S. M. & Panda, A. K. 2005, Alibolandi, M. and Mirzahoseini, H. 2011).

Uma vez que o *LiNOS* se encontra na fração insolúvel, foi necessário solubilizá-lo. Para tal, recorreu-se a uma solubilização com concentrações crescentes de ureia. Inicialmente, suspendeu-se o *pellet* da fração insolúvel no tampão PBS pH 7,4 com 4M ureia. A suspensão resultante foi centrifugada, tendo-se suspenso o novo *pellet* obtido no mesmo tampão com 8M de ureia, de onde foi extraída a proteína em estudo (Fig. 10).

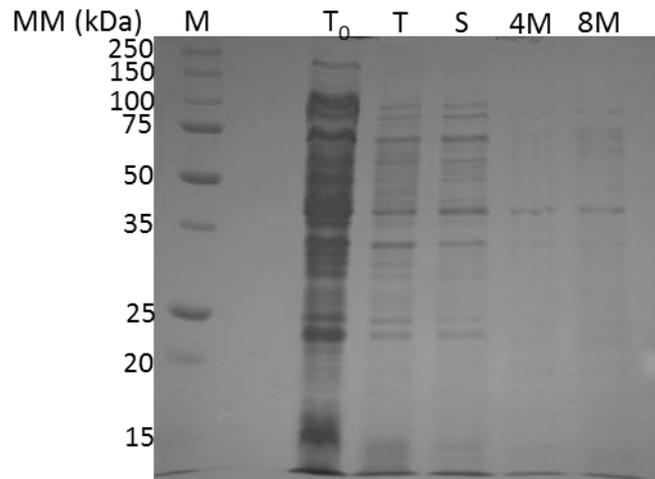


Fig. 10 – Análise por SDS-PAGE da expressão e monitorização e solubilização do *LiNOS*. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; T_0 – Fração total sem indução da expressão; T – Fração total com indução da expressão; S – Fração solúvel; 4M – Solubilização da fração insolúvel em ureia à concentração de 4M; 8M – Solubilização do *pellet* resultante da suspensão anterior à concentração de 8M. A posição do *LiNOS* (64 kDa) encontra-se destacada por um retângulo.

Da análise da figura 10 pode concluir-se mais uma vez que o *LiNOS* se encontra na fração insolúvel (não se encontra na fração solúvel e encontra-se na fração total) e que foi solubilizado com 8M ureia, uma vez que na pista correspondente à solubilização com 8M ureia é possível observar a proteína. Na pista correspondente à solubilização com 4M ureia pode observar-se que, apesar de não ter sido solubilizada a proteína de interesse, foram solubilizadas outras proteínas da bactéria.

O *LiNOS* recombinante possui, na sua sequência, uma cauda de seis resíduos de histidina no N-terminal. Assim, para proceder à purificação desta proteína, tirou-se partido do facto de esta cauda de resíduos de histidina ter uma elevada afinidade para o níquel. O *LiNOS* foi então purificado por cromatografia de afinidade com níquel imobilizado (IMAC - *immobilized metal ion affinity chromatography*). Duas estratégias de purificação foram testadas de forma a maximizar o rendimento da purificação. Numa primeira purificação, o enzima foi renaturado e depois purificado por IMAC; noutra estratégia, o enzima foi purificado na sua forma desnaturada e só depois foi renaturado.

Na primeira estratégia, começou-se por fazer uma diálise da fração solubilizada com 8M ureia, de forma a promover o *refolding* da proteína. A diálise ocorreu de forma lenta, a 4°C, em PBS pH 7,4 com concentrações decrescentes de ureia (4M, 2M, 1M ureia e sem ureia) com o objetivo de promover o *refolding* lento do enzima. As duas últimas soluções continham 5µM de BH_4 , o cofactor deste enzima, de modo a

promover e estabilizar o *fold*ing da proteína. Este procedimento aumenta a probabilidade da obtenção da sua conformação nativa.

Após a diálise, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade. A solução proteica foi incubada com *beads* magnéticas revestidas de níquel e eluída com imidazolo em concentrações crescentes (5mM, 25mM, 50mM, 250mM, 500mM e 1M), uma vez que este compete com a histidina pela ligação ao níquel. Uma vez que não foi possível observar proteína no gel de SDS-PAGE, as frações contendo *Li*NOS foram identificadas por *Western Blot*. Observou-se que a proteína foi eluída nas frações correspondentes a 50mM, 250mM e 500mM de imidazolo (Fig. 11). Estas frações foram agrupadas e a proteína quantificada.

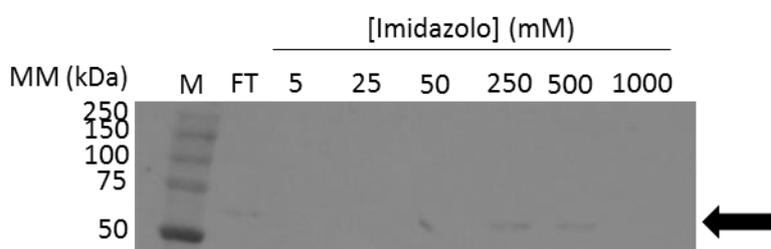


Fig. 11 – Análise por *Western Blot* das frações obtidas no processo de purificação da proteína *Li*NOS com *beads* magnéticas revestidas de níquel. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; FT – *Flow through* (fração contendo as proteínas que não se ligaram às *beads*); a seta indica a posição do *Li*NOS.

Na segunda estratégia, foram invertidos os passos de diálise e cromatografia. Desta forma, a proteína foi purificada no seu estado *unfolded*, tendo-se promovido o *refolding* após a cromatografia de afinidade. Neste processo recorreu-se a uma coluna de níquel e o tampão PBS pH 7,4 continha 8M ureia. De igual forma, a eluição foi feita com concentrações crescentes de imidazolo (5mM, 250mM, 500mM e 1M) A proteína foi obtida nas frações correspondentes a 250mM, 500mM e 1M de imidazolo (Fig. 12).

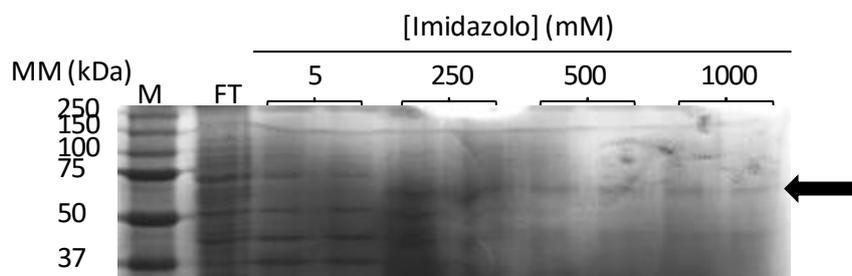


Fig. 12 – Análise por SDS-PAGE (corado com prata) do processo de purificação do *Li*NOS no seu estado *unfolded* por cromatografia de afinidade. MM – Massa molecular; M – Marcador de

massa molecular; FT – fração contendo as proteínas que não se ligarem à resina; a posição do *LiNOS* está indicada pela seta.

As frações selecionadas foram agrupadas e, após a diálise, que decorreu de modo igual modo ao da estratégia anterior, a proteína foi concentrada e quantificada.

Ao quantificar a proteína purificada por cada uma das estratégias (a partir de 1L de cultura bacteriana), constatou-se que, quando esta foi purificada no seu estado *folded*, a sua concentração final foi de 0,021mg/mL num volume total de 1,5mL, enquanto a concentração final da proteína purificada no seu estado *unfolded* foi de 0,505mg/mL e um volume total de 3mL. O rendimento da purificação da proteína no seu estado *folded* foi 0,04mg proteína/L de cultura, enquanto a purificação no estado *unfolded* resultou em 1,89mg proteína/L de cultura. Assim, o processo de purificação do *LiNOS* no seu estado *unfolded* revelou ter um rendimento cerca de 48 vezes superior. Desta forma, foi possível concluir que a segunda estratégia de purificação da proteína recombinante é a mais rentável (Fig. 13).

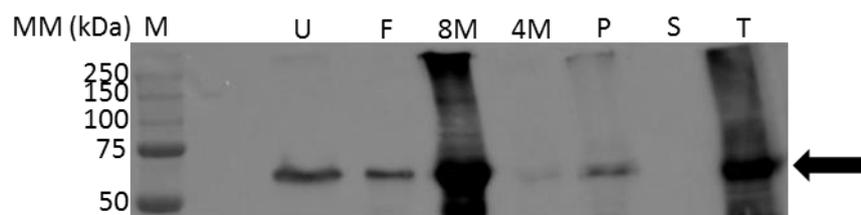


Fig. 13 – Análise por *Western Blot* das diferentes frações desde o extrato total até à proteína purificada. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; T – Fração total, S – Fração solúvel; P – Fração insolúvel; 4M – Fração insolúvel ressuspendida em PBS pH 7,4 com 4M Ureia; 8M – *Pellet* resultante da centrifugação da fração insolúvel ressuspendida em PBS pH 7,4 com 4M Ureia ressuspendido em PBS pH 7,4 com 8M Ureia; F – Proteína purificada no estado *folded*; U – Proteína purificada no estado *unfolded*.

A quantidade de proteína obtida quando esta foi purificada no seu estado *unfolded* é superior à obtida quando a purificação ocorreu no estado *folded*. Desta forma, conclui-se que o rendimento da purificação por cromatografia de afinidade do *LiNOS* é superior quando a proteína se encontra no seu estado *unfolded*. Esta conclusão sugere que, aquando do *folding* desta proteína, a cauda de resíduos de histidina pode ficar menos acessível ao níquel, diminuindo a probabilidade de a proteína se ligar ao metal.

De forma a confirmar que a proteína purificada corresponde ao sintase do óxido nítrico, foi medida a atividade deste enzima (secção 4.3.3, mais à frente).

4.2 - Otimização da purificação do *LiNOS* de *Leishmania infantum*

A purificação do *LiNOS* recombinante de *E. coli* foi realizada com sucesso, contudo, tal como acontece no processo de *refolding* de proteínas por diálise (Upadhyay, A. K. *et al.* 2014), ocorreu uma perda considerável de proteína.

De modo a estudar experimentalmente a estrutura da proteína no seu estado *folded* nativo, assim como as suas possíveis modificações pós-traducionais, é necessário ter acesso à proteína expressa de forma nativa. Nesse sentido, recorreu-se também à fonte original da proteína, o parasita *Leishmania infantum*, para proceder à purificação.

A expressão do *LiNOS* em *L. infantum* é relativamente baixa. Desta forma, foram utilizados parasitas transfetados com o plasmídeo pTEX_NOS-6His e parasitas transfetados com o plasmídeo pTEX-NOS (Sabino, F. M. R. 2012), de forma a sobreexpressar o *LiNOS*.

Nos parasitas transfetados com o pTEX_NOS-6His, a proteína é expressa com uma cauda de seis resíduos de histidina. Desta forma, tirou-se partido do facto de estes resíduos possuírem afinidade para o níquel, à semelhança da purificação da proteína recombinante produzida em bactéria. Após uma primeira filtração do extrato para remover as proteínas de massa molecular inferior a 50kDa, procedeu-se a uma cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

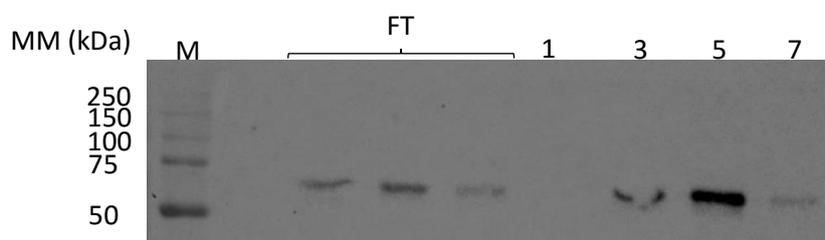


Fig. 14 – Análise por *Western Blot* das frações recolhidas durante a purificação por cromatografia de afinidade do extrato de *Leishmania infantum*. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; FT – *Flow-through*, Fração contendo as proteínas que não se ligaram à coluna; 1 – 19 – Número da fração recolhida durante o gradiente de concentração de imidazolo.

Na figura 14 é possível observar que alguma proteína não se ligou à coluna, uma vez que foi detetada a presença de *LiNOS* na fração FT. No entanto, pode constatar-se que uma parte ligou-se à coluna, observando-se a banda correspondente ao *LiNOS* nas frações 3 a 7. É ainda de salientar o facto de, na Fig. 14, se observar que o *LiNOS* foi obtido no início do gradiente de imidazolo (tendo sido recolhidas 20 frações, foi obtida proteína nas primeiras sete), o que indica que a proteína saiu da coluna na

presença de baixas concentrações de imidazolo. Esta observação sugere que a interação estabelecida ente a cauda de histidina e o níquel não era forte.

O facto de uma parte da proteína não se ter ligado à coluna de níquel sugere que a cauda de histidina não está numa posição favorável para se ligar à coluna de níquel. Este facto tinha-se observado com a proteína recombinante, em que o rendimento de purificação era menor quando a proteína se encontrava *folded*. O facto de se ter observado a presença de NOS em algumas das frações recolhidas, ou seja, de uma parte da proteína se ter ligado à coluna pode, provavelmente, ser explicado pelo facto de uma parte da proteína presente no extrato se encontrar no estado *unfolded* ou sob a forma de monómero. Assim, a inacessibilidade da cauda de resíduos de histidina poderia ser explicada por: a) a cauda de resíduos de histidina estar orientada para o exterior mas tornar-se inacessível quando a proteína está sob a forma oligomérica nativa. Neste caso, apenas as moléculas que se encontram sob a forma de monómero se ligam à coluna; b) a cauda de resíduos de histidina está orientada para o interior da proteína. Neste caso, apenas as moléculas que se encontram no estado *unfolded* poderão ligar-se à coluna.

Numa segunda estratégia de purificação da proteína, recorreu-se a parasitas a sobreexpressar o *LiNOS* sem a cauda de resíduos de histidina. À semelhança do que sucedeu na estratégia anterior, começou-se por eliminar as proteínas de dimensão inferior a 50kDa, tendo-se seguido uma precipitação das proteínas com sulfato de amónio (Fig. 15) e cromatografia de troca iónica.

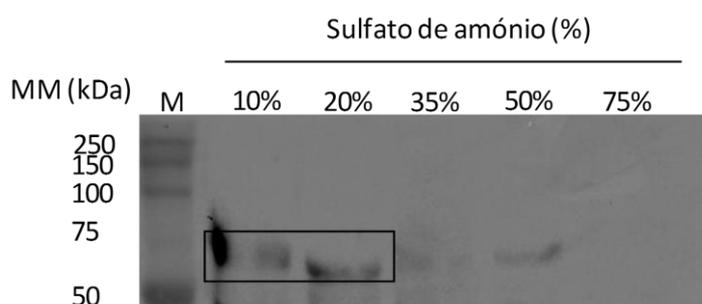


Fig. 15 – Análise por *Western Blot* das frações recolhidas no processo de precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amónio. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular. O retângulo indica as frações que foram agrupadas para prosseguir com a purificação.

Na figura 15 observa-se que o *LiNOS* se encontra maioritariamente nas frações correspondentes a 10% e 20% de saturação de sulfato de amónio, tendo-se selecionado estas frações para serem agrupadas e prosseguir com a purificação por cromatografia de troca iónica (após a remoção do sulfato de amónio por diálise contra PBS pH 7,4). Utilizando a ferramenta Isoelectric Point Calculator (Kozlowski L. P. 2007-

2013), o *pI* do *LiNOS* está calculado entre 4,9 e 5,3. Assim, foi utilizada uma coluna de troca aniónica e, como tampão, PBS pH 7,4. Durante a recolha das frações a concentração de NaCl variou entre 0 e 500mM.

Após a precipitação, as fracções selecionadas foram congeladas a -20°C. Antes da aplicação das fracções selecionadas na coluna de troca aniónica, observou-se a presença de um precipitado. Assim, este precipitado foi removido por centrifugação, tendo-se aplicado o sobrenadante na coluna. Posteriormente, foram analisadas por *Western Blot* as fracções recolhidas na cromatografia e o precipitado ressuspensionado em PBS pH 7,4 (Fig. 16).

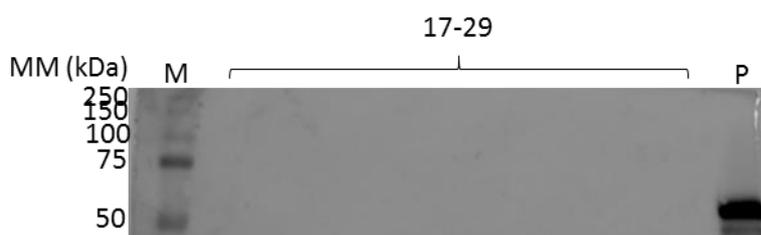


Fig. 16 – Análise por *Western Blot* das fracções recolhidas durante a cromatografia de troca aniónica e do precipitado que se encontrava nas fracções de precipitação com sulfato de amónio selecionadas. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; 17-29 – Número das fracções obtidas; P – Precipitado que se encontrava nas fracções de precipitação com sulfato de amónio selecionadas. Nota: a membrana correspondente às anteriores fracções obtidas por troca iónica não estão apresentadas porque não foi possível detetar a presença de *LiNOS*.

Nas fracções cromatográficas 1-16 não foi possível detetar a presença de *LiNOS* (dados não apresentados). Na figura 16 observa-se que a proteína também não foi detetada nas fracções 17-29. Contudo, é possível constatar que esta se encontra no *pellet* que foi retirado das fracções de precipitação com sulfato de amónio selecionadas. Desta forma, conclui-se que não é vantajoso prosseguir com este processo de purificação, uma vez que a proteína precipitou apesar de o sulfato de amónio ter sido retirado por diálise.

Numa terceira abordagem, optou-se por purificar a proteína por cromatografia de troca aniónica diretamente após serem retiradas as proteínas de dimensão inferior a 50kDa, sem precipitação com sulfato de amónio nem congelação a -20°C. Com o objetivo de maximizar a quantidade de proteína eluída da coluna, o gradiente de concentração de NaCl foi alargado até 1M.

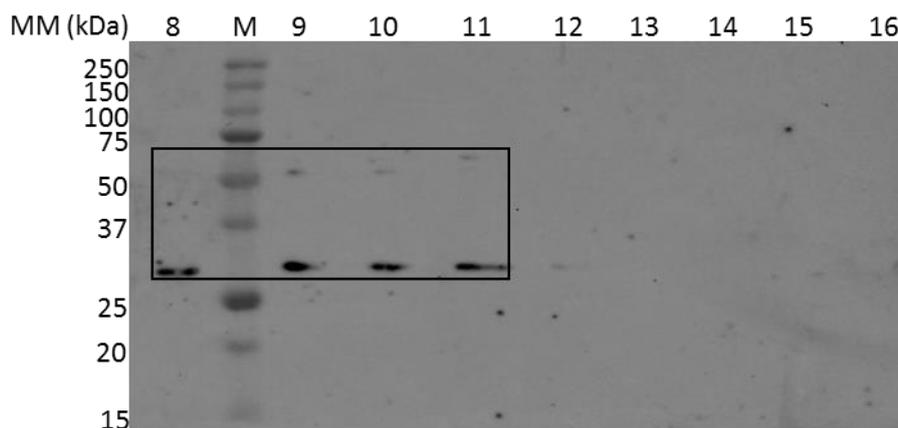


Fig. 17 – Análise por *Western Blot* das frações obtidas no processo de purificação do *LiNOS* por cromatografia de troca aniónica. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; 8-16 – Número da fração obtida após cromatografia de troca iónica. O retângulo destaca a posição onde foi detetada a presença de *LiNOS*. Nota: nas membranas contendo as frações 1-7 e 17-25 não foi detetada proteína (dados não apresentados).

Neste processo de purificação por cromatografia por troca aniónica (Fig. 17) observa-se que o *LiNOS* foi obtido nas frações 8 a 11. No entanto, é possível observar que, para além do monómero, entre 50 e 75kDa, foram detetadas bandas numa região de massa mais reduzida, entre 25 e 37kDa. Esta deteção dever-se-á, muito provavelmente, à degradação da proteína. Nas membranas referentes às restantes frações obtidas durante a cromatografia (1-7 e 18-25) não foi detetada a presença do *LiNOS* (dados não apresentados).

Fazendo um balanço das estratégias de purificação descritas, pode dizer-se que a purificação do *LiNOS* a partir do *Leishmania infantum* foi conseguida. Numa primeira abordagem, a purificação foi inviabilizada pelo facto de não se ter observado ligação entre a cauda de histidina e a coluna de níquel. Consequentemente, optou-se por partir de uma cultura de *Leishmania infantum* a sobreexpressar *LiNOS* sem cauda de histidina e precipitar a proteína com sulfato de amónio. No entanto, este procedimento acabou, também, por inviabilizar a purificação, uma vez que a proteína extraída neste passo de purificação precipitou. Assim, ao recorrer diretamente a uma abordagem de cromatografia de troca aniónica sem precipitação foi possível purificar a proteína com uma concentração de 0,78mg/mL, apesar de ter ocorrido degradação da proteína. Uma vez que o volume final da solução proteica foi de 4mL e a purificação ocorreu a partir de uma cultura de 250mL, o processo teve um rendimento de 12,48mg/L de cultura. Estes resultados são preliminares, sendo essencial, futuramente, otimizar o processo no sentido de evitar a degradação da proteína e aumentar o rendimento da purificação.

4.3 - Caracterização funcional do *Li*NOS

4.3.1 - Determinação dos parâmetros cinéticos

A atividade enzimática do *Li*NOS foi determinada através do método da conversão da oxihemoglobina e metahemoglobina (Salter, M. & Knowles, R. G. 1998) Anteriormente tinham sido determinados os parâmetros cinéticos para o enzima *Li*NOS recombinante sem heme nem cofatores, e para o mesmo apenas com BH_4 (Sabino, F. M. R., 2012). Dada a importância do grupo heme para a estrutura do *Li*NOS, foi feita a determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V) do enzima *Li*NOS recombinante hémico, com uma concentração de L-arginina que variou entre 0,5 e 20 μ M e adição de hemina no meio reacional.

Após a determinação da velocidade de reação para cada concentração de L-arginina, foi utilizado o programa GraphPad Prism para a obtenção do gráfico da velocidade da reação de formação de NO em função da concentração de L-arginina (Fig. 18), e determinação do valor do K_m e da velocidade limite (V).

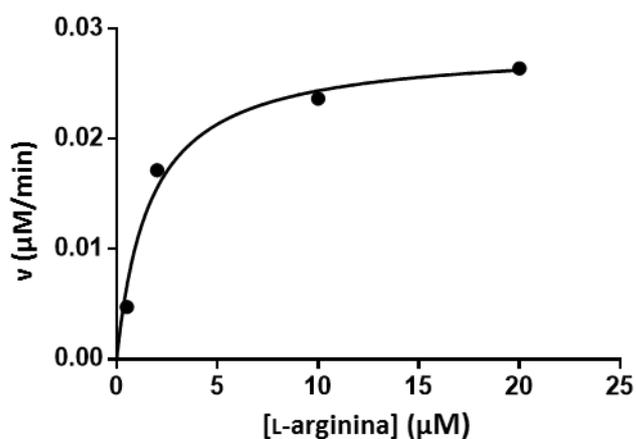


Fig. 18 – Variação da velocidade da reação de formação do NO (v) em função da concentração de substrato (L-arginina). A linha representa o melhor ajuste à equação de Michaelis-Menten

Através desta análise, obtiveram-se os valores de K_m de $1,66 \pm 0,47\mu$ M e da velocidade limite $0,029 \pm 0,002\mu$ M/min. Estes valores estão de acordo com os obtidos previamente para o enzima recombinante: $K_m = 3,05 \pm 1,25 \mu$ M e $V = 0,026 \pm 0,002 \mu$ M/min para o enzima sem grupo Heme nem cofatores, e $K_m = 0,93 \pm 0,13 \mu$ M e $V = 0,057 \pm 0,016 \mu$ M/min para o enzima pré-incubado com BH_4 (Silva, F. S., 2010). Comprova-se assim que a afinidade para o substrato aumenta (o K_m diminui), com aumento da atividade, quando o enzima está ligado ao cofactor BH_4 e tem hemina incorporada.

4.3.2 – Ensaios cinéticos com o inibidor NNA

De forma a confirmar que a atividade enzimática observada se deveu à ação do NOS, foram realizados ensaios cinéticos com a proteína recombinante na presença de N^w-Nitro-L-arginina (NNA) em concentrações crescentes. Sendo o NNA um análogo da L-arginina, este é um inibidor competitivo do enzima (Salter, M. & Knowles, R. G. 1998), permitindo, portanto, validar o estudo. Para evitar o uso de concentrações muito elevadas de inibidor, estes ensaios foram realizados na presença de 50μM de L-arginina, uma vez que o NNA compete com o substrato pela ligação ao enzima.

As velocidades de reação registadas na presença de NNA estão apresentadas no gráfico da figura 19. Observa-se que a velocidade de formação do NO diminui com o aumento da concentração de NNA. Assim, mostra-se que na presença deste análogo da L-arginina é menor a taxa de conversão de meta-hemoglobina a partir da oxi-Hemoglobina, uma vez que a formação de NO pelo *Li*NOS recombinante é inibida.

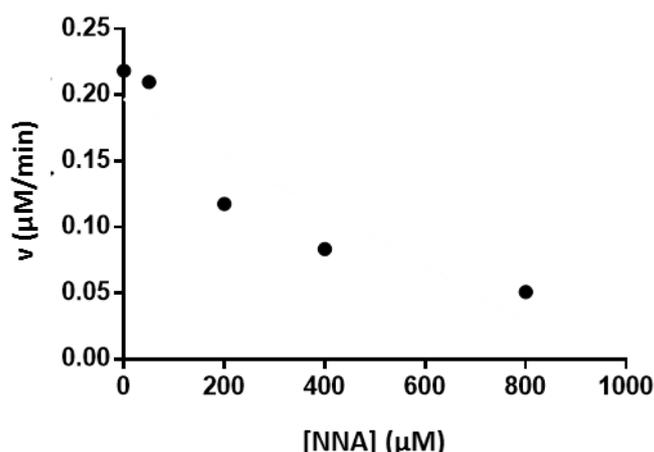


Fig. 19 – Variação da velocidade da reação de formação do NO (v) do *Li*NOS medida em função da concentração de N^w-Nitro-L-arginina (NNA).

4.3.3 - Determinação da atividade específica nos parasitas pTEX_NOS

A atividade específica do *Li*NOS foi determinada nos parasitas transfetados, utilizando 30μg de extrato pTEX_NOS, com concentração fixa de L-arginina. A atividade específica obtida foi de 1,33 nmol.min⁻¹.mg⁻¹. Apesar da sua sobre-expressão nos parasitas transfetados (Fig. 20), a atividade específica do *Li*NOS é aproximadamente igual à dos parasitas *wild-type*, que não sobre-expressam o NOS, com um valor de 1,61 nmol.min⁻¹.mg⁻¹.

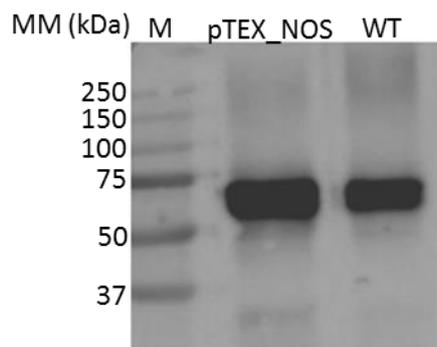


Fig. 20 – Análise por *Western Blot* dos extratos de *Leishmania infantum* transfetado e *wild-type*. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; pTEX_NOS – Extrato de *Leishmania infantum* transfetado com o plasmídeo pTEX_NOS, sobre-expressando o LiNOS; WT – Extrato de *Leishmania infantum wild-type*.

4.4 - Estrutura quaternária do LiNOS expresso em *Leishmania infantum*

Já tinha sido anteriormente observado que o enzima LiNOS recombinante formava tetrâmero na presença de BH₄ (Sabino, F. M. S. 2012). No seguimento desta observação, foi feito o estudo da estrutura quaternária da proteína quando expressa no parasita.

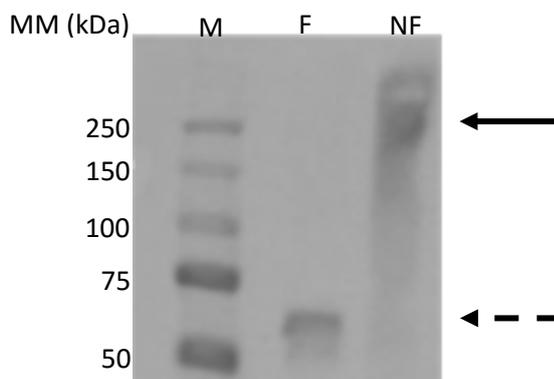


Fig. 21 – Análise por *Western Blot* do extrato de *Leishmania infantum* pTEX_NOS. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular; F – extrato fervido com tampão de aplicação com agentes redutores; NF – extrato não fervido com tampão de aplicação sem agentes redutores. A seta a cheio assinala a posição do tetrâmero (256 kDa). A seta a tracejado assinala a posição do monômero (64 kDa).

Na análise do extrato de *Leishmania infantum* para o estudo da estrutura quaternária do *LiNOS* foram testadas duas condições (Fig. 21). Numa das condições, o extrato foi fervido e foi usado um tampão de aplicação com agentes redutores, com o objetivo de quebrar as interações intermoleculares, de modo a observar o monômero. Na figura 21, na pista F, observa-se uma banda correspondente a um valor de massa entre 50 e 75kDa. Esta banda corresponde ao monômero de *LiNOS*, com uma massa de 64 kDa. Na outra condição testada, o extrato não foi fervido e foi utilizado um tampão de aplicação sem agentes redutores. Assim, as interações intermoleculares não são quebradas, esperando-se observar a banda correspondente à proteína na sua forma multimérica. Na figura 21, na pista NF, observa-se uma banda numa região de massa próxima de 250 kDa. Este complexo proteico apresenta uma massa que é correspondente ao quádruplo da massa do monômero de *LiNOS*. Desta forma pode inferir-se que o enzima *LiNOS* in vivo é expresso no parasita sob a forma de um homotetrâmero, tal como foi observado para a proteína recombinante (Sabino, F. M. S. 2012).

4.5 - Influência da hemina e do BH₄ na estrutura quaternária do *LiNOS*

Após se inferir que o *LiNOS* constitui um homotetrâmero in vivo, foi estudada a influência de cofatores e do grupo heme na estabilidade desta estrutura. Uma vez que se observou que a expressão da proteína recombinante é superior quando na presença de hemina e BH₄, foi estudada a sua influência na estabilidade do homotetrâmero. Para isso, utilizou-se a proteína recombinante na presença de diferentes combinações de hemina e BH₄ e as amostras foram separadas por LT-PAGE. A proteína foi incubada a 37°C na ausência de cofator ou hemina, com 1mM BH₄, com 100µM hemina e na presença de ambos.

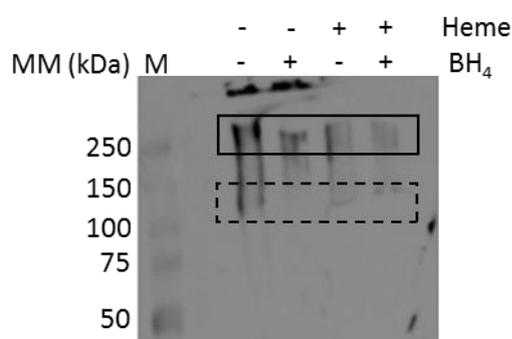


Fig. 22 – Análise por *Western Blot* do enzima *LiNOS* incubado durante 30min a 37°C com diferentes condições de presença de cofatores. MM – Massa molecular; M – Marcador de massa molecular. Os retângulos destacam a posição da proteína sob a forma de tetrâmero (256 kDa, retângulo a cheio) e dímero (128 kDa, retângulo tracejado).

Na figura 22 observa-se a presença de tetrâmero em todas as amostras. A proteína recombinante foi expressa e purificada na presença de hemina e BH_4 , sendo espectável o aparecimento da forma tetramérica. No entanto, na ausência de hemina (com ou sem o cofator), existe ainda uma banda acima desta região de massa que corresponde à formação de agregados que não conseguiram entrar no gel. Esta formação de agregados deve-se à instabilidade desta proteína *in vitro*. Estudos anteriores, em que esta proteína recombinante foi purificada sem hemina nem o cofator, revelaram que a mesma agregava *in vitro* (Silva, F. S. 2010). Isto pode também explicar a formação do precipitado proteico durante o procedimento de purificação do *LiNOS* a partir do parasita. Apesar de se observar proteína na região de massa do dímero, nesta condição sem hemina e sem BH_4 o dímero e o tetrâmero são difíceis de distinguir.

Na pista correspondente à proteína incubada na presença de BH_4 mas sem hemina, observa-se que, apesar de ter ocorrido a formação de agregados, a banda correspondente à massa do tetrâmero é mais distinta e quase não se observa o dímero. Neste caso, a proteína aparenta encontrar-se sobretudo na forma de tetrâmero.

Na pista correspondente à proteína incubada com hemina e sem BH_4 não se observa a existência de agregados, o que é indicativo de um aumento da estabilidade da estrutura quaternária do *LiNOS*. Para além disso é possível observar que a proteína não se encontra totalmente sob a forma de tetrâmero, havendo também alguma percentagem de dímero em solução.

Na pista correspondente à incubação da proteína com BH_4 e hemina é possível observar que estes contribuem para o aumento da estabilidade do tetrâmero. Por um lado, observa-se a não existência de agregados, o que poderá dever-se, principalmente à estabilização do nível quaternário da estrutura pelo grupo heme. Por outro lado, a banda correspondente ao tetrâmero é mais nítida, e o dímero desaparece, o que já fora observado na presença de BH_4 . Esta observação sugere que este cofator é importante para o estabelecimento e manutenção do *LiNOS* sob a forma de tetrâmero. Pode-se concluir que o grupo heme nesta proteína promove a estabilidade da mesma e das formas multiméricas (dímero de tetrâmero), sendo a formação de tetrâmero promovida pela ligação de BH_4 .

Para confirmar que o tetrâmero observado por *Western Blot* corresponde de facto à proteína *LiNOS*, foi feita uma análise da proteína por MALDI-FT-ICR, tendo-se, para tal, excisado bandas na região de massa do tetrâmero após a corrida de um gel de LT-PAGE com a proteína em diferentes condições quanto à presença de BH_4 e hemina (Fig. 23).

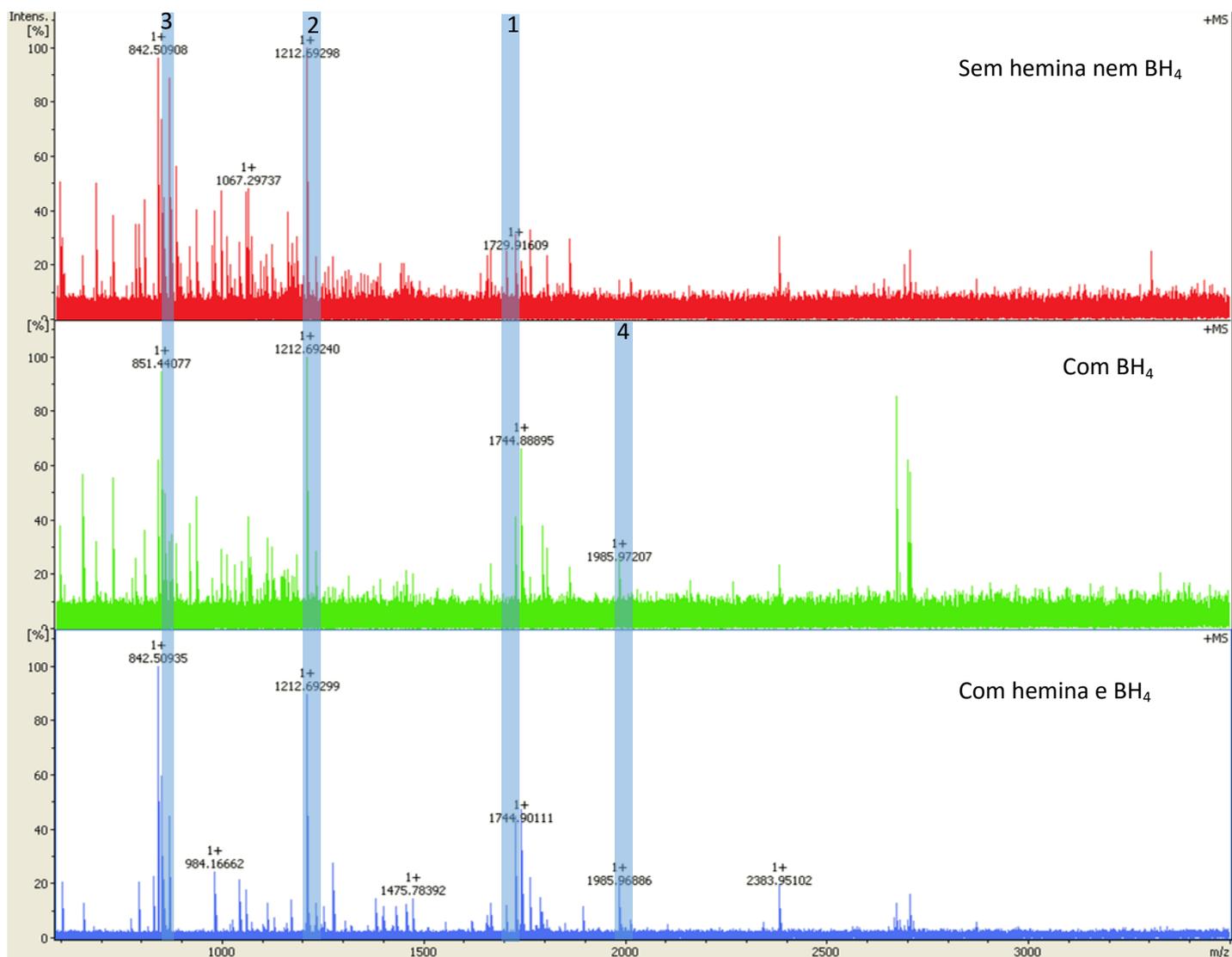


Fig. 23 – Espetros de massa correspondentes aos péptidos do *LiNOS* sob a forma de tetrâmero em diferentes condições quanto à presença de cofatores: sem hemina nem BH_4 (vermelho), na presença de 1mM BH_4 (verde) e na presença de 1mM BH_4 e $100\mu\text{M}$ hemina (azul). Os números presentes nos picos destacados correspondem aos números que se encontram em índice à esquerda dos péptidos representados nos quadros 3 a 5. As bandas utilizadas para a hidrólise da proteína em gel foram excisadas a partir de um gel no qual foram aplicadas amostras preparadas de igual modo ao procedido para a análise por *Western Blot* e cuja coloração foi feita com nitrato de prata. Foram excisadas as bandas observadas na região de massa do tetrâmero (cerca de 250kDa).

Quadro 1 – Análise dos péptidos detetados no espectro de massa resultantes da hidrólise do *LiNOS* na ausência de cofatores excisado do gel na região de massa correspondente ao tetrâmero.

Sequência do péptido	Região da sequência (resíduos)	m/z (Th)	m/z (Th)	Desvio (ppm)
¹ TMLPGDVVEVLVNSR	126-141	1729,916	1729,915	0,46
² LLEVSGPLQTR	288-298	1212,693	1212,695	-1,392
³ GFFPIDR	89-95	851,441	851,441	-0,496

Quadro 2 – Análise dos péptidos detetados no espectro de massa resultantes da hidrólise do *LiNOS* na presença de 1mM BH₄ excisado do gel na região de massa correspondente ao tetrâmero.

Sequência do péptido	Região da sequência (resíduos)	m/z (Th)	m/z (Th)	Desvio (ppm)
⁴ YIDPPALPTTGSPGEWER	65-82	1985,972	1985,96	5,914
¹ TMLPGDVVEVLVNSR	126-141	1729,916	1729,915	0,611
² LLEVSGPLQTR	288-298	1212,692	1212,695	-1,869
³ GFFPIDR	89-95	851,441	851,441	-0,285

Quadro 3 – Análise dos péptidos detetados no espectro de massa resultantes da hidrólise do *LiNOS* na presença de 1mM BH₄ e 100µM hemina excisado do gel na região de massa correspondente ao tetrâmero.

Sequência do péptido	Região da sequência (resíduos)	m/z (Th)	m/z (Th)	Desvio (ppm)
⁴ YIDPPALPTTGSPGEWER	65-82	1985,969	1985,96	4,299
¹ TMLPGDVVEVLVNSR	126-141	1729,916	1729,915	0,265
RSANLPAATAVGADAQR	326-342	1668,875	1668,878	-1,742
² LLEVSGPLQTR	288-298	1212,693	1212,695	-1,38
³ GFFPIDR	89-95	851,441	851,441	-0,08

Na análise dos espectros de massa (Fig. 23), observa-se um aumento da cobertura de sequência da proteína sem cofatores e hemina (5,8%) para a proteína apenas com BH₄ (8,9%) e desta para a proteína na presença de BH₄ e hemina (11,8%), (Quadros 1, 2 e 3). O número de péptidos de *LiNOS* identificados é maior na presença de cofatores, dado que estes são essenciais para o *fold*ing correto da proteína na forma tetramérica. Quanto maior é a quantidade de proteína na forma tetramérica, maior é a probabilidade de se obterem mais péptidos da mesma, obtendo-se, assim, uma maior cobertura de sequência. Estes resultados concordam com a análise por *Western Blot*, permitindo, assim, inferir que o BH₄ e o grupo Heme aumentam a estabilidade da estrutura quaternária do *LiNOS*.

Através dos espectros de massa obtidos, confirmou-se, por MALDI-FT-ICR, a existência do enzima *LiNOS* na sua forma tetramérica.

A importância do BH_4 já tinha sido documentada para o NOS humano (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013). A estabilização da estrutura no NOS humano por esta molécula ao nível quaternário deve-se à ligação do BH_4 à interface de contacto entre os monómeros no domínio oxigenase. Sabe-se que este cofator é também importante para a proteína do ponto de vista funcional, uma vez que, durante a catálise da formação de NO, ocorre a formação de um radical BH_4 (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013). O BH_4 tem ainda um papel na oxidação da N^ω -hidroxi-L-arginina, um composto intermediário da formação de NO, dado que direciona a reação para a formação de NO em vez de NO^- (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013).

A importância do grupo Heme para a estabilidade da estrutura quaternária dever-se-á ao facto de este ser o grupo prostético da proteína, sendo importante não só para o estabelecimento da estrutura quaternária como da estrutura terciária de cada monómero. Sabe-se que o NOS humano é hémico, sendo este grupo prostético importante também para a ocorrência da transferência de eletrões necessária para a oxidação da L-arginina (Tejero, J. & Stuehr, D. 2013). Assim, a sugestão de que o *LiNOS* é um enzima hémico pode explicar o facto de, na sua ausência, se observar a existência de agregados.

4.6 - Previsão dos domínios do *LiNOS*

De modo a estudar a estrutura tridimensional e a função do *LiNOS*, é importante ter o máximo de informação possível acerca da sua organização em domínios e da arquitetura dos mesmos. Nesse sentido, a partir da sequência da proteína (UniProt ID A4HYH5), foi feita uma previsão teórica de domínios, recorrendo às ferramentas InterPro (Fig. 24) e Pfam (Fig. 25).

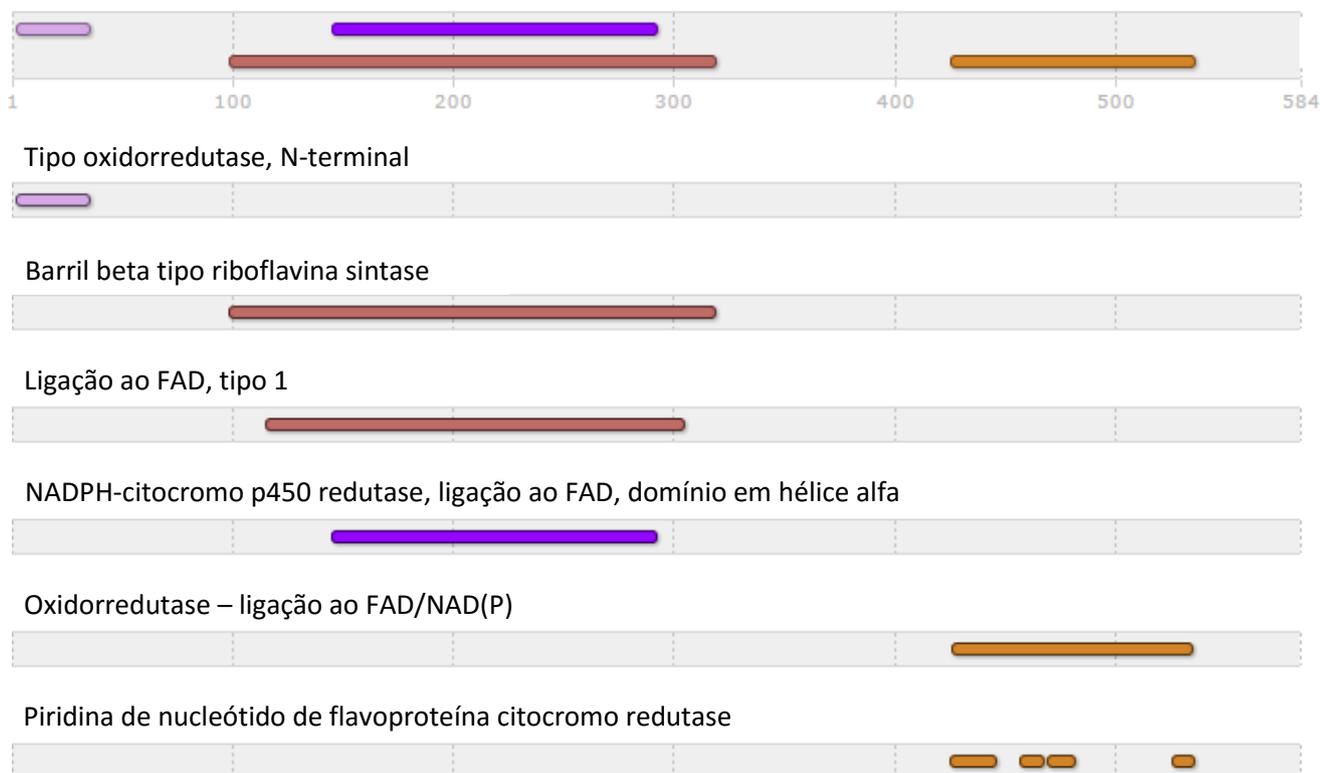


Fig. 24 – Organização do *LiNOS* em domínios, de acordo com a ferramenta InterPro.



Fig. 25 – Organização do *LiNOS* em domínios, de acordo com a ferramenta Pfam. Verde – Domínio do tipo oxidorreductase; Vermelho – Domínio de ligação ao FAD-1; Azul – Domínio de ligação ao NAD-1. Estão assinalados os resíduos do início e do fim de cada domínio.

Os resultados obtidos quanto à previsão da organização em domínios são concordantes. Com ambas as ferramentas utilizadas, é prevista a existência de um domínio do tipo oxidorreductase na região N-terminal. Para além disso, ambas preveem um domínio de ligação ao FAD e outro de ligação ao NAD, estando as posições concordantes.

Os domínios de ligação ao NAD(P)/FAD e Piridina de nucleótido de flavoproteína citocromo redutase existem também no NOS de outras espécies (Hyde, G. E. *et al.* 1991, Bredt, D. A. *et al.* 1991). O *LiNOS* apresenta ainda um domínio em comum com o NADPH-citocromo P450 redutase (Fig. 24). Desta forma, prevê-se que, à semelhança das isoformas de NOS humanas, o *LiNOS* necessita da presença de FAD e NAD(P) como cofatores.

Estruturalmente, o estudo teórico da organização da proteína em domínios prevê que o domínio do tipo riboflavina sintase, num intervalo aproximado entre o resíduo número 100 e o 300, tenha um motivo de barril beta. Para além disso, prevê-se que o domínio do tipo NADPH-citocromo p450 redutase tenha uma estrutura secundária em hélice alfa (Fig. 24).

Relativamente a alguns motivos previamente identificados no *LiNOS*, e característicos de outros sintases de NO, foi encontrado um motivo de ligação à calmodulina entre os resíduos 296 e 309 do tipo 1-8-14 (baseado na posição de resíduos hidrófobos conservados, característicos (Rhoads, A. R. and Friedberg, F. 1997)), e um motivo de ligação à caveolina F-xxxx-F-xx-F (sendo F os resíduos Trp, Phe ou Tyr, (Garcia-Cardena, G. *et al.* 1997)) entre os resíduos 210 e 218 (resultados não publicados).

4.7 - Organização estrutural e funcional do *LiNOS*

De modo a abordar a organização estrutural e funcional do *LiNOS*, começou-se por fazer uma análise teórica da sua sequência (UniProt ID A4HYH5, ver anexo) recorrendo a diversas ferramentas bioinformáticas. A previsão de estrutura do *LiNOS* não é uma tarefa fácil, visto que este enzima não apresenta homologia com os NOS conhecidos até à data.

Com a confirmação da formação de tetrâmeros *in vivo*, começou-se por pesquisar a presença de *coiled coils* na sequência do *LiNOS*. A identificação de *coiled coils* é importante para a identificação de domínios de oligomerização putativos e postular mecanismos funcionais de modo a mapear a sequência da proteína na sua estrutura com elevado detalhe (McDonnell A. V. *et al.* 2006). A presença destas estruturas foi descrita numa proteína de *Caenorhabditis elegans* pertencente a uma nova família de NOS (Zemojtel, T. *et al.* 2004). Na pesquisa de *coiled coils* na sequência do *LiNOS*, observou-se que, para todos os resíduos de aminoácidos, a probabilidade de pertencerem a um *coiled coil* é nula (ver anexo). Na análise da sequência do *LiNOS*, foi ainda estudada a presença de *zipper*s de leucina (ZIP). Estes motivos são constituídos por uma repetição de resíduos de leucina e facilitam a dimerização das proteínas (e em alguns casos a oligomerização), através da estabilização de uma estrutura *coiled-coil* paralela (Hakoshima, T. 2005). Com recurso à ferramenta 2ZIP, previu-se que a proteína *LiNOS* não contém *zipper*s de leucina.

Como mencionado anteriormente, o NOS de *L. infantum* foi expresso em bactéria na fração insolúvel, formando agregados proteicos com relativa facilidade. Sabe-se atualmente que, quanto maior for o número de regiões de baixa complexidade numa proteína eucariota, menor é a probabilidade de ser expressa de forma solúvel em bactéria (Wootton, J. C. 1994). As proteínas intrinsecamente desordenadas tendem a ter estas regiões de baixa complexidade, apesar de não ser uma condição *sine qua non*. Uma função destas regiões flexíveis e desordenadas é adquirirem *foldings* após ligação a um ligando, mediando assim numerosos processos de interação proteína-proteína (Karlsson, O. A. *et al.* 2012). Um exemplo desta função ocorre no NOS neuronal, quando uma região flexível desta proteína adquire uma estrutura β -finger após ligação com um domínio PDZ [PSD-95 (*postsynaptic density protein-95*)/Discs large/ZO-1] da proteína PSD-95 (Karlsson, O. A. *et al.* 2012). No sentido de analisar o grau de desordem do *LiNOS*, torna-se pertinente a pesquisa de regiões de baixa complexidade na sua sequência. Utilizando a ferramenta SEG, foi detetada uma região não globular longa entre os resíduos 168 e 302. Na pesquisa de regiões curtas de baixa complexidade, com a mesma ferramenta foram detetados dois segmentos: um entre os resíduos 209 e 235 e outro entre os resíduos 324 e 257 (ver anexo). A presença de regiões desordenadas foi anteriormente reportada nos enzimas eNOS (de bovino) e nNOS (de rato). Ambos possuem um extenso segmento desordenado (resíduos 339-349 no nNOS, e resíduos 109-120 no eNOS), que diferem em sequência e comprimento, e parecem contribuir para as diferenças dinâmicas observadas nas duas proteínas (Li, H. *et al.* 2014).

Como referido anteriormente, foi encontrado em *LiNOS* um motivo de ligação à caveolina entre os resíduos 210 e 218 (resultados não publicados). A ligação do NOS endotelial (eNOS) a esta proteína não depende de domínios transmembranares, mas da presença de duas modificações pós-traducionais, miristoilação e palmitoilação, em resíduos específicos de glicina e cisteína, respectivamente (Prabhakar, P. *et al.* 2000). No entanto, quando esta proteína foi expressa sob a forma de uma quimera com o domínio transmembranar de uma glicoproteína, este domínio actuou como um mecanismo alternativo de encaminhamento da proteína para a membrana, e consequente ligação à caveolina (Prabhakar, P. *et al.* 2000). No âmbito da análise da sequência do *LiNOS*, foi também pesquisada a presença de segmentos transmembranares. Nesta pesquisa foram utilizadas três ferramentas: DAS-TMfilter server, Tmpred e Phobius. Apesar de a primeira não ter detetado qualquer segmento transmembranar, tanto o Tmpred (Fig. 26) como o Phobius (Fig. 27) previram a existência um segmento transmembranar, entre os resíduos 424 a 443 e 425 a 446, respetivamente.

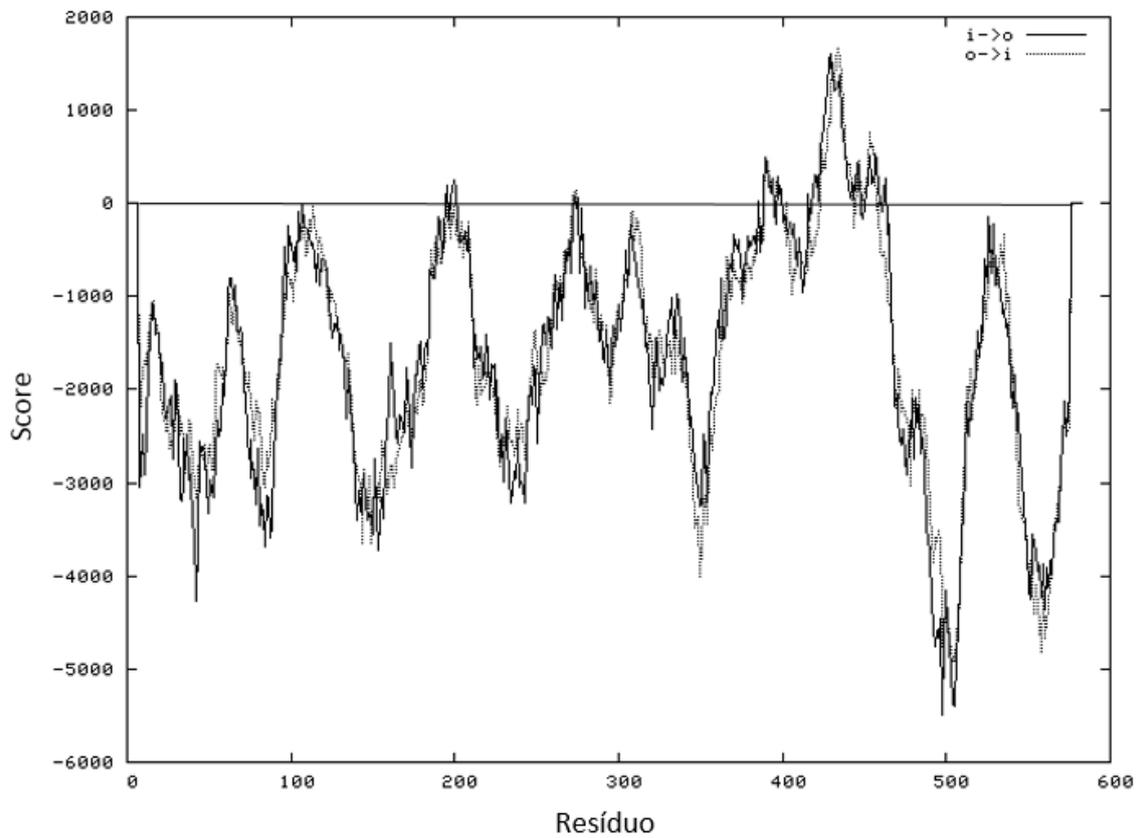


Fig. 26 – Gráfico do score quanto à existência de segmentos transmembranares ao longo da sequência obtido com a ferramenta Tmpred. As zonas do gráfico que estão com score acima de 0 correspondem a regiões transmembranares previstas. i, *inside* (interior); o, *outside* (exterior).

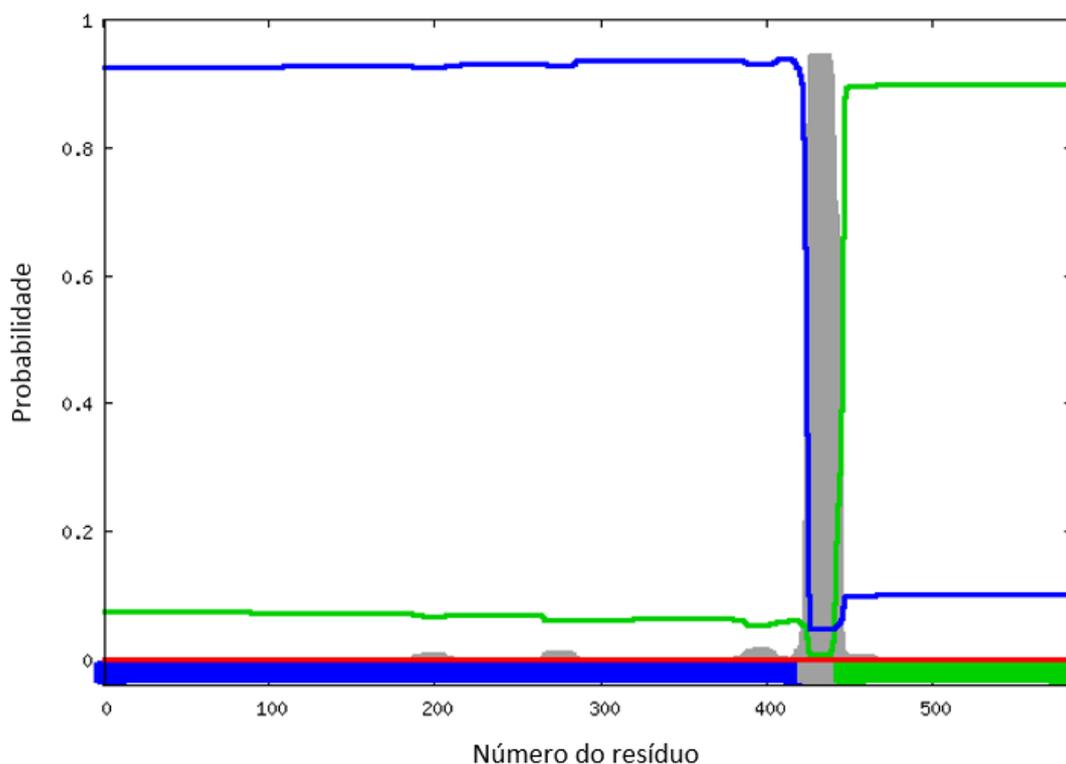


Fig. 27 – Gráfico da probabilidade de um resíduo pertencer a um segmento transmembranar ao longo da sequência obtido com a ferramenta Phobius. Verde – Região citoplasmática; Azul – Região não citoplasmática; Vermelho – Péptido sinal; Cinzento – Região transmembranar

Como resultado da pesquisa de segmentos transmembranares, observa-se não só a existência de um segmento membranar em regiões da sequência concordantes segundo ambas as ferramentas, mas também a orientação prevista deste segmento. Tanto o TMPred como o Phobius preveem que o N-terminal se encontre numa região não citoplasmática e o C-terminal no citoplasma, sendo que a maioria da sequência se encontra fora do citoplasma. Dada esta previsão, pode colocar-se a hipótese de o *LiNOS* se encontrar, maioritariamente, num organelo celular, ou no exterior da membrana celular. A hipótese de que a maior parte da estrutura se encontra fora do citosol poderia constituir uma das explicações para a insolubilidade da proteína quando expressa em bactéria. No resultado obtido com a ferramenta Phobius pode ainda observar-se que não foi prevista a existência de péptidos sinal (a probabilidade de um resíduo pertencer a um péptido sinal – a vermelho – é nula ao longo de toda a sequência).

Na pesquisa de péptidos sinal recorreu-se ainda à ferramenta SignalIP 4.1 que, à semelhança do Phobius, previu que a sequência do enzima *LiNOS* não contém péptidos sinal (ver anexo).

Uma análise de sequência do *LiNOS* revelou a possível localização dos dois resíduos de cisteína ligados ao zinco, característicos dos NOS e essenciais à dimerização da proteína. Atribuiu-se este papel às cisteínas 12 e 17 (resultados não publicados) por homologia com o motivo Cys-xxxx-Cys descrito para as *zinc-ligating cysteines* (Alderton, W. K. *et al.* 2001). No que diz respeito aos resíduos de cisteína em *LiNOS*, a ferramenta DiANNA 1.1 calculou a probabilidade de cada resíduo de cisteína ligar-se a outra cisteína formando uma cistina, estar livre, ou se encontrar ligado a um ligando. Nos casos em que se previu que era mais provável o resíduo estar ligado a um ligando, este foi indicado. Os valores de probabilidade calculados e os ligandos estão discriminados no quadro 4.

Quadro 4 – Resultados obtidos com a ferramenta DiANNA 1.1 quanto à probabilidade cada resíduo de cisteína estar ligado a outro resíduo de cisteína (constituindo uma meia cistina), de estar livre, ou ligado a um ligando. Os valores de probabilidade maiores para cada resíduo encontram-se destacados a negrito.

Resíduo de Cisteína	Meia cistina	Cisteína livre	Ligada a um ligando	Ligando
12	0,071104	0,385664	0,543232	Zn
13	0,049943	0,382790	0,567267	Zn
17	0,076669	0,862237	0,061094	-
20	0,097116	0,828391	0,074493	-
45	0,081998	0,893451	0,024551	-
101	0,150657	0,512472	0,336872	-
153	0,101283	0,619200	0,279517	-
164	0,335978	0,492212	0,171810	-
246	0,574348	0,340296	0,085356	-
267	0,148041	0,768850	0,083109	-
318	0,282701	0,478177	0,239121	-
323	0,231053	0,575509	0,193437	-
371	0,108523	0,798892	0,092585	-
372	0,154009	0,750226	0,095764	-
409	0,455839	0,379289	0,164872	-
413	0,316460	0,411791	0,271749	-
422	0,477661	0,184829	0,337510	-
430	0,466136	0,298922	0,234942	-
460	0,221990	0,638269	0,139741	-
531	0,153584	0,725724	0,120692	-
546	0,134286	0,579172	0,286541	-

Nos resultados obtidos através do DiANNA, observa-se que os resíduos 12 e 13 têm, provavelmente, como ligando o íon zinco (Quadro 4).

Os complexos cisteína-Zn²⁺ têm um papel crítico na estrutura e na catálise (em oxidorreduções – como o NOS, hidrolases e transferases). Estes complexos podem ainda ter um papel regulatório, como na inibição, *redox switch*, ou no estabelecimento da interface entre subunidades (Pace, N. J. & Weerapana, E. 2014). Como já foi referido, também as três isoformas de NOS humano têm zinco ligado a cisteínas específicas. Sabe-se que, no NOS humano, o complexo cisteína-Zn²⁺ assume a função de regular o estado de oxidação (*redox switch*). Neste sentido, o zinco assume o papel de regular o estado de oxidação no processo do transporte eletrónico. Para além disso, a formação do complexo cisteína-Zn²⁺ permite a formação do dímero ao criar uma interface de interação entre os monómeros (Pace, N. J. & Weerapana, E. 2014). Desta forma, pode levantar-se a hipótese de o zinco assumir este papel no enzima *LiNOS*.

Os resultados obtidos indicam ainda que os resíduos de cisteína 246, 409, 422 e 430 são, mais provavelmente, parte de uma cistina (Quadro 4). As ligações persulfureto presentes nas cistinas tem como função a estabilização da estrutura terciária da proteína. Sabe-se que este tipo de ligações existe também nas isoformas humanas do NOS.

Anteriormente previu-se a nitrosilação do *LiNOS* no resíduo C546 (motivo [KRHDE]C[DE]) (Fábio), tendo a modificação pós-traducional foi confirmada por *Western Blot*. Na previsão realizada com a ferramenta DiANNA 1.1, é mais provável que este resíduo de cisteína se encontre livre. Contudo, não é rejeitada a sugestão de que o resíduo liga o NO, uma vez que esta modificação é muito lábil e é, também reguladora do enzima (o NO desestabiliza a sua estrutura (Sabino, F. M. R. 2012)), o que faz com que o resíduo se possa encontrar livre.

Após a análise dos vários aspetos mencionados da sequência do *LiNOS*, foi feita a previsão da sua desordem no estado nativo, utilizando três ferramentas bioinformáticas, o PONDR, o DisEMBL e o RONN.

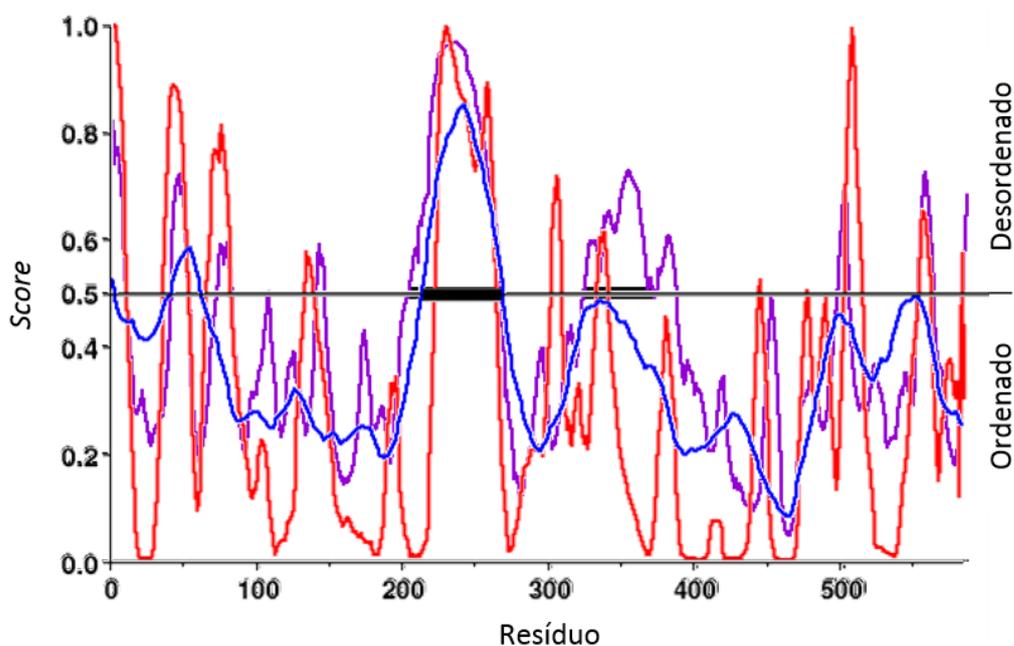


Fig. 28 – Previsão das regiões desordenadas de acordo com a ferramenta PONDR. As designações VSL2 (linha roxa), VL-XT (linha vermelha) e VL3 (linha azul) referem-se aos algoritmos utilizados. As regiões desordenadas previstas por cada algoritmo encontram-se destacadas pela linha de maior largura.

Nos resultados obtidos através da ferramenta PONDR observa-se que a região de maior desordem da proteína se encontra essencialmente, entre o resíduo 200 e 270, prevista pelos 3 algoritmos utilizados (Fig. 28).

O algoritmo VSL2 (Fig. 28, linha roxa) prevê a existência de duas regiões desordenadas, uma entre os resíduos 205 e 266 e outra entre os resíduos 324 e 369. O cálculo realizado por este algoritmo é feito com base na frequência dos resíduos de aminoácidos, na complexidade da sequência, na razão carga/hidrofobicidade e na flexibilidade (Garner E. *et al.* 1998).

O algoritmo VL-XT (Fig. 28, linha vermelha) tem como dados de *input* o valor atribuído à hidropatia e o seu papel consiste em prever a existência de regiões desordenadas longas, tendo detetado com região desordenada o segmento entre os resíduos 222 e 264. Junto à região desordenada prevista por este algoritmo, é possível observar que o *score* atribuído, nos resíduos tanto a montante como a jusante, é muito próximo de zero. Este resultado sugere que, junto à região de desordem destacada, encontra-se um possível local de ligação (Li X. *et al.* 1998, Li X. *et al.* 2000).

O algoritmo VL3 tem como dados de *input* para o cálculo do *score* a carga global dos resíduos (Romero P. *et al.* 2001). Através deste algoritmo, foi prevista a existência de um domínio desordenado numa região da proteína concordante com os restantes algoritmos, entre os resíduos 214 e 269. Assim, pode sugerir-se que, no LiNOS existem dois domínios globulares e um domínio desordenado (Fig. 28 linha azul).

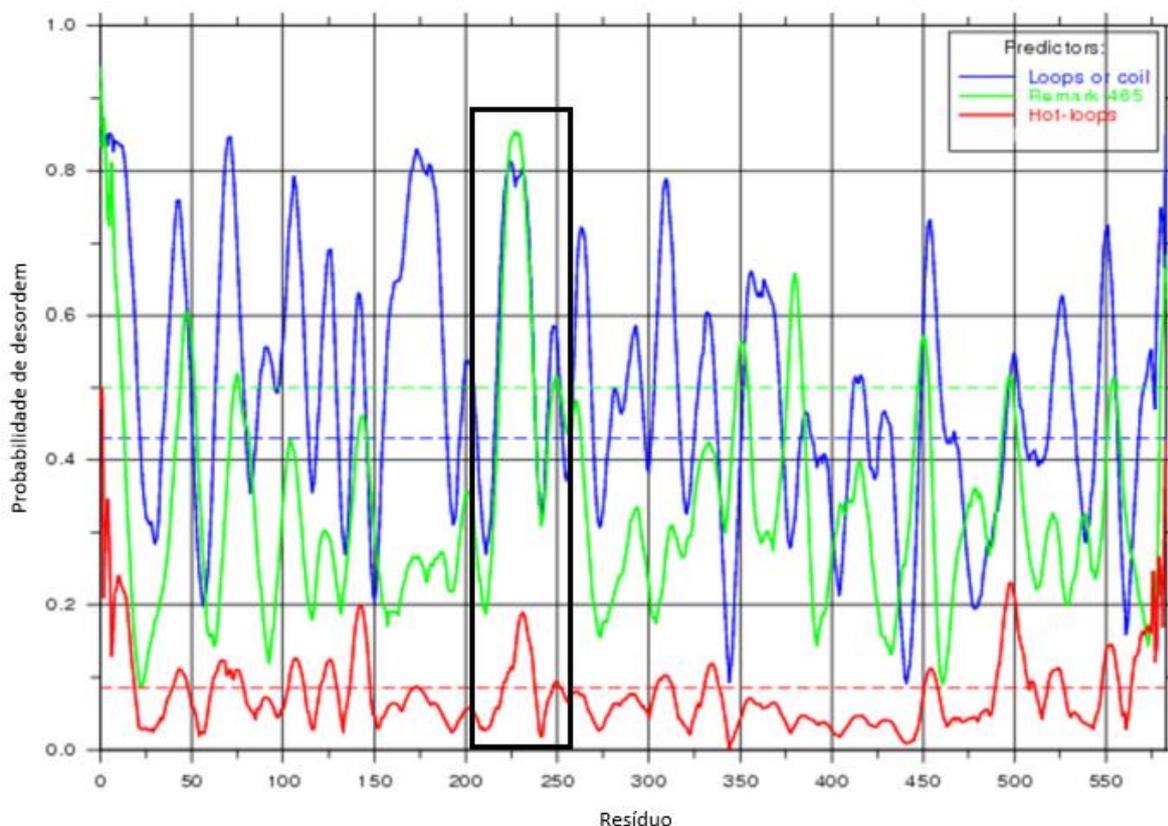


Fig. 29 – Gráfico da previsão da probabilidade de desordem ao longo da sequência usando a ferramenta DisEMBL, através de três algoritmos: *loops or coil* (azul), *remark – 465* (verde) e *hot – loops* (vermelho). As linhas a tracejado indicam o *threshold* para cada algoritmo. O retângulo destaca a região onde, para além das regiões N- e C-terminal, existe concordância entre os três algoritmos e a ultrapassagem do *threshold* é mais acentuada, conferindo à previsão uma maior confiança.

No gráfico obtido através da ferramenta DisEMBL (Fig. 29) é possível observar que a região destacada pelo retângulo concorda com os resultados obtidos através das restantes ferramentas. Nesta região todos os algoritmos utilizados para a previsão ultrapassam o *threshold*. Para além da região destacada, observa-se que os primeiros resíduos das regiões N- e C-terminal não assumem, provavelmente, uma estrutura ordenada, dado que o valor de probabilidade ultrapassa o *threshold* para todos os algoritmos.

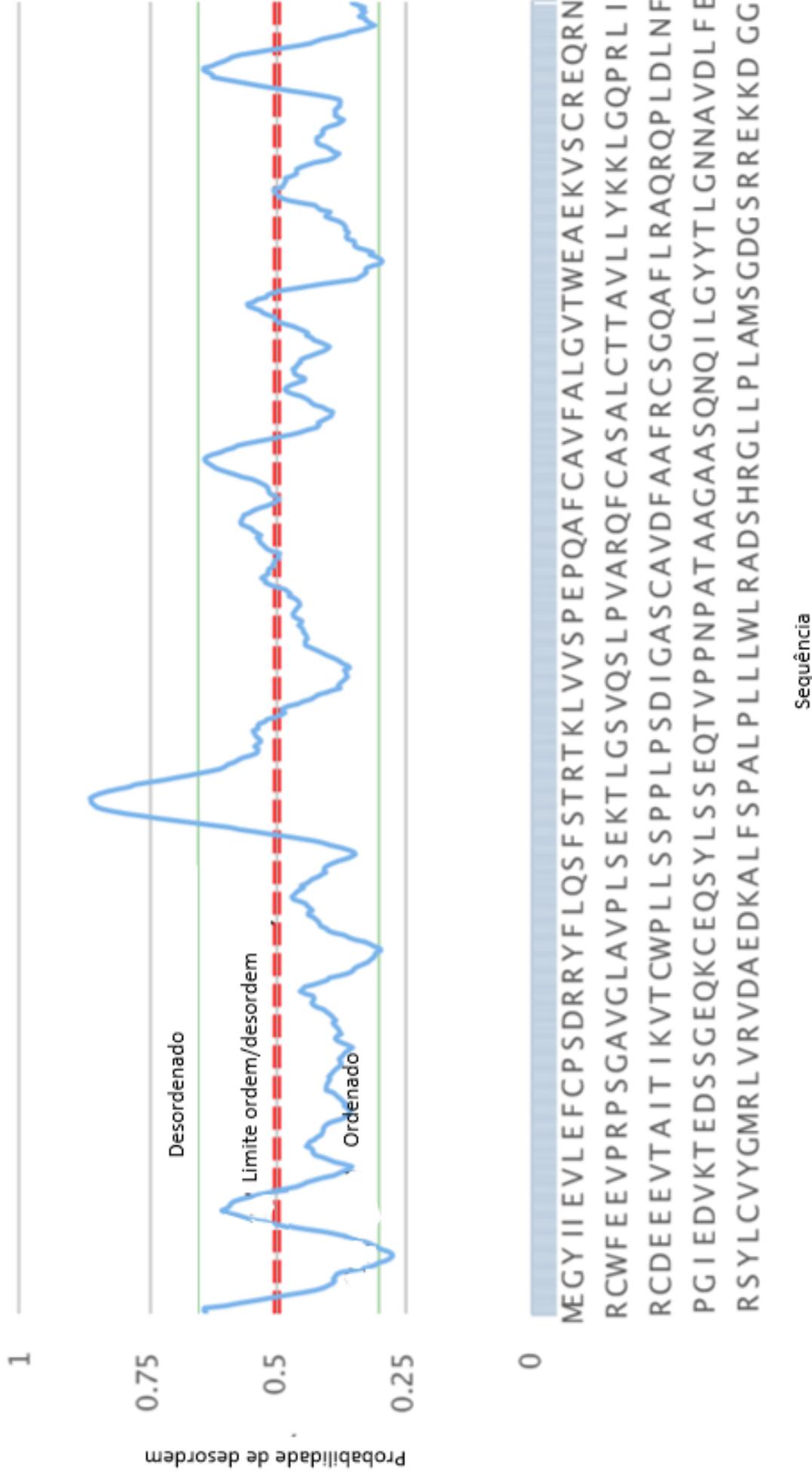


Fig. 30 – Gráfico da probabilidade de desordem da proteína ao longo da sequência RONN. A linha verde indica o valor de probabilidade a partir do qual se considera que existe desordem (abaixo)

No gráfico da figura 30 observa-se que, apesar de haver várias regiões da sequência do *LiNOS* que apresentam valores de probabilidade de desordem que indicam que o mais provável é a região ser desordenada (acima de 50%), apenas um segmento está associado a valores de probabilidade acima do limite para ser considerado desordenado pelo algoritmo da ferramenta RONN (acima de 65%), entre os resíduos 219 e 281 (ver anexo). Os resultados obtidos com esta ferramenta e com as anteriormente referidas estão em concordância.

Após ter sido detetado como região desordenada o segmento entre os resíduos 210 e 270 com maior concordância entre os diferentes algoritmos utilizados, colocou-se a hipótese de existir um domínio desordenado e dois mais ordenados: o primeiro até, aproximadamente, o resíduo 210, e o outro a após o resíduo 270. Assim, foi usado um método de carga-hidropatia para cada domínio putativo, com o objetivo de classificá-los provisoriamente como estruturados ou não-estruturados.

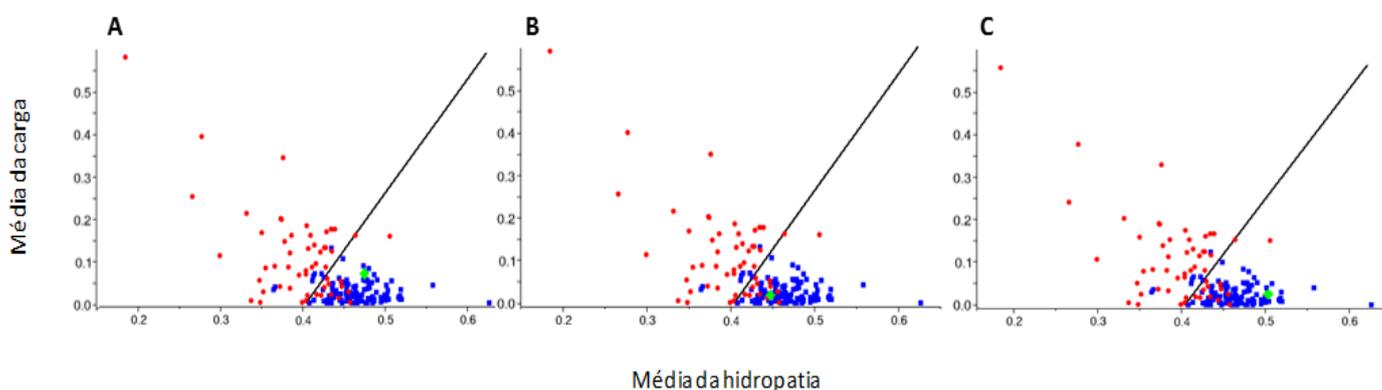
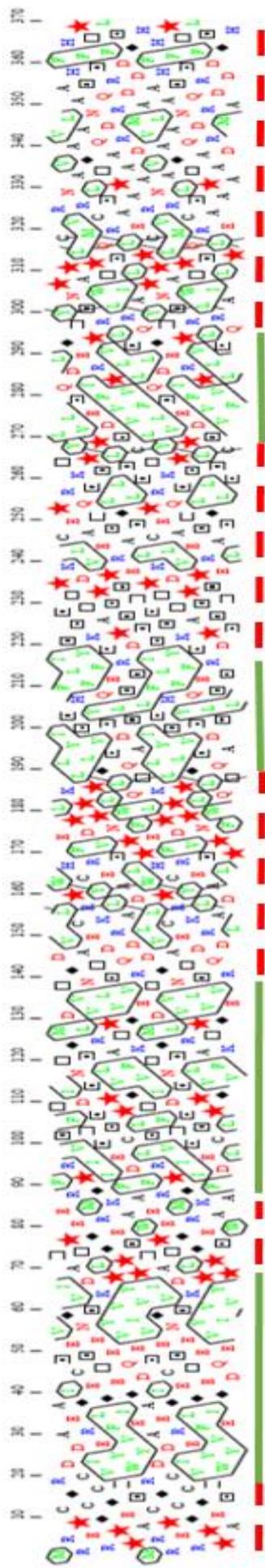


Fig. 31 – Gráfico da média da carga absoluta em função da média da hidropatia. Estrelas vermelhas – Proteínas desordenadas; Quadrados azuis – Proteínas ordenadas; Losango verde – domínio putativo de *LiNOS* (A: primeiro domínio teoricamente ordenado; B: domínio teoricamente desordenado; C: segundo domínio teoricamente ordenado).

Nos gráficos da média da carga absoluta em função da média da hidropatia, de um modo geral, os valores correspondentes a proteínas desordenadas encontram-se à esquerda da curva (menores valores de hidropatia) e os valores correspondentes a proteínas ordenadas à direita da curva (maiores valores de hidropatia). Na figura 31-A é possível observar que o primeiro domínio ordenado putativo se encontra numa região do gráfico correspondente a proteínas ordenadas (do lado direito da curva), observando-se o mesmo para o segundo domínio ordenado putativo (Fig. 31-C).

No caso do domínio desordenado putativo, observa-se que este se encontra do lado direito da curva. No entanto, a sua carga média e hidropatia média encontram-se numa região de valores que são correspondentes a proteínas desordenadas (Fig. 31-B). Perante esta observação e tendo em conta a concordância que existe entre os diferentes algoritmos quanto ao cálculo da probabilidade de desordem desta região da proteína, não é rejeitada a teoria de que é desordenada.

Para além de terem sido realizadas previsões do estado de desordem da proteína a partir da sua sequência, foi também estudada a presença de *clusters* hidrófobos através da execução de um gráfico HCA (do inglês *Hydrophobic Cluster Analysis*) (Fig. 32). Através desta previsão, é possível localizar regiões que se destacam claramente por serem altamente hidrófobas ou desprovidas de *clusters* hidrófobos (Callebaut, I. *et al.* 1997). Após a obtenção do gráfico, este foi confrontado com toda a informação obtida através da análise da sequência do LiNOS, permitindo uma visão integrada dos resultados obtidos.



Possível local de ligação

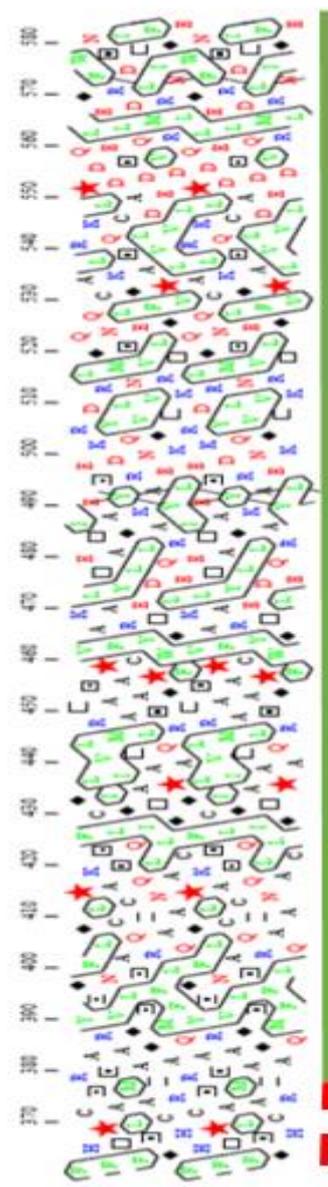


Fig. 32 – Representação gráfica dos *clusters* hidrófobos previstos a partir da estrutura do LINOS. Resíduos rodeados – hidrófobos; Resíduos não rodeados – hidrófilos; Estrela – prolina; Losango – glicina; Quadrado com ponto – serina; Quadrado sem ponto – Treonina; Linha verde a cheio – região ordenada; Linha vermelha a tracejado – região desordenada; Linha azul a cheio – região intermembranas

Assim, o gráfico HCA, em associação com a restante informação prevista a partir da sequência do *LiNOS*, permite partir de uma arquitetura teórica da proteína, o que facilita o estudo futuro das suas estruturas terciária e quaternária.

A partir da estrutura do *LiNOS*, é possível prever que esta proteína apresenta algumas regiões desordenadas (Fig. 32), com maior concordância entre os algoritmos utilizados para a região entre os resíduos 210 e 270. Foi ainda possível localizar prováveis locais de ligação e um segmento transmembranar e prever que os resíduos C12 e C13 têm como ligando o zinco.

4.8 - Previsão da estrutura da proteína

Com o objetivo de uma maior aproximação à compreensão da arquitetura do *LiNOS*, para além da análise de sequência, foi feita a previsão da sua estrutura por homologia (Fig. 34). Com o auxílio da ferramenta HHpred, foi selecionada uma proteína para ser usada como *template*, o enzima NADPH-citocromo P450 redutase. Como foi referido na secção referente à organização da proteína em domínios, foi observado que, teoricamente, o *LiNOS* tem um domínio em comum com esta a proteína escolhida como *template*, o que incrementa a validade da escolha. Apesar de esta proteína ser uma das que apresentou maior *score* na lista dos *templates* detetados, a sua identidade é de apenas 20%. A região da proteína que foi utilizada como *template* foi entre os resíduos 109 e 618.

Ao proceder ao refinamento da previsão de modo a obter a estrutura final teoricamente ótima, constatou-se que existe uma região da estrutura de elevada variabilidade, correspondente a um *loop*, entre os resíduos 320 e 365 (Fig. 33).

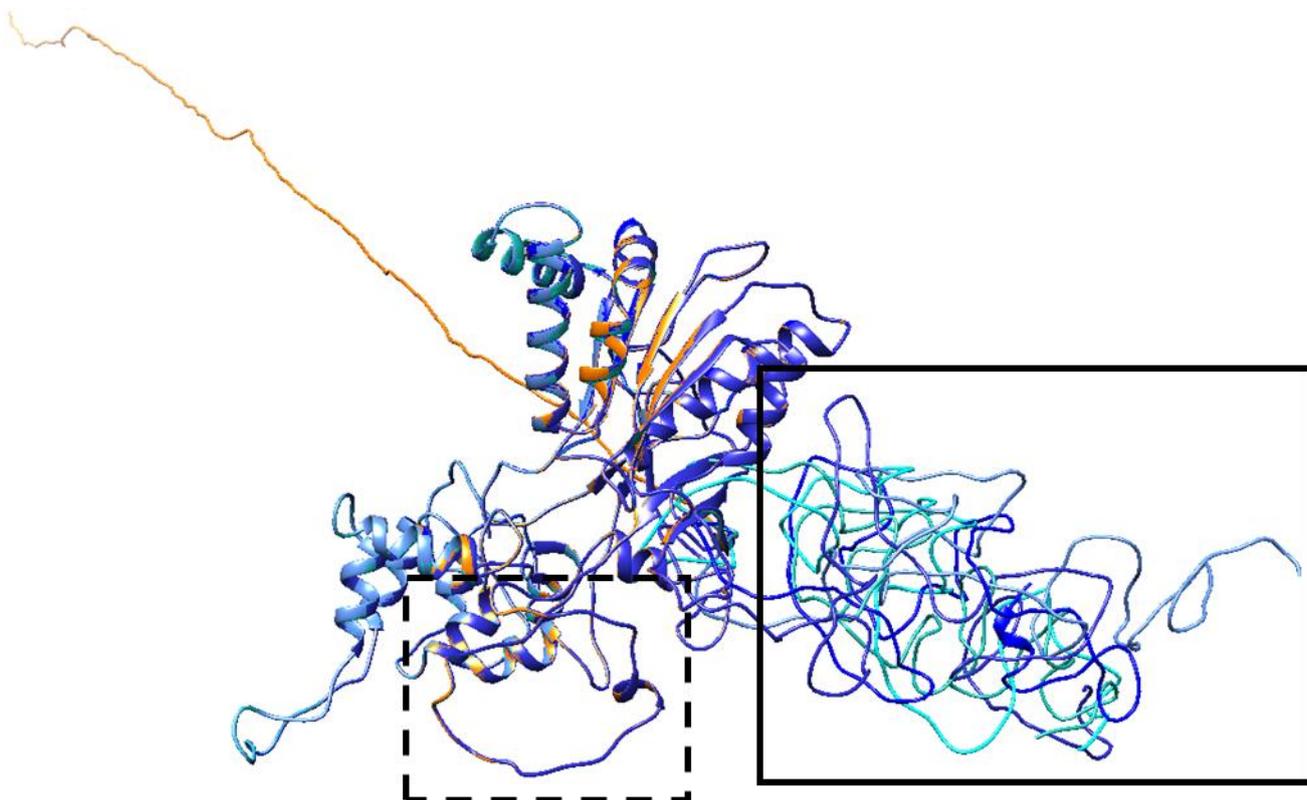


Fig. 33 – Estrutura do *LiNOS* prevista por homologia (laranja) comparada com as restantes estruturas utilizadas para o seu refinamento (em diferentes tons de azul). O retângulo destaca as regiões das estruturas usadas no refinamento com maior variabilidade e distância em relação à estrutura teoricamente ótima. O retângulo a tracejado destaca o *loop* observado entre os resíduos 320 e 365. A imagem da estrutura foi produzida com o programa UCSF Chimera.

O facto de a previsão da estrutura da região entre os resíduos 320 e 365 estar associada a uma variabilidade elevada para regiões correspondentes das estruturas usadas para o refinamento (Fig. 33) é indicativo de que a previsão da estrutura para esta região não está associada a um menor grau de confiança do que para as restantes regiões da estrutura prevista. À semelhança do segmento da sequência da proteína para o qual não foi possível prever a existência de quaisquer elementos de estrutura secundária (resíduos 1 a 94), o facto de se observar uma grande variabilidade nas possíveis orientações espaciais dos resíduos no segmento 320-365 pode dever-se à não adequação total do *template* à sequência do *LiNOS*.

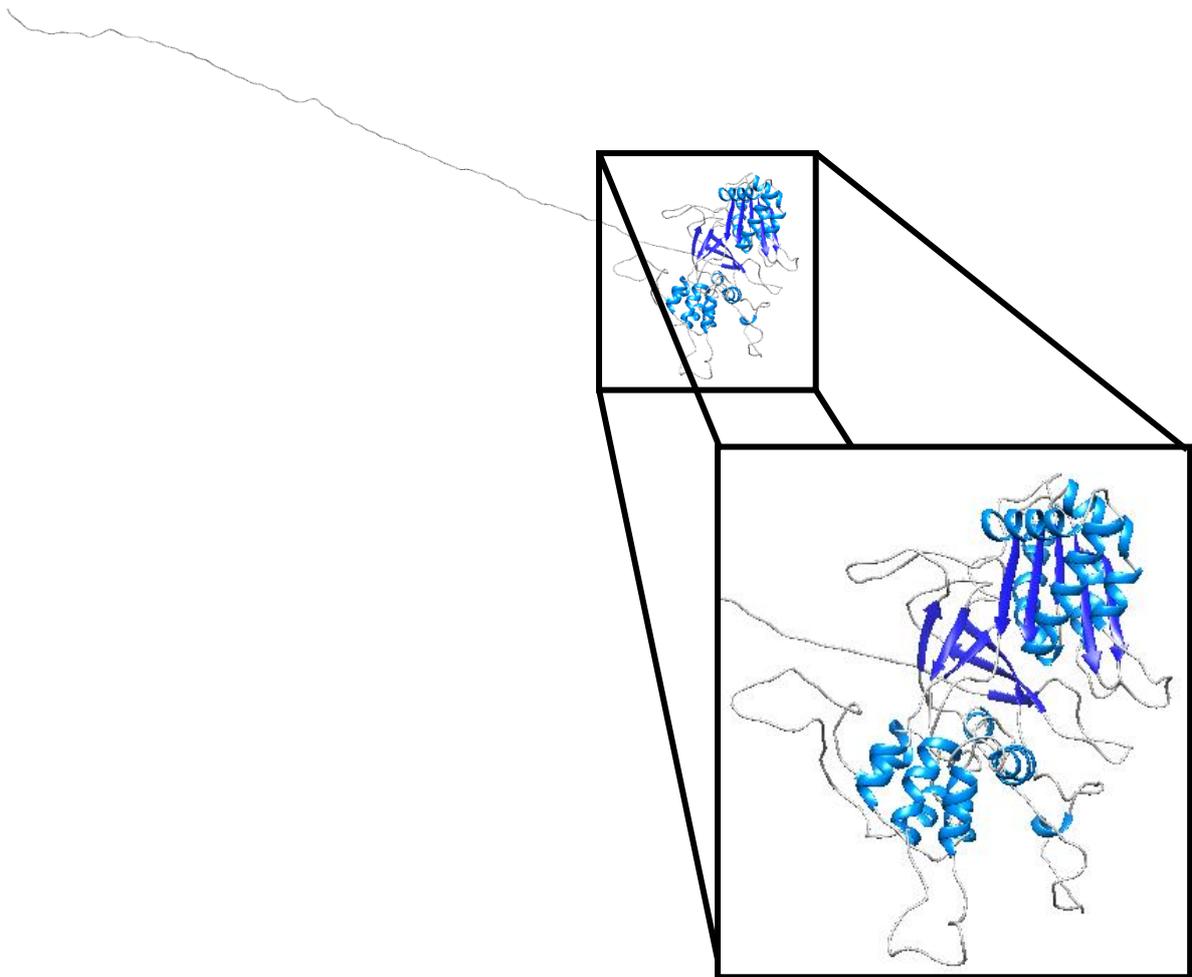


Fig. 34 – Estrutura do LiNOS prevista por homologia, com destaque para a região cuja estrutura foi possível determinar (95-584). A imagem da estrutura foi produzida com o programa UCSF Chimera.

Foi possível realizar a previsão da estrutura para uma parte da sequência, entre os resíduos 95 e 584 (Fig. 34), enquanto que para a região da sequência entre os resíduos 1 e 94 não foi possível obter uma previsão para a estrutura. No seguimento desta observação, foram selecionadas outras proteínas para utilizar como *template*, tendo-se observado regiões sem elementos de estrutura secundária mais extensas (dados não apresentados).

No que diz respeito à região da sequência para a qual foi prevista uma estrutura, observa-se que existem vários *coiled coils* (Fig. 34, a cinzento), ao contrário do que foi previsto na análise da sequência. Nesta previsão, pode observar-se que é frequente a existência de *loops* na estrutura e, quanto maior é a extensão do *loop*, maior poderá ser a sua variabilidade quanto à organização espacial se não houver outros constrangimentos conformacionais.

A observação da existência de *coiled coils* através da previsão da estrutura por homologia está associada a uma maior confiança do que por análise da sequência *de novo*, uma vez que uma análise *de novo* apenas se baseia em dados físicos. Assim, uma previsão por homologia aproxima-se mais da realidade, dado que tem em conta a estrutura conhecida de proteínas com homologia de sequência com a proteína em estudo, baseando-se em dados evolutivos. Desta forma, neste tipo de previsão, está sempre presente o facto de que, na estrutura de uma proteína, existe um compromisso entre a estabilidade e a função, não correspondendo apenas à conformação de menor energia, ao contrário do que é previsto através de métodos *de novo*. Apesar do *template* utilizado não permitir a previsão da estrutura para toda a sequência, pode sugerir que o LiNOS contém na sua estrutura mais *coiled coils*/regiões de baixa complexidade do que a análise *de novo* da sua sequência indica.

Como já foi referido anteriormente, através da análise da sequência de LiNOS, a região entre os resíduos 210 e 270 foi prevista como desordenada. A previsão da estrutura por homologia revela ser em parte concordante, uma vez que é possível observar que esta região se encontra maioritariamente desordenada (Fig. 35).

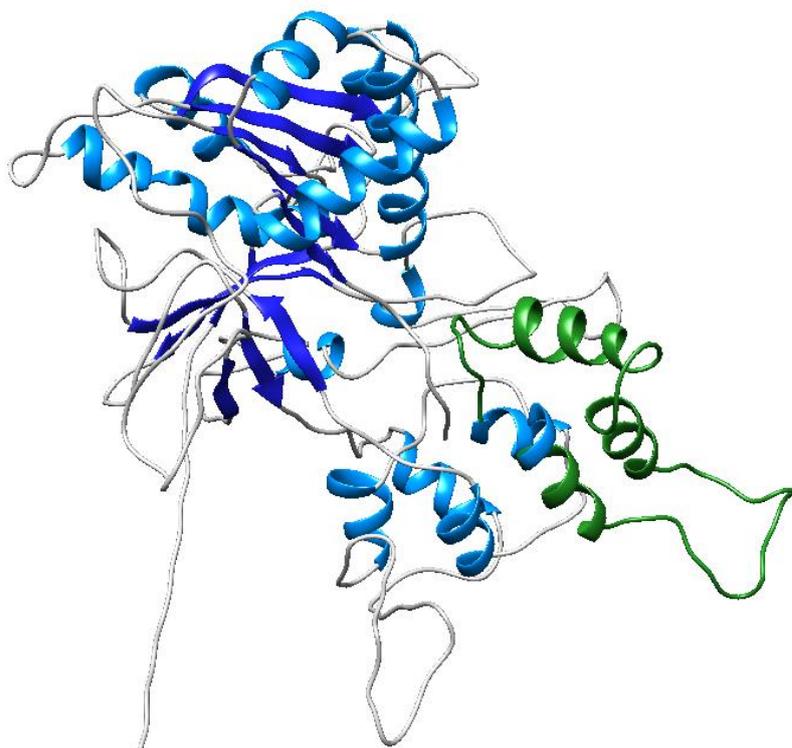


Fig. 35 – Estrutura do LiNOS prevista por homologia, com destaque para a região prevista como desordenada através da análise da sequência, a verde. A imagem da estrutura foi produzida com o programa UCSF Chimera.

Após obtida a estrutura por homologia, foram também analisados dos resíduos de cisteína que se previu participarem, mais provavelmente, numa ligação persulfureto: C246, C409, C422 e C530. Nesta análise, concluiu-se que os resíduos se encontravam em posições distantes (C409-C422: 18,648 Å; C530-C422: 20,497 Å; C530-C409: 16,409 Å; C246-C409: 44,792 Å; C246-C422: 56,944Å; C246-C530: 38,358 Å). Desta forma, não é possível concluir, através da análise da estrutura obtida por homologia, que estes resíduos formem ligações persulfureto intramoleculares. Uma das possíveis explicações é que estes resíduos podem, estar envolvidos em ligações persulfureto entre os monómeros, contribuindo assim para a oligomerização da proteína.

A estrutura do *LiNOS* para a região entre os resíduos 95 e 584 prevista por modelação poderá ser um ponto de partida para a compreensão da estrutura oligomérica desta proteína. No entanto, é essencial que sejam recolhidos tantos dados experimentais quantos possível.

5 – Conclusões e Perspetivas

A leishmaniose visceral é uma doença ainda sem uma solução viável, dadas as limitações das terapêuticas aplicadas atualmente (Goto, H. & Lindoso, J. A. 2010). Assim, para além de ser essencial a sua prevenção, principalmente através do controlo do vetor e do principal hospedeiro (Chappuis, F. *et al.* 2007), é de grande importância a pesquisa de novos alvos terapêuticos, de modo a viabilizar o combate à leishmaniose visceral. Nesta pesquisa, deve-se tirar partido das diferenças bioquímicas entre o parasita e o hospedeiro humano. Neste contexto, o enzima NOS de *Leishmania infantum* surge como um potencial alvo terapêutico. Ao produzir NO, um importante mensageiro celular, tem um profundo impacto na regulação bioquímica (Jing, Q. *et al.* 2014, Tejero, J. & Stuehr, D. 2013, Genestra, M. *et al.* 2006, Genestra, M. *et al.* b) 2003) e, uma vez que não possui homologia de sequência com o NOS humano (Silva, F. S., 2010), apresentará diferenças a nível molecular que poderão ser exploradas para regular selectivamente a sua actividade. Genestra, M. e colaboradores (Genestra, M. *et al.* a) 2003) observaram que, quando os parasitas *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* cresciam num meio com L-NAME, um inibidor do NOS, a percentagem de macrófagos de murganho infetados decrescia de 93% para 6%. Estes resultados são indicativos da importância da formação de NO pelo parasita para o estabelecimento da infeção e fundamentam a hipótese de que este processo também é importante para o estabelecimento da infeção por *L. infantum*.

Atualmente sabe-se que, em *L. infantum*, o NO reage com proteínas através de um processo denominado nitrosilação, possivelmente regulando a sua actividade (Nunes, J. P. C. 2013). De entre as proteínas nitrosiladas, destacam-se proteínas responsáveis por processos de *foldig*, resposta ao *stress* e metabolismo dos glúcidos (Nunes, J. P. C. 2013).

Sendo o NO essencial para o parasita, é fundamentado que o NOS de *Leishmania infantum* tem um elevado potencial como alvo terapêutico na leishmaniose visceral.

No presente trabalho, foi feita a caracterização estrutural e funcional do LiNOS. Anteriormente, já era conhecido que a proteína recombinante formava um tetrâmero *in vitro* mediante determinadas condições (Sabino, F. M. R. 2012). Neste trabalho foi comprovado que o LiNOS expresso de forma nativa constitui um homotetrâmero. Ao estudar o efeito do principal cofator (BH₄) e do heme na estabilidade da estrutura quaternária da proteína concluiu-se que ambos são essenciais para a estabilidade do LiNOS. No que diz respeito ao grupo heme, é de salientar a sua importância para que ocorra o *foldig* correto da proteína. Na sua ausência, ocorre a formação de agregados. Com base na informação obtida, foi possível sugerir o modelo presente na figura 36 para a formação da estrutura quaternária do LiNOS.

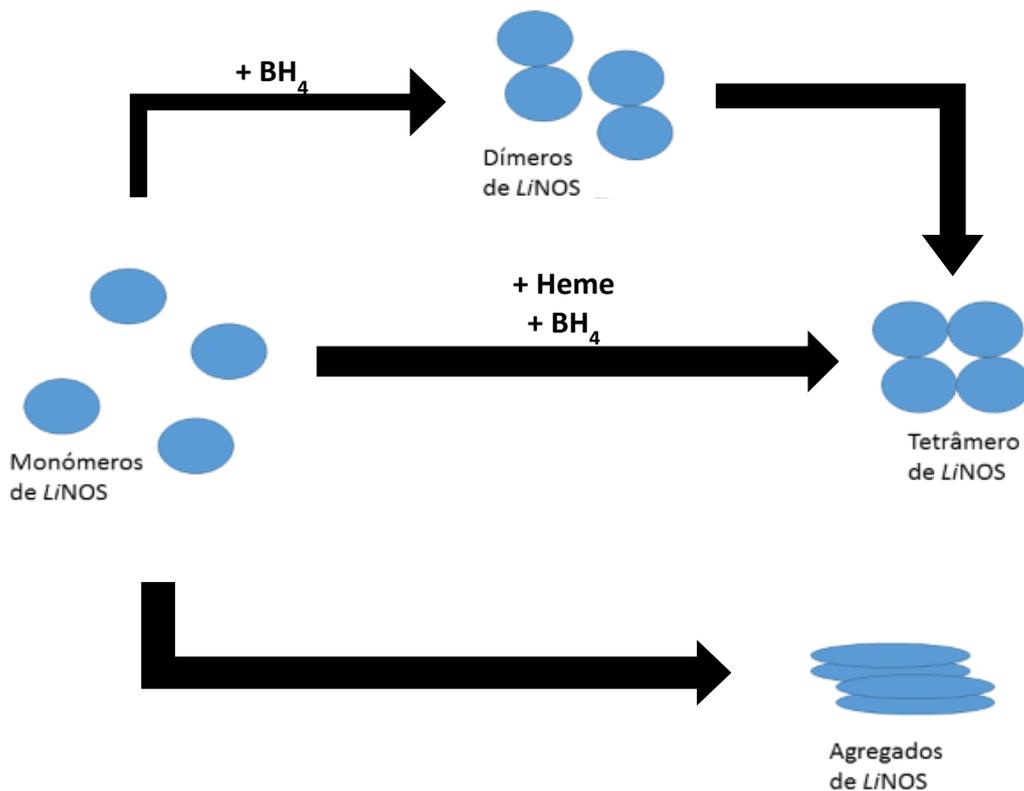


Fig. 36 – Modelo da formação da estrutura quaternária de *LiNOS*. Na ausência de BH_4 e heme a estrutura da proteína não é estável, observando-se a formação de agregados. O BH_4 promove a estabilidade da estrutura de *LiNOS*, mas não de forma totalmente eficiente sendo que, para que a proteína tenha uma estrutura quaternária estável, é necessária a presença de heme.

Para além dos estudos experimentais realizados, foi também estudada teoricamente a organização estrutural e funcional do *LiNOS*. Os resultados obtidos assumem uma grande importância, na medida em que permitem direccionar futuros estudos experimentais.

No que diz respeito à organização da proteína em domínios, conclui-se que esta possui um domínio característico dos enzimas da classe dos oxidoredutases na região N-terminal. Desta organização constam ainda domínios característicos da ligação da proteína a NAD/FAD(P). Esta previsão é concordante com o facto de a proteína em estudo ter uma atividade de sintase do óxido nítrico, sendo estes domínios encontrados no NOS de outras espécies (Hyde, G. E. *et al.* 1991, Bredt, D. A. *et al.* 1991).

Na análise da sequência do *LiNOS* foi também previsto que a proteína possui um segmento transmembranar entre os resíduos 424 e 446, sendo que o segmento a jusante se encontra fora do citosol e o segmento a montante no citosol. No seguimento deste resultado torna-se importante que seja estudada experimentalmente a localização celular do *LiNOS*. Uma vez que se prevê que a região da proteína desde o N-terminal até ao resíduo 223 se encontra fora do citosol, pode-se colocar a hipótese que a proteína poderá estar orientada para o interior de um organelo celular ou para o exterior da célula.

No estudo do papel dos resíduos de cisteína na proteína foi previsto que os resíduos C12 e C13 têm como ligando o ião Zn^{2+} . São, portanto, as *zinc-ligating cysteines* características dos NOS conhecidos. Consequentemente, é necessário estudar a sua influência tanto na atividade do enzima como na estabilidade da sua estrutura. No caso do NOS humano, é conhecido que o complexo cisteína- Zn^{2+} tem como papel a regulação do estado de oxidação no processo do transporte eletrónico. Este complexo é também importante na formação do dímero, dado que leva à formação de uma interface de interação entre os monómeros (Pace, N. J. & Weerapana, E. 2014). Assim, pode-se levantar a hipótese de o zinco assumir o mesmo tipo de papel no *LiNOS*.

No âmbito da análise teórica da sequência do *LiNOS*, é ainda de salientar a previsão de que a região da proteína entre os resíduos 210 e 270 se encontra desordenada, existindo consistência na previsão realizada com recurso a diferentes algoritmos. Através do algoritmo VL-XT (utilizado com a ferramenta PONDR) foi possível prever que, nas regiões imediatamente a montante e a jusante da região desordenada se encontram possíveis locais de ligação, sendo a ligação potencialmente estabelecida com a caveolina (dados não publicados).

Para além das análises referidas, foi ainda feita uma previsão da estrutura do monómero de *LiNOS* por homologia. Através desta previsão obteve-se um modelo da estrutura da proteína compreendido entre os resíduos 95 e 584. Futuramente, será importante a aquisição de dados experimentais de carácter estrutural (cristalografia ou cryo-EM).

Nesta abordagem experimental, dever-se-á procurar saber: a) quais são os resíduos que estão à superfície e no *core* da proteína; b) como é que os monómeros interagem entre si e com os diferentes ligandos; c) a localização e arquitetura do centro ativo do enzima. Neste âmbito, surgiu uma nova abordagem promissora, o *Protein Molecular Painting* (Luchini, A. *et al.* 2014). Esta consiste em expor a proteína purificada a uma solução contendo moléculas que se ligam não covalentemente aos grupos amida (como por exemplo o *Remazol Brilliant Blue*) que se encontram à superfície da proteína. Como consequência desta ligação, ao proceder-se à hidrólise da proteína para analisar os péptidos por espetrometria de massa, a tripsina não vai catalisar a hidrólise da ligação peptídica nos locais que estão expostos ao solvente.

Ao comparar os péptidos teóricos com os péptidos obtidos experimentalmente, espera-se observar que alguns dos péptidos teóricos não são identificados no espetro, identificando-se outros correspondentes a um valor de m/z superior. Estes péptidos encontram-se expostos ao solvente quando a proteína está na sua forma nativa, estando os restantes no *core* ou em regiões de contacto entre subunidades ou com ligandos. Neste momento, estão a ser realizados estudos preliminares de *Molecular Painting* com a hemoglobina bovina, dado que, à semelhança do *LiNOS*, é uma proteína multimérica e a sua estrutura é conhecida. Estes estudos têm como objetivo de otimizar esta metodologia para posteriormente ser aplicada ao *LiNOS*.

No que diz respeito à elucidação da arquitetura nativa do *LiNOS*, será também importante estudar a sua composição em modificações pós-traducionais. De modo a realizar os estudos estruturais necessários, é essencial uma otimização do processo desde a expressão até à purificação da proteína nativa, uma vez que os ensaios experimentais a realizar requerem quantidades de proteína superiores àquelas que foram obtidas. Uma das possíveis abordagens implica aumentar o volume da cultura de *L. infantum* a partir da qual se purifica a proteína. Para além disso, poder-se-á ainda utilizar-se outro sistema de expressão, com o objetivo de que o *folding* ocorra de forma nativa com e com as eventuais modificações pós-traducionais, de forma mais rentável quanto à quantidade de proteína expressa.

O trabalho aqui apresentado permitiu fazer uma maior aproximação à estrutura do enzima *LiNOS* e, por outro lado, gerar informação crucial para dirigir os próximos passos experimentais no sentido da sua elucidação total. A longo prazo, após estabelecidos a estrutura tridimensional e todos os aspetos relacionados com a função do *LiNOS*, este enzima poderá ser identificado como alvo terapêutico da leishmaniose visceral.

6 – Referências

- Akopyants, N. S. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 2009, Vol. 324(5924): p.265-8
- Alderton, W. K. *et al.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 2001, Vol. 357: p.593-615
- Alibolandi, M. & Mirzahoseini, H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int*, 2011, Vol. 2011
- Basu, N. K. *et al.* Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, Vol. 156: p.43-7
- Beverley, S. M. & Clayton C. E. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol Biol*, 1993, Vol. 21: p.333-48
- Bornberg-Bauer, E. *et al.* Computational Approaches to Identify Leucine Zippers. *Nucleic Acids Res*, 1998, Vol. 26(11): p. 2740-6
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem*, 1976, Vol. 72 (1-2): p. 248-54
- Bredt, D. & Snyder, S. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, Vol. 87: p.682-5
- Bredt, D. A. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991, Vol. 361(6329): p.714-8
- Calegari-Silva, T. C. *et al.* NF- κ B-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazoniensis* macrophage infection. *Immunol Lett*, 2009, Vol. 127:p.19-26
- Callebaut, I. *et al.* Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol Life Sci*, 1997, Vol. 53(8): p.621-45
- Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 2007, Vol. 5: p.7-16
- Coler, R. N. & Reed, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 2005, Vol. 21(5): p.244-9
- Cserzo, M. *et al.* On filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng*, 2002, Vol. 15: p.745-52

- Dea-Ayuela, M. A. *et al.* Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by in vitro exposure to a nitric oxide donor. *International J Med Microbiol*, 2009, Vol. 200: p.221–32
- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004, Vol. 27(5): p.305-18
- Dujardin, J. C. *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 2008, Vol. 14(7): p.1013-8
- Dunker, A. K. *et al.* Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*, 2001, Vol. 19: p.26-59
- Dutta, S. *et al.* Combinational Sensitization of *Leishmania* with Uroporphyrin and Aluminum Phthalocyanine Synergistically Enhances their Photodynamic Inactivation in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol*, 2012, Vol. 88(3): p.620-5
- Eddy, S. R. What is a hidden Markov model? *Nat Biotechnol*, 2004, Vol. 22: p.1315-16
- Ejghal, R. *et al.* SLC11A1 polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis in Moroccan patients. *Acta Trop*, 2014, Vol. 140:p.130-6
- Eudes, R. *et al.* A generalized analysis of hydrophobic and loop clusters within globular protein sequences. *BMC Struct Biol*, 2007, Vol. 7(2)
- Ferrè, F. & Clote, P. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res*, 2006, Vol. 34: W182-5
- Ferrè, F. & Clote, P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Res*, 2005, Vol. 33: W.230-2
- Ferron, F. *et al.* A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins*, 2006, Vol. 65: p.1-14
- Figueiredo, M. M. *et al.* Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. *BMC Immunol*, 2013, Vol. 14(22)
- Finn, R. D. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 2014, Vol. 42(D1): D222-30
- Forstermann, U. *et al.* Enzymes synthesizing guanylylcyclase activating factor (GAF) in endothelial cells, neuroblastoma cells and rat brain. *J Cardiovas Pharm*, 1991, Vol. 17: p.557-64

- Garcia-Cardena, G. *et al.* Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem*, 1997 Vol 272: p.25437-40
- Garner E. *et al.* Predicting long disordered regions in protein from amino acid sequence. *Biophys J*, 1998, Vol. 74(Part 2 of 2): A1-452
- Genestra, M. *et al.* a) Effect of L-Arginine Analogs and a Calcium Chelator on Nitric Oxide (NO) Production by *Leishmania* sp. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2003, Vol. 18(5): p.445-52
- Genestra, M. *et al.* b) Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. *Med Microbiol Immunol*, 2003, Vol. 192: p.217-23
- Genestra, M. *et al.* c) Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Nitric Oxide – Biol Ch*, 2003, Vol. 8: p.1-6
- Genestra, M. *et al.* Nitric Oxide Synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazoniensis* axenic amastigotes. *Arch Med Res*, 2006, Vol. 37: p.328-33
- Gilles, H. M., *Protozoal Diseases*, Arnold Hodder Headline Group, 1999, London
- Goto, H. & Lindoso, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010, Vol. 8(4): p. 419-33
- Green, A. A. & Hughes, H. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Method Enzymol*, 1955, Vol. 1(10): p.67-90
- Grevelink, S. A. and Lerner, E. A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 1996, Vol. 34(2 Pt 1): p. 257-72
- Hakoshima, T. Leucine Zippers. *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley and Sons, 2005, Vol. 20: p.1-5
- Haldar, A. K. *et al.* Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Molecular Biology International*, 2011, Vol. 2011: p.1-23
- Hofmann, K. and Stoffel, W. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1993, Vol. 334: p.166

- Hooja, S. *et al.* First reported cases of diffuse cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus positive patients in Jaipur District of Rajasthan, India. *Trop Parasitol*, 2014, Vol. 4(1): p.50-2
- Hyde, G. E. *et al.* The sequence of squash NADH:nitrate reductase and its relationship to the sequences of other flavoprotein oxidoreductases. A family of flavoprotein pyridine nucleotide cytochrome reductases. *J Biol Chem*, 1991, Vol. 266(35): p. 23542-7
- Jing, Q. *et al.* Combination of chiral linkers with thiophenecarboximidamide heads to improve the selectivity of inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, Vol. 24:p.4504-10
- Jong, E. C. & McMullen, R. *The travel and tropical medicine manual*. 3rd ed. 2003, Philadelphia, Pa.: Saunders. xviii, 644 p
- Käll, L. *et al.* A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *J Mol Biol*, 2004, Vol. 338(5): p.1027-36
- Kanellopoulos, P. *et al.* Assessment of the infectivity potential of *Leishmania infantum*, using flow cytometry. *Exp Parasitol*, 2014, Vol. 145:p.29-33
- Karlsson, O. A. *et al.* The Transition State of Coupled Folding and Binding for a Flexible β -Finger. *J Mol Biol*, 2012, Vol. 417(3): p.253-61
- Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 2011, Vol. 9: p.604-15
- Kaye, P. M. & Aebischer, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin Microbiol Infect*, 2011, Vol. 17(10): p.1462-70
- Klatt, P. *et al.* Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J*, 1995, Vol. 14(15): p. 3687-95
- Kozlowski, L. P. 2007-2013 Isoelectric Point Calculator. <http://isoelectric.ovh.org>
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, Vol. 227(5259): p.680-5
- Li, X. *et al.* Comparing predictors of disordered protein. *Genome Inform Ser*, 2000, Vol. 11: p.172-84
- Li, X. *et al.* Predicting protein disorder for N-, C- and internal regions. *Genome Inform Ser*, 1999, Vol. 10: p.30-40

- Li, H. *et al.* Structures of human constitutive nitric oxide synthases. *Acta Cryst*, 2014, Vol. 70: p.2667-74
- Li, H. *et al.* The Mobility of a Conserved Tyrosine Residue Controls Isoform-Dependent Enzyme–Inhibitor Interactions in Nitric Oxide Synthases. *Biochemistry*, 2014, Vol. 53(32): p.5272-9
- Linding, R. *et al.* Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*, 2003, Vol. 11(11): p.1453-9
- Lopes, A. P. *et al.* Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasite Vector*, 2013, Vol. 6(178)
- Luchini, A. *et al.* Protein painting reveals solvent-excluded drug targets hidden within native protein-protein interfaces. *Nat Commun*, 2014, Vol. 22(5), 4413
- Mahmood, T. and Yang, P.-C. Western Blot: technique, theory and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 2012, Vol. 4(9): p.429-34
- Maia, C. *et al.* *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Mem I Oswaldo Cruz*, 2013, Vol. 108(4): p.481-7
- Martinez-Ruiz, A. *et al.* Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 2011, Vol. 51(1): p.17-29
- McConville, M. J. & Naderer, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*, 2011, Vol. 65: p.543-61
- McDonnell A. V. *et al.* Paircoil2: Improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics*, 2006, Vol. 22(3): p.365-8
- Mitchell, A. *et al.* The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res*, 2015, Vol. 43: D213-21
- Moncaz, A. *et al.* Characterization of breedings sites of *Phlebotomos orientalis* – The vector of visceral leishmaniasis in northwestern Ethiopia. *Acta Trop*, 2014, Vol. 139:p.5-14
- Neuber, H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2008, Vol. 6(9): p.754-65
- Nunes, J. P. C. A nitrosilação de proteínas em *Leishmania infantum*. Tese de Mestrado, Repositório UL, 2013

- Pace, N. J. and Weerapana, E. Zinc-Binding Cysteines: Diverse Functions and Structural Motifs. *Biomolecules*, 2014, Vol. 4: p.419-34
- Palatnik-de-Sousa, C. B. and Day, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vector*, 2011, Vol. 4: p.197
- Paveto, C. *et al.* The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 1995, Vol. 270: p.1-4
- Petersen, T. N. *et al.* SignalIP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 2011, Vol. 8: p.785-6
- Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 2004, Vol. 13: p.1605-12
- Prabhakar, P. *et al.* A Chimeric Transmembrane Domain Directs Endothelial Nitric-oxide Synthase Palmitoylation and Targeting to Plasmalemmal Caveolae. *J Biol Chem*, 2000, Vol. 274: p. 19416-21
- Quinnell, R. J. & Courtenay, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 2009, Vol. 136(14): p. 1915-34
- Ranganathan, R. & Ross, E. M. PDZ domain proteins: Scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol*, 1997, Vol. 7(12): p.770-3
- Reis, A. B. *et al.* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 2010, Vol. 26(7): p.341-9
- Rhoads, A. R. and Friedberg, F. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, 1997 Vol. 11: p.331-40
- Romero P. *et al.* Sequence complexity of disordered protein. *Protein Struct Funct Genet*, 2001, Vol. 42: p.38-48
- Sabino, F. M. R. Caracterização Cinética e Estrutural do Sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*, Tese de Mestrado, Repositório UL, 2012
- Sali, A. *et al.* Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. *Proteins*, 1995, Vol. 23: p.318-26
- Salter, M. & Knowles, R. G. Assay of NOS activity by the measurement of conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by NO. *Methods Mol Biol*, 1998, Vol. 100: p. 61-5
- Savoia, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 2015, Vol. 9(6): p.588-96

- Shevchenko, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 2006, Vol. 1(6): p. 2856-60
- Silva, F. S. Caracterização do Sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*, Tese de Mestrado, Repositório UL, 2010
- Silva, M. S. *et al.* Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in *Leishmania infantum* as a therapeutic target by modelling and computer simulation. *FEBS*, 2005, Vol. 272: p.2388-98
- Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 2005, Vol. 99(4): p.303-10
- Soares-Bezerra, R. J. *et al.* Effect of mesoionic 4-phenyl-5-(cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride derivative salts on the activities of the nitric oxide synthase and arginase of *Leishmania amazonensis*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2008, Vol. 23(3): p.328-33
- Soares-Bezerra, R. J. *et al.* In vitro evaluation of 4-phenyl-5-(4'-X-phenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylaminide chlorides and 3[N-4'-X-phenyl]-1,2,3-oxadiazolium-5-olate derivatives on nitric oxide synthase and arginase activities of *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol*, 2013, Vol. 135: p.50-4
- Söding, J. *et al.* The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res*, 2005, Vol. 33: W244-8
- Söding, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 2005, Vol. 21: p.951-60
- Stuehr, D. *et al.* Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, Vol. 88: p7773-7
- Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1999, Vol. 1411(2-3): p.217-30
- Sundar, S. *et al.* Implementation research to support the initiative on the elimination of kalaazar from Bangladesh, India and Nepal – the challenges for diagnosis and treatment. *Trop Med Int Health*, 2008, Vol. 13: p.2-5
- Tejero, J. & Stuehr, D. Tetrahydrobiopterin in Nitric Oxide Synthase. *IUBMB*, 2013, Vol. 65(4): p.358-65
- Tiuman, T. S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*, 2011, Vol. 15(8): p.525-32

- Tomás, A. M. & Romão, S. F. Biologia do parasita (Capítulo I). In: Leishmaniose canina, Santos-Gomes, G. M. e IMfonseca Eds. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações S.A., 2008
- Upadhyay, A. K. *et al.* Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol*, 2014, Vol. 5(486): p.1-10
- Wegener, G. & Volke V. Nitric Oxide Synthase Inhibitors as Antidepressants. *Pharmaceuticals*, 2010, Vol. 3(1): p.273-99
- WHO/NTD/IDM HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (HTM) World Health Organization, October 2010
- Wootton, J. C. Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures. *Comput Chem*, 1994, Vol. 18(3): p.269-85
- Yang, Z. R. *et al.* RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics*, 2005, Vol. 21(16): p.3369-76
- Zemojtel, T. *et al.* A novel conserved family of nitric oxide synthase? *Trends Biochem Sci*, 2004, Vol. 29(5): p.224-6

7 – Anexos

Anexo 1: Sequência da proteína *LiNO3*

```

10          20          30          40          50
MRRPREPAPG ECCGSGCTRC VWDIYYDEVA RFEELIAGGG IEEDCTQSSE
60          70          80          90         100
EEEV VNYIGS VVVKYIDPPA LPTTGSPGEW ERAEMKARGF FPIDRIELVS
110         120         130         140         150
CSTSLFSPDT PGISV VNLFT SAKGR TMLPG DVVEVLVTNS RGTQDADDVE
160         170         180         190         200
RLCKALRLDP YAWCELHRSP FVPEDNFPPW LPLQKPLTLG QLLSAYVDIS
210         220         230         240         250
SSSYLLHQSF FESLFRIYS D SKPSSASSTS TTPSPDPEKV RLLEACASSE
260         270         280         290         300
TGPQLLRSL S KSSTPLCYPS LVDVLEVF SF VQIPLDRLLE VSGPLQTRRY
310         320         330         340         350
SLANWIPATL PPSPLQLCMR EVCARRSANL PAATAVGADA QRVADMLNRA
360         370         380         390         400
AQDASRDHSD FFFGHTSHPL CCAARSMTRS AAAAGQRGM YVSFSLFGNSL
410         420         430         440         450
FARQLQAGCT ALCNPAQAKS LCSQLFLIGC GTGIAPLIAA VTQLMLRRAS
460         470         480         490         500
TAAGSAPFPC WVFY GARTKA ELLYDETLQE ALRTGAIKY EYALSREEDN
510         520         530         540         550
KKQGRYVTDL VKRNRLMVTG SLQNEGQLFV CGPAKALLSV RQLVKCDLLA
560         570         580
EPDDDDSVQE QRLLMLEDRG RLNFDIWSTG NIFE

```

Anexo 2: Resultado obtido para a previsão da existência de *Coiled coils*

Quadro A.1 – Score e valor de probabilidade atribuído a cada resíduo de aminoácido de *LiNOS* pela ferramenta PairCoil2 quanto à existência de *coiled coils*. A designação *Register* corresponde à identificação do *coiled coil* ao qual o resíduo pertenceria

Position	Residue	Register	Probability	(Score)
1	M	d	0,00	(-36,74)
2	R	e	0,00	(-36,19)
3	R	f	0,00	(-36,19)
4	P	g	0,00	(-36,19)
5	R	e	0,00	(-33,74)
6	E	f	0,00	(-33,74)
7	P	g	0,00	(-33,74)
8	A	a	0,00	(-26,76)
9	P	b	0,00	(-26,76)
10	G	c	0,00	(-20,30)
11	E	d	0,00	(-20,30)
12	C	e	0,00	(-20,30)
13	C	f	0,00	(-18,48)

14	G	g	0,00	(-17,65)
15	S	a	0,00	(-14,97)
16	G	b	0,00	(-14,97)
17	C	c	0,00	(-14,34)
18	T	d	0,00	(-11,60)
19	R	e	0,00	(-10,73)
20	C	f	0,00	(-10,73)
21	V	g	0,00	(-10,73)
22	W	a	0,00	(-9,38)
23	D	b	0,00	(-5,00)
24	I	c	0,00	(-5,00)
25	Y	d	0,00	(-5,00)
26	Y	e	0,00	(-5,00)
27	D	f	0,00	(-3,88)
28	E	g	0,00	(-3,88)
29	V	a	0,00	(-3,88)
30	A	b	0,00	(-3,88)
31	R	c	0,00	(-3,88)
32	F	d	0,00	(-3,88)
33	E	e	0,00	(-3,88)
34	E	f	0,00	(-3,88)
35	L	g	0,00	(-3,88)
36	I	a	0,00	(-3,88)
37	A	b	0,00	(-3,88)
38	G	c	0,00	(-3,88)
39	G	d	0,00	(-3,88)
40	G	e	0,00	(-3,88)
41	I	f	0,00	(-3,88)
42	E	g	0,00	(-3,88)
43	E	a	0,00	(-3,88)
44	D	b	0,00	(-3,88)
45	C	c	0,00	(-3,88)
46	T	d	0,00	(-3,88)
47	Q	e	0,00	(-3,88)
48	S	f	0,00	(-3,88)
49	S	g	0,00	(-3,88)
50	E	a	0,00	(-3,88)
51	E	b	0,00	(-3,88)
52	E	c	0,00	(-3,88)
53	E	d	0,00	(-3,88)
54	V	e	0,00	(-3,88)
55	V	f	0,00	(-3,88)
56	N	g	0,00	(-3,88)

57	Y	a	0,00	(-5,11)
58	I	b	0,00	(-8,52)
59	G	e	0,00	(-8,60)
60	S	f	0,00	(-8,60)
61	V	g	0,00	(-8,60)
62	V	a	0,00	(-8,60)
63	V	b	0,00	(-8,60)
64	K	c	0,00	(-8,60)
65	Y	d	0,00	(-8,60)
66	I	e	0,00	(-8,60)
67	D	f	0,00	(-8,60)
68	P	c	0,00	(-14,99)
69	P	a	0,00	(-20,77)
70	A	b	0,00	(-20,77)
71	L	c	0,00	(-22,36)
72	P	d	0,00	(-30,09)
73	T	d	0,00	(-28,84)
74	T	e	0,00	(-28,40)
75	G	f	0,00	(-28,40)
76	S	g	0,00	(-26,83)
77	P	a	0,00	(-26,83)
78	G	b	0,00	(-19,79)
79	E	c	0,00	(-19,79)
80	W	d	0,00	(-19,79)
81	E	e	0,00	(-19,79)
82	R	f	0,00	(-19,79)
83	A	g	0,00	(-19,79)
84	E	a	0,00	(-19,79)
85	M	b	0,00	(-19,79)
86	K	c	0,00	(-19,79)
87	A	d	0,00	(-19,79)
88	R	e	0,00	(-19,79)
89	G	f	0,00	(-19,79)
90	F	g	0,00	(-19,79)
91	F	a	0,00	(-19,79)
92	P	b	0,00	(-19,79)
93	I	c	0,00	(-19,79)
94	D	d	0,00	(-19,79)
95	R	e	0,00	(-19,79)
96	I	f	0,00	(-19,79)
97	E	g	0,00	(-19,79)
98	L	a	0,00	(-19,79)
99	V	b	0,00	(-19,79)

100	S	c	0,00	(-19,79)
101	C	d	0,00	(-19,79)
102	S	e	0,00	(-19,79)
103	T	f	0,00	(-19,79)
104	S	g	0,00	(-19,79)
105	L	a	0,00	(-19,79)
106	F	b	0,00	(-19,79)
107	S	c	0,00	(-19,79)
108	P	d	0,00	(-23,66)
109	T	e	0,00	(-23,66)
110	D	f	0,00	(-23,66)
111	P	g	0,00	(-23,66)
112	G	e	0,00	(-17,01)
113	I	f	0,00	(-17,01)
114	S	c	0,00	(-15,71)
115	V	d	0,00	(-14,17)
116	V	e	0,00	(-13,56)
117	N	f	0,00	(-12,30)
118	L	g	0,00	(-12,30)
119	F	a	0,00	(-12,30)
120	T	c	0,00	(-12,07)
121	S	d	0,00	(-10,49)
122	A	e	0,00	(-9,48)
123	K	f	0,00	(-9,48)
124	G	g	0,00	(-9,48)
125	R	a	0,00	(-8,77)
126	T	b	0,00	(-8,68)
127	M	c	0,00	(-6,81)
128	L	d	0,00	(-5,73)
129	P	e	0,00	(-5,73)
130	G	f	0,00	(-0,13)
131	D	g	0,00	(-0,13)
132	V	a	0,00	(-0,13)
133	V	b	0,00	(-0,13)
134	E	c	0,00	(-0,13)
135	V	d	0,00	(-0,13)
136	L	e	0,00	(-0,13)
137	V	f	0,00	(-0,13)
138	T	g	0,00	(-0,13)
139	N	a	0,00	(-0,13)
140	S	b	0,00	(-0,13)
141	R	c	0,00	(-0,13)
142	G	d	0,00	(-0,13)

143	T	e	0,00	(-0,13)
144	Q	f	0,00	(-0,13)
145	D	g	0,00	(-0,13)
146	A	a	0,00	(-0,13)
147	D	b	0,00	(-0,13)
148	D	c	0,00	(-0,13)
149	V	d	0,00	(-0,13)
150	E	e	0,00	(-0,13)
151	R	f	0,00	(-0,13)
152	L	g	0,00	(-0,13)
153	C	a	0,00	(-0,13)
154	K	b	0,00	(-0,13)
155	A	c	0,00	(-0,13)
156	L	d	0,00	(-0,13)
157	R	e	0,00	(-0,13)
158	L	f	0,00	(-0,13)
159	D	g	0,00	(-0,13)
160	P	a	0,00	(-7,59)
161	Y	b	0,00	(-9,92)
162	A	c	0,00	(-10,94)
163	W	d	0,00	(-11,26)
164	C	e	0,00	(-13,92)
165	E	f	0,00	(-13,92)
166	L	g	0,00	(-13,92)
167	H	a	0,00	(-14,12)
168	R	b	0,00	(-14,12)
169	S	c	0,00	(-14,12)
170	P	d	0,00	(-22,60)
171	F	e	0,00	(-24,07)
172	V	f	0,00	(-24,07)
173	P	g	0,00	(-32,09)
174	E	a	0,00	(-32,98)
175	D	b	0,00	(-32,98)
176	N	c	0,00	(-32,98)
177	F	d	0,00	(-34,34)
178	P	c	0,00	(-41,12)
179	P	e	0,00	(-33,43)
180	W	f	0,00	(-25,98)
181	L	g	0,00	(-24,82)
182	P	a	0,00	(-24,82)
183	L	a	0,00	(-16,87)
184	Q	b	0,00	(-16,87)
185	K	c	0,00	(-16,87)

186	P	d	0,00	(-16,87)
187	L	f	0,00	(-10,78)
188	T	g	0,00	(-8,99)
189	L	a	0,00	(-8,99)
190	G	b	0,00	(-8,99)
191	Q	c	0,00	(-8,99)
192	L	d	0,00	(-8,99)
193	L	e	0,00	(-8,99)
194	S	f	0,00	(-8,99)
195	A	g	0,00	(-8,99)
196	Y	a	0,00	(-8,99)
197	V	b	0,00	(-8,99)
198	D	c	0,00	(-8,99)
199	I	d	0,00	(-8,99)
200	S	e	0,00	(-8,99)
201	S	f	0,00	(-8,99)
202	S	g	0,00	(-8,99)
203	S	a	0,00	(-8,99)
204	Y	b	0,00	(-8,99)
205	L	c	0,00	(-8,99)
206	L	d	0,00	(-8,99)
207	H	e	0,00	(-8,99)
208	Q	f	0,00	(-8,99)
209	S	g	0,00	(-8,99)
210	F	a	0,00	(-8,99)
211	F	b	0,00	(-8,99)
212	E	c	0,00	(-8,99)
213	S	d	0,00	(-8,99)
214	L	e	0,00	(-8,99)
215	F	f	0,00	(-8,99)
216	R	g	0,00	(-8,99)
217	I	a	0,00	(-8,99)
218	Y	a	0,00	(-9,07)
219	S	b	0,00	(-9,07)
220	D	c	0,00	(-9,07)
221	S	d	0,00	(-9,07)
222	K	e	0,00	(-9,07)
223	P	f	0,00	(-17,93)
224	S	g	0,00	(-17,93)
225	S	a	0,00	(-17,93)
226	A	b	0,00	(-17,93)
227	S	c	0,00	(-17,93)
228	S	d	0,00	(-17,93)

229	T	e	0,00	(-17,93)
230	S	f	0,00	(-17,93)
231	T	g	0,00	(-17,93)
232	T	a	0,00	(-19,12)
233	P	b	0,00	(-26,62)
234	S	c	0,00	(-24,85)
235	P	d	0,00	(-24,85)
236	D	e	0,00	(-24,85)
237	P	f	0,00	(-24,77)
238	E	g	0,00	(-17,62)
239	K	a	0,00	(-17,62)
240	V	b	0,00	(-17,62)
241	R	c	0,00	(-17,62)
242	L	d	0,00	(-17,62)
243	L	e	0,00	(-17,62)
244	E	f	0,00	(-17,62)
245	A	g	0,00	(-17,62)
246	C	a	0,00	(-17,62)
247	A	b	0,00	(-17,62)
248	S	c	0,00	(-17,62)
249	S	d	0,00	(-17,62)
250	E	e	0,00	(-17,62)
251	T	f	0,00	(-17,62)
252	G	g	0,00	(-17,62)
253	P	a	0,00	(-17,62)
254	Q	b	0,00	(-17,62)
255	L	c	0,00	(-17,62)
256	L	d	0,00	(-17,62)
257	R	e	0,00	(-17,62)
258	S	f	0,00	(-17,62)
259	L	g	0,00	(-17,62)
260	S	a	0,00	(-17,62)
261	K	b	0,00	(-17,62)
262	S	c	0,00	(-17,62)
263	S	d	0,00	(-17,62)
264	T	e	0,00	(-17,62)
265	P	f	0,00	(-17,62)
266	L	g	0,00	(-17,62)
267	C	a	0,00	(-17,62)
268	Y	b	0,00	(-21,38)
269	P	f	0,00	(-24,29)
270	S	g	0,00	(-17,06)
271	L	a	0,00	(-17,06)

272	V	b	0,00	(-17,06)
273	D	c	0,00	(-17,06)
274	V	d	0,00	(-17,06)
275	L	e	0,00	(-17,06)
276	E	f	0,00	(-17,06)
277	V	g	0,00	(-17,06)
278	F	a	0,00	(-17,06)
279	S	b	0,00	(-17,06)
280	F	c	0,00	(-17,06)
281	V	d	0,00	(-17,06)
282	Q	e	0,00	(-17,06)
283	I	f	0,00	(-17,06)
284	P	g	0,00	(-17,06)
285	L	a	0,00	(-17,06)
286	D	b	0,00	(-17,06)
287	R	c	0,00	(-17,06)
288	L	d	0,00	(-17,06)
289	L	e	0,00	(-17,06)
290	E	f	0,00	(-17,06)
291	V	g	0,00	(-17,06)
292	S	a	0,00	(-17,06)
293	G	b	0,00	(-17,06)
294	P	c	0,00	(-17,06)
295	L	d	0,00	(-17,06)
296	Q	e	0,00	(-17,06)
297	T	f	0,00	(-17,06)
298	R	g	0,00	(-17,06)
299	R	a	0,00	(-17,06)
300	Y	b	0,00	(-17,88)
301	S	c	0,00	(-17,88)
302	L	d	0,00	(-17,88)
303	A	e	0,00	(-17,96)
304	N	f	0,00	(-17,96)
305	W	g	0,00	(-20,41)
306	I	a	0,00	(-21,01)
307	P	b	0,00	(-26,16)
308	A	c	0,00	(-26,16)
309	T	d	0,00	(-26,16)
310	L	e	0,00	(-26,16)
311	P	f	0,00	(-34,28)
312	P	a	0,00	(-29,05)
313	S	b	0,00	(-20,50)
314	P	c	0,00	(-20,50)

315	L	d	0,00	(-13,28)
316	Q	a	0,00	(-12,44)
317	L	b	0,00	(-12,44)
318	C	c	0,00	(-11,40)
319	M	d	0,00	(-8,55)
320	R	e	0,00	(-8,31)
321	E	f	0,00	(-8,31)
322	V	g	0,00	(-8,31)
323	C	a	0,00	(-6,93)
324	A	b	0,00	(-5,99)
325	R	c	0,00	(-5,99)
326	R	d	0,00	(-5,94)
327	S	e	0,00	(-3,80)
328	A	f	0,00	(-3,80)
329	N	g	0,00	(-3,80)
330	L	a	0,00	(-3,80)
331	P	b	0,00	(-3,80)
332	A	c	0,00	-1,95
333	A	d	0,00	-1,95
334	T	e	0,00	-1,95
335	A	f	0,00	-1,95
336	V	g	0,00	-1,95
337	G	a	0,00	-1,95
338	A	b	0,00	-1,95
339	D	c	0,00	-1,95
340	A	d	0,00	-1,95
341	Q	e	0,00	-1,95
342	R	f	0,00	-1,95
343	V	g	0,00	-1,95
344	A	a	0,00	-1,95
345	D	b	0,00	-1,95
346	M	c	0,00	-1,95
347	L	d	0,00	-1,95
348	N	e	0,00	-1,95
349	R	f	0,00	-1,95
350	A	g	0,00	-1,95
351	A	a	0,00	-1,95
352	Q	b	0,00	-1,95
353	D	c	0,00	-1,95
354	A	d	0,00	-1,95
355	S	e	0,00	-1,95
356	R	f	0,00	-1,95
357	D	g	0,00	-1,95

358	H	a	0,00	-1,95
359	S	b	0,00	-1,95
360	D	c	0,00	-1,95
361	F	d	0,00	-1,95
362	F	e	0,00	(-0,38)
363	F	f	0,00	(-2,99)
364	G	g	0,00	(-3,21)
365	H	a	0,00	(-3,21)
366	T	b	0,00	(-3,21)
367	S	c	0,00	(-3,21)
368	H	d	0,00	(-4,83)
369	P	e	0,00	(-13,73)
370	L	f	0,00	(-14,99)
371	C	g	0,00	(-14,87)
372	C	a	0,00	(-14,87)
373	A	c	0,00	(-13,92)
374	A	d	0,00	(-13,55)
375	R	e	0,00	(-13,14)
376	S	f	0,00	(-13,14)
377	M	d	0,00	(-12,10)
378	T	e	0,00	(-11,86)
379	R	f	0,00	(-11,86)
380	S	g	0,00	(-11,86)
381	A	a	0,00	(-11,86)
382	A	b	0,00	(-11,86)
383	A	c	0,00	(-11,86)
384	A	d	0,00	(-11,86)
385	G	e	0,00	(-11,86)
386	Q	f	0,00	(-11,86)
387	R	g	0,00	(-11,86)
388	G	a	0,00	(-11,86)
389	M	b	0,00	(-11,86)
390	Y	c	0,00	(-11,86)
391	V	d	0,00	(-11,86)
392	S	e	0,00	(-11,86)
393	F	f	0,00	(-11,86)
394	S	g	0,00	(-11,86)
395	L	a	0,00	(-11,86)
396	F	b	0,00	(-11,86)
397	G	c	0,00	(-11,86)
398	N	d	0,00	(-11,86)
399	S	e	0,00	(-11,86)
400	L	f	0,00	(-11,86)

401	F	g	0,00	(-11,86)
402	A	a	0,00	(-11,86)
403	R	b	0,00	(-11,86)
404	Q	c	0,00	(-11,86)
405	L	d	0,00	(-11,86)
406	Q	e	0,00	(-11,86)
407	A	f	0,00	(-11,86)
408	G	g	0,00	(-13,74)
409	C	a	0,00	(-13,74)
410	T	b	0,00	(-13,74)
411	A	c	0,00	(-13,74)
412	L	d	0,00	(-13,74)
413	C	f	0,00	(-16,29)
414	N	g	0,00	(-16,29)
415	P	a	0,00	(-16,29)
416	A	b	0,00	(-16,29)
417	Q	c	0,00	(-16,29)
418	A	d	0,00	(-16,29)
419	K	e	0,00	(-16,29)
420	S	f	0,00	(-16,29)
421	L	g	0,00	(-16,29)
422	C	a	0,00	(-16,29)
423	S	b	0,00	(-16,29)
424	Q	c	0,00	(-16,29)
425	L	d	0,00	(-16,29)
426	F	e	0,00	(-16,29)
427	L	f	0,00	(-16,29)
428	I	b	0,00	(-16,94)
429	G	c	0,00	(-16,94)
430	C	d	0,00	(-16,94)
431	G	e	0,00	(-16,94)
432	T	f	0,00	(-16,94)
433	G	g	0,00	(-16,94)
434	I	a	0,00	(-16,94)
435	A	b	0,00	(-16,94)
436	P	c	0,00	(-16,94)
437	L	d	0,00	(-16,94)
438	I	e	0,00	(-16,94)
439	A	f	0,00	(-16,94)
440	A	g	0,00	(-16,94)
441	V	a	0,00	(-16,94)
442	T	b	0,00	(-16,94)
443	Q	c	0,00	(-16,94)

444	L	d	0,00	(-16,94)
445	M	e	0,00	(-16,94)
446	L	f	0,00	(-16,94)
447	R	g	0,00	(-16,94)
448	R	a	0,00	(-16,94)
449	A	b	0,00	(-16,94)
450	S	c	0,00	(-16,94)
451	T	d	0,00	(-16,94)
452	A	e	0,00	(-16,94)
453	A	f	0,00	(-16,94)
454	G	g	0,00	(-16,94)
455	S	a	0,00	(-16,94)
456	A	b	0,00	(-16,94)
457	P	c	0,00	(-23,86)
458	F	f	0,00	(-21,03)
459	P	g	0,00	(-17,88)
460	C	a	0,00	(-9,52)
461	W	b	0,00	(-9,52)
462	V	c	0,00	(-7,54)
463	F	d	0,00	(-7,54)
464	Y	e	0,00	(-7,25)
465	G	f	0,00	(-5,57)
466	A	g	0,00	(-5,39)
467	R	a	0,00	(-5,39)
468	T	b	0,00	(-5,32)
469	K	c	0,00	(-5,32)
470	A	d	0,00	(-5,32)
471	E	e	0,00	(-5,32)
472	L	f	0,00	(-5,32)
473	L	g	0,00	(-5,32)
474	Y	a	0,00	(-4,71)
475	D	b	0,00	(-4,71)
476	E	b	0,00	(-3,12)
477	T	c	0,00	(-3,12)
478	L	d	0,00	(-3,12)
479	Q	e	0,00	(-3,12)
480	E	f	0,00	(-3,12)
481	A	g	0,00	(-3,12)
482	L	a	0,00	(-3,12)
483	R	b	0,00	(-3,12)
484	T	e	0,00	(-1,88)
485	G	f	0,00	(-1,88)
486	A	g	0,00	(-1,66)

487	I	a	0,00	(-1,66)
488	A	b	0,00	(-1,66)
489	K	c	0,00	(-1,66)
490	Y	e	0,00	(-1,60)
491	E	f	0,00	(-0,56)
492	Y	g	0,00	(-0,56)
493	A	a	0,00	(-0,56)
494	L	b	0,00	(-0,56)
495	S	c	0,00	(-0,56)
496	R	d	0,00	-0,12
497	E	e	0,00	-1,34
498	E	f	0,00	-1,34
499	D	g	0,00	-1,36
500	N	a	0,00	-1,36
501	K	b	0,00	-1,36
502	K	c	0,00	-1,36
503	Q	d	0,00	-1,36
504	G	e	0,00	-1,36
505	R	f	0,00	-1,36
506	Y	g	0,00	-1,36
507	V	a	0,00	-1,36
508	T	b	0,00	-1,36
509	D	c	0,00	-1,36
510	L	d	0,00	-1,36
511	V	e	0,00	-1,36
512	K	f	0,00	-1,36
513	R	g	0,00	-1,36
514	N	a	0,00	-1,36
515	R	b	0,00	-1,36
516	L	c	0,00	-1,36
517	M	d	0,00	-1,36
518	V	e	0,00	-1,36
519	T	f	0,00	-1,36
520	G	g	0,00	-1,36
521	S	a	0,00	-1,36
522	L	b	0,00	-1,36
523	Q	c	0,00	-1,36
524	N	d	0,00	-1,36
525	E	e	0,00	-1,36
526	G	f	0,00	-1,36
527	Q	g	0,00	-1,36
528	L	a	0,00	-1,36
529	F	b	0,00	(-0,82)

530	V	c	0,00	(-2,02)
531	C	d	0,00	(-4,23)
532	G	e	0,00	(-5,87)
533	P	f	0,00	(-12,11)
534	A	a	0,00	(-9,93)
535	K	b	0,00	(-9,93)
536	A	c	0,00	(-9,93)
537	L	d	0,00	(-9,93)
538	L	e	0,00	(-9,93)
539	S	f	0,00	(-9,93)
540	V	g	0,00	(-9,93)
541	R	a	0,00	(-9,93)
542	Q	b	0,00	(-9,93)
543	L	c	0,00	(-9,93)
544	V	d	0,00	(-9,93)
545	K	e	0,00	(-9,93)
546	C	f	0,00	(-9,93)
547	D	g	0,00	(-9,93)
548	L	a	0,00	(-9,93)
549	L	b	0,00	(-9,93)
550	A	c	0,00	(-9,93)
551	E	d	0,00	(-9,93)
552	P	e	0,00	(-9,93)
553	D	f	0,00	(-8,00)
554	D	g	0,00	(-8,00)
555	D	a	0,00	(-7,47)
556	D	b	0,00	(-7,47)
557	S	c	0,00	(-7,47)
558	V	d	0,00	(-7,47)
559	Q	e	0,00	(-7,47)
560	E	f	0,00	(-7,47)
561	Q	g	0,00	(-7,47)
562	R	a	0,00	(-7,47)
563	L	b	0,00	(-7,47)
564	L	c	0,00	(-7,47)
565	M	d	0,00	(-7,47)
566	L	e	0,00	(-7,47)
567	E	f	0,00	(-7,47)
568	D	g	0,00	(-7,47)
569	R	a	0,00	(-7,47)
570	G	b	0,00	(-7,47)
571	R	c	0,00	(-7,47)
572	L	d	0,00	(-7,47)

573	N	e	0,00	(-7,47)
574	F	f	0,00	(-7,47)
575	D	g	0,00	(-7,47)
576	I	a	0,00	(-7,47)
577	W	b	0,00	(-7,47)
578	S	c	0,00	(-7,47)
579	T	d	0,00	(-7,47)
580	G	e	0,00	(-7,47)
581	N	f	0,00	(-7,47)
582	I	g	0,00	(-7,47)
583	F	a	0,00	(-7,47)
584	E	b	0,00	(-7,47)

Anexo 3: Regiões de baixa complexidade

low complexity regions: SEG 45 3.4 3.75

>tr|A4HYH5|A4HYH5_LEIIN Nitric oxide synthase OS=Leishmania infantum GN=NOS PE=4 SV=1

```

1-167 MRRPREPAPGECGSGCTRCVWDIYYDEVA
RFEELIAGGGIEEDCTQSSEEEVWNYIGS
VVVKYIDPPALPTTGSPGEWERAEMKARGF
FPIDRIELVSCSTSLFSPIDPGISVWNLFT
SAKGRTMLPGDVVEVLVTNSRGTQDADDVE
RLCKALRLDPYAWCELH

rspfvpednfppwlpkqpltlgqllsayv 168-302
dissssyllhqsfeslfriysdskpssas
ststtspdpekvrllleacassetgpqllr
slsksstplcypslvdvlevfsfvqipldr
llevsgplqtrrysl

303-584 ANWIPATLPPSPLQLCMREVCARRSANLPA
ATAVGADAQRVADMLNRAAQDASRDHSDF
FGHTSHPLCCAARSMTRSAAAAGQRGMYS
FSLFGNSLFARQLQAGCTALCNPAQAKSLC
SQLFLIGCGTGIAPLIAAVTQLMLRRASTA
AGSAPFPCWVFGARTKAELLYDETLQEAL
RTGAIKYEYALSREEDNKKQGRYVTDLVK
RNRLMVTGSLQNEGQLFVCGPAKALLSVRQ
LVKCDLLAEPDDDDSVQEQRLLMLEDRGRL
NFDIWS TGNIFE

```

low complexity regions: SEG 25 3.0 3.3
 >tr|A4HYH5|A4HYH5_LEIIN Nitric oxide synthase OS=Leishmania infantum GN=NOS PE=4 SV=1

```

1-208 MRRPREPAPGECGSGCTRCVWDIYYDEVA
RFEELIAGGGIEEDCTQSSEEEVVNYIGS
VVVKYIDPPALPTTGSPGEWERAEMKARGF
FPIDRIELVSCSTSLFSPDTPGISVNLFT
SAKGRTMLPGDVVEVLVTNSRGTQDADDVE
RLCKALRLDPYAWCELHRSPFVPEDNFPW
LPLQKPLTLGQLLSAYVDISSSSYLLHQ

sffeslfriysdskpssasststtsp 209-235
236-323 DPEKVRLLLEACASSETGPQLLRSLSKSSTP
LCYPSLVDVLEVF5FVQIPLDRLLEVSGPL
QTRRYSLANWIPATLPPSPLQLCMREVC

arrsanlpaatavgadaqrvadmlnraaqd 324-357
asrd
358-584 HSDFFFGHTSHPLCCAARSMTRSAAAAGQR
GMYVSFSLFGNSLFARQLQAGCTALCNPAQ
AKSLCSQLFLIGCGTGIAPLIAAVTQLMLR
RASTAAGSAPFPCWVFYGARTKAELLYDET
LQEALRTGATAKYEYALSREEDNKKQGRYV
TDLVKRNRLMVTGSLQNEGQLFVCGPAKAL
LSVRQLVKCDLLAEPDDDDSVQEQRLLMLE
DRGRLNFDIWSTGNIFE

```

Anexo 4: Resultado obtido para a pesquisa de péptidos sinal com a ferramenta SignalP 4.1

Quadro A.2 – *Score* atribuído a cada resíduo de aminoácido de *LiNOS* quanto à localização num segmento transmembranar. TM – o *score* é calculado partindo do princípio que o resíduo pertence a um segmento transmembranar; noTM – o *score* é calculado partindo do princípio que o resíduo não pertence a um segmento transmembranar; CS - *score* relativo ao hipotético local de clivagem. É elevado em resíduos imediatamente a seguir ao local de clivagem de um péptido sinal; SP – *score* que distingue resíduos de péptidos sinal e de resíduos após a hipotética clivagem ou pertencentes a proteínas que não contêm péptidos sinal. É mais elevado para resíduos pertencentes ao péptido sinal

# pos	aa	SignalP-noTM		SignalP-TM		TM
		CS	SP	CS	SP	
1	M	0,1	0,224	0,1	0,19	0,1
2	R	0,1	0,234	0,1	0,19	0,1
3	R	0,11	0,159	0,1	0,18	0,1
4	P	0,11	0,172	0,1	0,16	0,1
5	R	0,1	0,166	0,1	0,14	0,11
6	E	0,11	0,155	0,1	0,13	0,11

7	P	0,1	0,12	0,1	0,11	0,12
8	A	0,1	0,112	0,1	0,1	0,13
9	P	0,1	0,128	0,1	0,11	0,13
10	G	0,11	0,117	0,1	0,12	0,12
11	E	0,1	0,106	0,1	0,1	0,14
12	C	0,11	0,104	0,11	0,1	0,14
13	C	0,1	0,115	0,1	0,11	0,13
14	G	0,1	0,095	0,1	0,1	0,12
15	S	0,1	0,099	0,1	0,11	0,1
16	G	0,11	0,101	0,1	0,09	0,1

17	C	0,1	0,101	0,1	0,1	0,1
18	T	0,1	0,092	0,1	0,1	0,1
19	R	0,1	0,095	0,1	0,1	0,1
20	C	0,1	0,093	0,1	0,1	0,1
21	V	0,11	0,093	0,11	0,11	0,1
22	W	0,1	0,095	0,1	0,13	0,11
23	D	0,1	0,097	0,11	0,11	0,11
24	I	0,1	0,091	0,11	0,1	0,1
25	Y	0,1	0,101	0,1	0,11	0,1
26	Y	0,1	0,106	0,1	0,12	0,09
27	D	0,1	0,107	0,1	0,12	0,1
28	E	0,1	0,107	0,1	0,12	0,1
29	V	0,11	0,11	0,11	0,12	0,1
30	A	0,1	0,102	0,1	0,12	0,1
31	R	0,09	0,114	0,1	0,12	0,09
32	F	0,12	0,102	0,12	0,11	0,1
33	E	0,17	0,1	0,16	0,09	0,1
34	E	0,1	0,099	0,1	0,11	0,1
35	L	0,1	0,097	0,1	0,12	0,1
36	I	0,1	0,091	0,1	0,14	0,09
37	A	0,1	0,104	0,1	0,14	0,09
38	G	0,11	0,11	0,11	0,13	0,1
39	G	0,11	0,108	0,11	0,12	0,1
40	G	0,1	0,102	0,1	0,09	0,1
41	I	0,1	0,097	0,1	0,1	0,1
42	E	0,1	0,097	0,1	0,1	0,1
43	E	0,1	0,103	0,1	0,1	0,1
44	D	0,1	0,109	0,1	0,11	0,1
45	C	0,1	0,11	0,1	0,12	0,1
46	T	0,11	0,111	0,1	0,12	0,1
47	Q	0,1	0,109	0,11	0,11	0,1
48	S	0,1	0,126	0,11	0,12	0,1
49	S	0,12	0,116	0,14	0,11	0,1
50	E	0,09	0,115	0,1	0,11	0,1
51	E	0,1	0,109	0,1	0,12	0,1
52	E	0,11	0,112	0,12	0,11	0,1
53	E	0,1	0,109	0,1	0,11	0,11
54	V	0,1	0,102	0,1	0,1	0,11
55	V	0,1	0,099	0,1	0,11	0,11
56	N	0,1	0,094	0,1	0,1	0,11
57	Y	0,1	0,094	0,1	0,1	0,1
58	I	0,1	0,096	0,1	0,1	0,1
59	G	0,11	0,096	0,11	0,09	0,1

60	S	0,1	0,091	0,1	0,09	0,1
61	V	0,1	0,097	0,1	0,1	0,1
62	V	0,1	0,094	0,1	0,1	0,11
63	V	0,1	0,094	0,1	0,1	0,11
64	K	0,1	0,096	0,1	0,1	0,1
65	Y	0,1	0,099	0,1	0,1	0,1
66	I	0,1	0,099	0,1	0,1	0,1
67	D	0,1	0,102	0,1	0,1	0,1
68	P	0,1	0,101	0,1	0,11	0,1
69	P	0,1	0,106	0,1	0,11	0,1
70	A	0,11	0,118	0,11	0,14	0,1
71	L	0,1	0,118	0,1	0,13	0,11
72	P	0,11	0,112	0,1	0,13	0,1
73	T	0,13	0,115	0,14	0,13	0,1
74	T	0,11	0,124	0,11	0,17	0,1
75	G	0,1	0,133	0,1	0,19	0,1
76	S	0,11	0,125	0,11	0,14	0,1
77	P	0,1	0,132	0,1	0,13	0,1
78	G	0,12	0,128	0,12	0,13	0,11
79	E	0,11	0,114	0,11	0,11	0,11
80	W	0,1	0,135	0,1	0,13	0,1
81	E	0,1	0,135	0,1	0,13	0,1
82	R	0,1	0,134	0,1	0,13	0,1
83	A	0,1	0,13	0,1	0,12	0,1
84	E	0,09	0,123	0,1	0,12	0,1
85	M	0,1	0,13	0,11	0,12	0,1
86	K	0,11	0,122	0,11	0,12	0,1
87	A	0,1	0,114	0,1	0,12	0,1
88	R	0,1	0,113	0,1	0,12	0,1
89	G	0,11	0,106	0,11	0,11	0,11
90	F	0,1	0,111	0,1	0,12	0,11
91	F	0,11	0,109	0,11	0,12	0,11
92	P	0,11	0,118	0,1	0,11	0,1
93	I	0,11	0,126	0,1	0,12	0,1
94	D	0,11	0,12	0,1	0,12	0,1
95	R	0,1	0,111	0,1	0,12	0,11
96	I	0,11	0,11	0,11	0,13	0,12
97	E	0,1	0,11	0,1	0,13	0,13
98	L	0,1	0,107	0,1	0,13	0,12
99	V	0,1	0,11	0,1	0,14	0,13
100	S	0,1	0,121	0,1	0,18	0,14
101	C	0,1	0,135	0,1	0,21	0,15
102	S	0,13	0,135	0,14	0,21	0,14

103	T	0,1	0,135	0,1	0,22	0,14
104	S	0,1	0,123	0,11	0,2	0,13
105	L	0,1	0,119	0,1	0,19	0,14
106	F	0,1	0,119	0,1	0,18	0,16
107	S	0,11	0,103	0,1	0,15	0,13
108	P	0,1	0,101	0,1	0,16	0,13
109	T	0,1	0,096	0,1	0,13	0,12
110	D	0,11	0,096	0,11	0,13	0,11
111	P	0,1	0,111	0,1	0,15	0,12
112	G	0,11	0,103	0,14	0,14	0,13
113	I	0,11	0,094	0,11	0,15	0,14
114	S	0,1	0,099	0,1	0,15	0,14
115	V	0,12	0,104	0,12	0,13	0,14
116	V	0,1	0,108	0,11	0,14	0,13
117	N	0,1	0,097	0,1	0,13	0,12
118	L	0,1	0,099	0,1	0,13	0,12
119	F	0,1	0,1	0,1	0,13	0,13
120	T	0,1	0,103	0,1	0,15	0,13
121	S	0,11	0,106	0,11	0,16	0,13
122	A	0,1	0,117	0,1	0,18	0,13
123	K	0,1	0,107	0,1	0,15	0,11
124	G	0,1	0,115	0,1	0,17	0,12
125	R	0,19	0,1	0,19	0,13	0,11
126	T	0,1	0,103	0,1	0,15	0,12
127	M	0,13	0,1	0,13	0,13	0,11
128	L	0,1	0,101	0,1	0,12	0,1
129	P	0,1	0,104	0,1	0,12	0,1
130	G	0,1	0,114	0,11	0,11	0,1
131	D	0,11	0,114	0,11	0,11	0,1
132	V	0,1	0,121	0,1	0,13	0,1
133	V	0,1	0,142	0,1	0,13	0,1
134	E	0,1	0,124	0,1	0,12	0,1
135	V	0,1	0,126	0,1	0,11	0,1
136	L	0,1	0,12	0,1	0,12	0,1
137	V	0,11	0,133	0,11	0,17	0,1
138	T	0,1	0,116	0,1	0,14	0,09
139	N	0,11	0,118	0,11	0,14	0,09
140	S	0,1	0,125	0,1	0,17	0,09
141	R	0,1	0,113	0,1	0,15	0,08
142	G	0,11	0,127	0,11	0,22	0,08
143	T	0,18	0,107	0,17	0,13	0,09
144	Q	0,1	0,115	0,1	0,14	0,08
145	D	0,11	0,148	0,1	0,16	0,08

146	A	0,12	0,12	0,12	0,13	0,09
147	D	0,11	0,107	0,11	0,11	0,09
148	D	0,1	0,115	0,1	0,12	0,1
149	V	0,1	0,11	0,11	0,11	0,1
150	E	0,1	0,108	0,1	0,12	0,1
151	R	0,1	0,112	0,1	0,11	0,1
152	L	0,1	0,108	0,1	0,11	0,1
153	C	0,1	0,102	0,1	0,11	0,1
154	K	0,11	0,104	0,11	0,1	0,1
155	A	0,1	0,096	0,1	0,1	0,1
156	L	0,1	0,097	0,1	0,1	0,1
157	R	0,11	0,094	0,11	0,1	0,1
158	L	0,1	0,093	0,1	0,09	0,09
159	D	0,1	0,09	0,1	0,09	0,09
160	P	0,1	0,092	0,1	0,09	0,1
161	Y	0,11	0,084	0,1	0,1	0,09
162	A	0,1	0,09	0,1	0,11	0,1
163	W	0,09	0,102	0,1	0,11	0,1
164	C	0,1	0,104	0,1	0,11	0,1
165	E	0,12	0,093	0,13	0,1	0,1
166	L	0,1	0,099	0,1	0,11	0,09
167	H	0,1	0,092	0,1	0,11	0,09
168	R	0,1	0,109	0,1	0,11	0,1
169	S	0,1	0,11	0,1	0,12	0,09
170	P	0,1	0,103	0,1	0,12	0,1
171	F	0,1	0,107	0,1	0,12	0,1
172	V	0,1	0,109	0,1	0,13	0,1
173	P	0,09	0,123	0,1	0,15	0,1
174	E	0,11	0,138	0,1	0,14	0,1
175	D	0,11	0,119	0,11	0,13	0,1
176	N	0,1	0,118	0,1	0,12	0,1
177	F	0,1	0,11	0,1	0,12	0,11
178	P	0,1	0,102	0,1	0,12	0,11
179	P	0,11	0,108	0,11	0,11	0,11
180	W	0,1	0,106	0,1	0,12	0,13
181	L	0,1	0,109	0,1	0,12	0,13
182	P	0,1	0,112	0,1	0,13	0,14
183	L	0,1	0,112	0,1	0,15	0,14
184	Q	0,11	0,108	0,1	0,14	0,13
185	K	0,1	0,102	0,1	0,14	0,15
186	P	0,1	0,102	0,1	0,17	0,19
187	L	0,11	0,107	0,1	0,17	0,24
188	T	0,1	0,103	0,1	0,17	0,26

189	L	0,11	0,107	0,1	0,15	0,28
190	G	0,11	0,112	0,1	0,18	0,28
191	Q	0,12	0,1	0,12	0,17	0,25
192	L	0,1	0,102	0,1	0,2	0,31
193	L	0,1	0,108	0,1	0,21	0,28
194	S	0,1	0,109	0,1	0,24	0,29
195	A	0,11	0,109	0,11	0,26	0,3
196	Y	0,12	0,096	0,13	0,2	0,28
197	V	0,1	0,113	0,1	0,21	0,25
198	D	0,1	0,105	0,1	0,21	0,23
199	I	0,1	0,128	0,1	0,26	0,26
200	S	0,1	0,109	0,1	0,22	0,22
201	S	0,1	0,134	0,1	0,26	0,19
202	S	0,11	0,137	0,11	0,28	0,18
203	S	0,18	0,1	0,18	0,19	0,17
204	Y	0,11	0,102	0,11	0,18	0,19
205	L	0,1	0,101	0,1	0,17	0,18
206	L	0,11	0,101	0,1	0,14	0,16
207	H	0,1	0,106	0,1	0,14	0,15
208	Q	0,1	0,11	0,1	0,12	0,12
209	S	0,11	0,106	0,11	0,11	0,13
210	F	0,1	0,104	0,1	0,1	0,14
211	F	0,1	0,104	0,1	0,09	0,16
212	E	0,11	0,093	0,1	0,1	0,13
213	S	0,1	0,098	0,1	0,09	0,13
214	L	0,1	0,102	0,1	0,09	0,14
215	F	0,1	0,105	0,1	0,09	0,13
216	R	0,1	0,099	0,1	0,09	0,11
217	I	0,11	0,097	0,11	0,1	0,11
218	Y	0,1	0,097	0,1	0,09	0,1
219	S	0,1	0,13	0,1	0,14	0,09
220	D	0,1	0,118	0,11	0,15	0,08
221	S	0,1	0,119	0,1	0,14	0,09
222	K	0,17	0,105	0,16	0,11	0,09
223	P	0,1	0,121	0,1	0,14	0,09
224	S	0,1	0,12	0,1	0,14	0,09
225	S	0,1	0,129	0,1	0,14	0,09
226	A	0,1	0,124	0,1	0,14	0,09
227	S	0,14	0,13	0,15	0,13	0,09
228	S	0,1	0,123	0,1	0,12	0,1
229	T	0,1	0,111	0,11	0,11	0,1
230	S	0,1	0,11	0,1	0,11	0,1
231	T	0,1	0,111	0,1	0,11	0,1

232	T	0,1	0,103	0,1	0,1	0,1
233	P	0,1	0,103	0,1	0,1	0,1
234	S	0,1	0,106	0,1	0,11	0,1
235	P	0,1	0,103	0,1	0,1	0,1
236	D	0,1	0,103	0,1	0,1	0,11
237	P	0,1	0,101	0,1	0,1	0,11
238	E	0,1	0,103	0,1	0,11	0,11
239	K	0,1	0,099	0,1	0,1	0,11
240	V	0,1	0,101	0,1	0,1	0,11
241	R	0,1	0,105	0,1	0,1	0,11
242	L	0,11	0,104	0,11	0,1	0,11
243	L	0,1	0,096	0,1	0,1	0,11
244	E	0,11	0,093	0,11	0,1	0,11
245	A	0,11	0,087	0,11	0,09	0,1
246	C	0,1	0,092	0,1	0,1	0,1
247	A	0,11	0,084	0,11	0,09	0,1
248	S	0,1	0,087	0,1	0,1	0,09
249	S	0,1	0,085	0,1	0,09	0,09
250	E	0,1	0,085	0,1	0,09	0,09
251	T	0,1	0,086	0,1	0,1	0,09
252	G	0,1	0,086	0,1	0,1	0,09
253	P	0,09	0,09	0,1	0,1	0,09
254	Q	0,11	0,093	0,11	0,1	0,1
255	L	0,11	0,099	0,1	0,11	0,1
256	L	0,1	0,104	0,1	0,1	0,1
257	R	0,1	0,102	0,1	0,11	0,1
258	S	0,11	0,1	0,1	0,11	0,11
259	L	0,11	0,101	0,11	0,11	0,11
260	S	0,11	0,103	0,11	0,11	0,11
261	K	0,1	0,093	0,1	0,11	0,11
262	S	0,1	0,093	0,1	0,1	0,12
263	S	0,1	0,092	0,1	0,11	0,13
264	T	0,1	0,089	0,1	0,11	0,14
265	P	0,1	0,092	0,1	0,13	0,15
266	L	0,1	0,089	0,1	0,15	0,16
267	C	0,1	0,09	0,1	0,19	0,21
268	Y	0,1	0,088	0,1	0,19	0,22
269	P	0,1	0,089	0,1	0,19	0,2
270	S	0,11	0,087	0,11	0,17	0,19
271	L	0,1	0,095	0,1	0,19	0,21
272	V	0,1	0,096	0,1	0,22	0,24
273	D	0,1	0,105	0,1	0,2	0,2
274	V	0,11	0,117	0,1	0,22	0,23

275	L	0,13	0,086	0,12	0,18	0,19
276	E	0,11	0,091	0,11	0,17	0,2
277	V	0,1	0,111	0,1	0,22	0,24
278	F	0,1	0,096	0,1	0,19	0,24
279	S	0,11	0,108	0,1	0,19	0,25
280	F	0,1	0,105	0,1	0,16	0,25
281	V	0,1	0,116	0,1	0,16	0,24
282	Q	0,1	0,1	0,1	0,15	0,17
283	I	0,1	0,094	0,1	0,12	0,17
284	P	0,1	0,102	0,1	0,12	0,14
285	L	0,1	0,128	0,1	0,13	0,15
286	D	0,1	0,123	0,1	0,12	0,13
287	R	0,1	0,12	0,1	0,11	0,12
288	L	0,1	0,118	0,1	0,12	0,14
289	L	0,11	0,112	0,1	0,11	0,13
290	E	0,1	0,116	0,1	0,12	0,12
291	V	0,1	0,113	0,1	0,12	0,12
292	S	0,1	0,111	0,1	0,12	0,12
293	G	0,11	0,108	0,1	0,13	0,12
294	P	0,1	0,097	0,1	0,13	0,11
295	L	0,11	0,095	0,11	0,12	0,12
296	Q	0,1	0,1	0,1	0,13	0,11
297	T	0,1	0,107	0,1	0,13	0,1
298	R	0,1	0,106	0,1	0,12	0,09
299	R	0,1	0,123	0,1	0,12	0,1
300	Y	0,1	0,107	0,1	0,12	0,11
301	S	0,1	0,1	0,1	0,12	0,11
302	L	0,1	0,106	0,1	0,13	0,11
303	A	0,1	0,107	0,1	0,13	0,11
304	N	0,14	0,093	0,11	0,1	0,11
305	W	0,1	0,096	0,1	0,12	0,12
306	I	0,1	0,097	0,1	0,11	0,13
307	P	0,11	0,099	0,11	0,12	0,13
308	A	0,11	0,097	0,11	0,12	0,13
309	T	0,09	0,095	0,1	0,12	0,13
310	L	0,1	0,106	0,1	0,11	0,11
311	P	0,1	0,112	0,1	0,12	0,11
312	P	0,11	0,103	0,1	0,12	0,11
313	S	0,1	0,109	0,1	0,12	0,11
314	P	0,1	0,123	0,1	0,12	0,11
315	L	0,11	0,163	0,11	0,14	0,11
316	Q	0,11	0,129	0,1	0,13	0,11
317	L	0,1	0,119	0,1	0,12	0,13

318	C	0,1	0,141	0,1	0,13	0,13
319	M	0,1	0,123	0,1	0,12	0,13
320	R	0,1	0,111	0,1	0,11	0,11
321	E	0,12	0,102	0,12	0,1	0,1
322	V	0,1	0,104	0,1	0,1	0,11
323	C	0,1	0,118	0,1	0,1	0,11
324	A	0,1	0,148	0,1	0,12	0,11
325	R	0,11	0,122	0,11	0,1	0,11
326	R	0,1	0,109	0,1	0,1	0,11
327	S	0,1	0,113	0,1	0,11	0,11
328	A	0,11	0,108	0,1	0,1	0,11
329	N	0,1	0,097	0,1	0,1	0,11
330	L	0,1	0,107	0,1	0,1	0,11
331	P	0,1	0,105	0,1	0,11	0,11
332	A	0,11	0,104	0,11	0,11	0,11
333	A	0,1	0,103	0,1	0,11	0,11
334	T	0,1	0,106	0,1	0,1	0,11
335	A	0,11	0,102	0,11	0,1	0,1
336	V	0,1	0,095	0,1	0,1	0,11
337	G	0,11	0,106	0,1	0,1	0,11
338	A	0,1	0,1	0,1	0,09	0,1
339	D	0,1	0,095	0,1	0,09	0,1
340	A	0,11	0,09	0,11	0,09	0,11
341	Q	0,12	0,105	0,12	0,09	0,11
342	R	0,1	0,11	0,1	0,1	0,1
343	V	0,11	0,113	0,11	0,1	0,12
344	A	0,1	0,112	0,1	0,11	0,12
345	D	0,1	0,113	0,1	0,1	0,14
346	M	0,1	0,117	0,1	0,1	0,14
347	L	0,11	0,115	0,11	0,11	0,14
348	N	0,11	0,123	0,11	0,11	0,11
349	R	0,1	0,115	0,1	0,11	0,1
350	A	0,11	0,118	0,11	0,11	0,1
351	A	0,1	0,114	0,1	0,12	0,1
352	Q	0,1	0,13	0,1	0,12	0,1
353	D	0,11	0,122	0,1	0,13	0,1
354	A	0,1	0,112	0,1	0,12	0,1
355	S	0,1	0,115	0,1	0,11	0,1
356	R	0,1	0,113	0,1	0,12	0,1
357	D	0,1	0,103	0,1	0,11	0,1
358	H	0,1	0,095	0,1	0,11	0,1
359	S	0,1	0,102	0,1	0,11	0,1
360	D	0,1	0,1	0,1	0,11	0,1

361	F	0,1	0,095	0,1	0,1	0,1
362	F	0,1	0,096	0,1	0,11	0,11
363	F	0,1	0,103	0,1	0,11	0,12
364	G	0,11	0,105	0,11	0,1	0,12
365	H	0,1	0,1	0,1	0,1	0,11
366	T	0,11	0,093	0,11	0,09	0,11
367	S	0,1	0,096	0,1	0,09	0,11
368	H	0,1	0,098	0,1	0,09	0,11
369	P	0,1	0,094	0,1	0,09	0,11
370	L	0,1	0,093	0,1	0,09	0,12
371	C	0,1	0,09	0,1	0,09	0,11
372	C	0,1	0,088	0,11	0,09	0,11
373	A	0,11	0,096	0,11	0,09	0,12
374	A	0,11	0,093	0,11	0,11	0,12
375	R	0,1	0,093	0,1	0,1	0,11
376	S	0,1	0,098	0,1	0,11	0,12
377	M	0,09	0,098	0,1	0,11	0,12
378	T	0,1	0,114	0,1	0,14	0,13
379	R	0,1	0,13	0,1	0,13	0,12
380	S	0,11	0,156	0,1	0,17	0,15
381	A	0,11	0,219	0,11	0,18	0,15
382	A	0,1	0,246	0,1	0,19	0,14
383	A	0,11	0,186	0,11	0,18	0,15
384	A	0,13	0,119	0,12	0,14	0,14
385	G	0,11	0,119	0,1	0,13	0,14
386	Q	0,11	0,112	0,11	0,11	0,13
387	R	0,11	0,113	0,1	0,11	0,13
388	G	0,11	0,114	0,11	0,12	0,16
389	M	0,1	0,126	0,1	0,12	0,15
390	Y	0,1	0,133	0,1	0,13	0,16
391	V	0,1	0,132	0,1	0,12	0,17
392	S	0,1	0,127	0,1	0,12	0,21
393	F	0,1	0,154	0,1	0,15	0,2
394	S	0,1	0,154	0,1	0,17	0,2
395	L	0,1	0,149	0,1	0,16	0,28
396	F	0,1	0,159	0,11	0,16	0,26
397	G	0,1	0,238	0,1	0,22	0,23
398	N	0,1	0,201	0,1	0,18	0,2
399	S	0,11	0,241	0,11	0,2	0,2
400	L	0,11	0,223	0,1	0,17	0,19
401	F	0,11	0,247	0,11	0,19	0,2
402	A	0,1	0,253	0,1	0,19	0,18
403	R	0,1	0,176	0,1	0,17	0,15

404	Q	0,11	0,213	0,11	0,17	0,16
405	L	0,11	0,197	0,1	0,16	0,16
406	Q	0,1	0,196	0,1	0,17	0,16
407	A	0,1	0,194	0,1	0,18	0,16
408	G	0,13	0,12	0,12	0,14	0,15
409	C	0,1	0,143	0,1	0,15	0,14
410	T	0,1	0,122	0,1	0,14	0,13
411	A	0,11	0,114	0,11	0,14	0,13
412	L	0,11	0,111	0,11	0,13	0,12
413	C	0,1	0,111	0,1	0,13	0,12
414	N	0,1	0,103	0,1	0,1	0,11
415	P	0,1	0,149	0,1	0,13	0,12
416	A	0,1	0,142	0,11	0,15	0,13
417	Q	0,1	0,148	0,1	0,14	0,13
418	A	0,11	0,161	0,11	0,17	0,16
419	K	0,13	0,115	0,12	0,13	0,13
420	S	0,1	0,134	0,1	0,13	0,18
421	L	0,13	0,131	0,12	0,14	0,24
422	C	0,1	0,137	0,1	0,14	0,28
423	S	0,11	0,124	0,11	0,13	0,29
424	Q	0,1	0,123	0,1	0,1	0,36
425	L	0,1	0,134	0,1	0,1	0,49
426	F	0,1	0,146	0,1	0,09	0,58
427	L	0,1	0,179	0,1	0,08	0,77
428	I	0,1	0,149	0,1	0,06	0,81
429	G	0,1	0,165	0,1	0,07	0,77
430	C	0,1	0,18	0,1	0,08	0,78
431	G	0,1	0,201	0,1	0,09	0,77
432	T	0,1	0,188	0,1	0,09	0,73
433	G	0,1	0,205	0,1	0,08	0,82
434	I	0,11	0,189	0,11	0,06	0,85
435	A	0,1	0,197	0,1	0,09	0,8
436	P	0,09	0,157	0,1	0,11	0,75
437	L	0,11	0,169	0,1	0,08	0,83
438	I	0,1	0,148	0,1	0,1	0,76
439	A	0,11	0,193	0,11	0,11	0,71
440	A	0,12	0,14	0,11	0,14	0,51
441	V	0,12	0,126	0,1	0,09	0,52
442	T	0,1	0,143	0,1	0,09	0,49
443	Q	0,11	0,139	0,11	0,08	0,43
444	L	0,1	0,143	0,1	0,09	0,41
445	M	0,1	0,158	0,1	0,11	0,25
446	L	0,1	0,221	0,1	0,13	0,2

447	R	0,1	0,298	0,1	0,13	0,18
448	R	0,11	0,32	0,1	0,13	0,17
449	A	0,11	0,523	0,11	0,17	0,22
450	S	0,1	0,36	0,1	0,14	0,19
451	T	0,1	0,484	0,1	0,24	0,19
452	A	0,12	0,362	0,12	0,23	0,19
453	A	0,13	0,206	0,11	0,16	0,18
454	G	0,11	0,15	0,1	0,11	0,22
455	S	0,11	0,106	0,1	0,11	0,23
456	A	0,11	0,104	0,1	0,1	0,2
457	P	0,1	0,098	0,1	0,1	0,18
458	F	0,11	0,088	0,1	0,08	0,2
459	P	0,1	0,094	0,1	0,09	0,21
460	C	0,11	0,097	0,11	0,07	0,21
461	W	0,1	0,096	0,1	0,07	0,27
462	V	0,1	0,116	0,1	0,06	0,35
463	F	0,1	0,101	0,1	0,06	0,37
464	Y	0,11	0,127	0,11	0,09	0,23
465	G	0,1	0,115	0,1	0,09	0,2
466	A	0,1	0,109	0,1	0,1	0,15
467	R	0,1	0,13	0,1	0,1	0,13
468	T	0,11	0,111	0,1	0,1	0,12
469	K	0,11	0,1	0,11	0,1	0,11
470	A	0,11	0,113	0,1	0,09	0,11
471	E	0,11	0,108	0,1	0,1	0,11
472	L	0,1	0,109	0,1	0,09	0,11
473	L	0,11	0,107	0,1	0,1	0,12
474	Y	0,11	0,099	0,1	0,1	0,11
475	D	0,11	0,099	0,1	0,09	0,11
476	E	0,1	0,097	0,1	0,09	0,11
477	T	0,11	0,096	0,1	0,08	0,12
478	L	0,1	0,092	0,1	0,08	0,12
479	Q	0,1	0,087	0,1	0,08	0,11
480	E	0,1	0,093	0,1	0,09	0,11
481	A	0,11	0,09	0,1	0,08	0,11
482	L	0,09	0,093	0,09	0,09	0,11
483	R	0,1	0,093	0,1	0,09	0,11
484	T	0,1	0,086	0,1	0,09	0,11
485	G	0,11	0,087	0,1	0,09	0,11
486	A	0,1	0,09	0,1	0,09	0,11
487	I	0,1	0,084	0,1	0,09	0,11
488	A	0,1	0,095	0,1	0,09	0,11
489	K	0,09	0,096	0,1	0,09	0,11

490	Y	0,1	0,097	0,1	0,1	0,11
491	E	0,1	0,096	0,1	0,09	0,13
492	Y	0,11	0,092	0,11	0,09	0,13
493	A	0,1	0,098	0,1	0,09	0,13
494	L	0,1	0,11	0,1	0,1	0,13
495	S	0,11	0,117	0,1	0,11	0,12
496	R	0,11	0,119	0,1	0,11	0,11
497	E	0,11	0,112	0,11	0,11	0,1
498	E	0,1	0,12	0,1	0,11	0,11
499	D	0,1	0,114	0,1	0,11	0,11
500	N	0,1	0,108	0,1	0,1	0,1
501	K	0,1	0,111	0,1	0,11	0,11
502	K	0,11	0,112	0,1	0,11	0,1
503	Q	0,1	0,102	0,1	0,11	0,1
504	G	0,1	0,107	0,1	0,11	0,1
505	R	0,1	0,104	0,1	0,11	0,11
506	Y	0,11	0,105	0,1	0,11	0,1
507	V	0,1	0,106	0,1	0,11	0,11
508	T	0,1	0,106	0,1	0,1	0,1
509	D	0,1	0,103	0,1	0,1	0,11
510	L	0,1	0,105	0,1	0,1	0,11
511	V	0,11	0,1	0,11	0,11	0,11
512	K	0,11	0,098	0,11	0,1	0,1
513	R	0,1	0,094	0,1	0,1	0,1
514	N	0,11	0,092	0,11	0,09	0,1
515	R	0,11	0,085	0,11	0,09	0,11
516	L	0,11	0,082	0,11	0,08	0,11
517	M	0,1	0,083	0,1	0,08	0,11
518	V	0,1	0,085	0,1	0,08	0,11
519	T	0,1	0,088	0,1	0,08	0,12
520	G	0,1	0,086	0,1	0,09	0,12
521	S	0,1	0,087	0,1	0,09	0,13
522	L	0,1	0,09	0,1	0,09	0,13
523	Q	0,1	0,095	0,1	0,09	0,13
524	N	0,1	0,085	0,1	0,09	0,13
525	E	0,1	0,09	0,1	0,08	0,15
526	G	0,1	0,094	0,1	0,08	0,15
527	Q	0,1	0,093	0,1	0,08	0,14
528	L	0,11	0,089	0,11	0,08	0,16
529	F	0,1	0,084	0,1	0,08	0,17
530	V	0,1	0,083	0,1	0,08	0,17
531	C	0,1	0,088	0,1	0,09	0,15
532	G	0,1	0,093	0,1	0,09	0,16

533	P	0,1	0,088	0,1	0,1	0,14
534	A	0,11	0,086	0,11	0,1	0,13
535	K	0,1	0,093	0,1	0,11	0,12
536	A	0,1	0,11	0,1	0,11	0,13
537	L	0,09	0,115	0,1	0,09	0,12
538	L	0,1	0,103	0,11	0,1	0,12
539	S	0,1	0,118	0,1	0,09	0,11
540	V	0,1	0,099	0,1	0,09	0,11
541	R	0,11	0,105	0,1	0,08	0,11
542	Q	0,11	0,111	0,11	0,08	0,12
543	L	0,1	0,111	0,1	0,08	0,13
544	V	0,1	0,103	0,1	0,08	0,13
545	K	0,1	0,114	0,1	0,08	0,12
546	C	0,1	0,145	0,1	0,1	0,12
547	D	0,11	0,108	0,11	0,09	0,12
548	L	0,1	0,119	0,1	0,1	0,13
549	L	0,11	0,105	0,1	0,09	0,12
550	A	0,1	0,095	0,1	0,1	0,1
551	E	0,1	0,09	0,1	0,1	0,1
552	P	0,1	0,099	0,1	0,1	0,09
553	D	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
554	D	0,1	0,118	0,1	0,11	0,1
555	D	0,11	0,111	0,1	0,11	0,1
556	D	0,1	0,109	0,1	0,11	0,11
557	S	0,1	0,106	0,1	0,11	0,1
558	V	0,1	0,104	0,1	0,11	0,11

559	Q	0,1	0,109	0,1	0,11	0,11
560	E	0,1	0,113	0,1	0,11	0,11
561	Q	0,1	0,107	0,1	0,11	0,1
562	R	0,1	0,106	0,1	0,11	0,12
563	L	0,1	0,101	0,1	0,11	0,12
564	L	0,1	0,105	0,1	0,11	0,13
565	M	0,1	0,106	0,1	0,11	0,12
566	L	0,11	0,106	0,11	0,11	0,11
567	E	0,11	0,099	0,11	0,11	0,11
568	D	0,11	0,094	0,11	0,1	0,11
569	R	0,11	0,085	0,11	0,09	0,1
570	G	0,11	0,097	0,1	0,09	0,1
571	R	0,1	0,097	0,1	0,1	0,1
572	L	0,1	0,096	0,1	0,1	0,1
573	N	0,1	0,098	0,1	0,1	0,1
574	F	0,1	0,097	0,1	0,09	0,1
575	D	0,1	0,101	0,1	0,09	0,1
576	I	0,1	0,096	0,1	0,1	0,11
577	W	0,11	0,099	0,11	0,1	0,11
578	S	0,1	0,095	0,1	0,1	0,1
579	T	0,09	0,095	0,1	0,1	0,1
580	G	0,1	0,095	0,1	0,1	0,11
581	N	0,09	0,1	0,1	0,1	0,11
582	I	0,1	0,097	0,1	0,1	0,11
583	F	0,1	0,1	0,1	0,1	0,11
584	E	0,11	0,101	0,1	0,1	0,1

Anexo 5: Cálculo da probabilidade de desordem com a ferramenta RONN

Quadro A.3 – Valores de probabilidade atribuídos a cada resíduo de aminoácido de LINOS de estar localizado numa região desordenada da estrutura da proteína. Os valores a vermelho indicam que o resíduo correspondente pertence, mais provavelmente, a uma região desordenada. Os valores a verde indicam que o resíduo correspondente foi considerado pelo algoritmo como pertencendo a uma região desordenada.

1.	M	0,636101
2.	R	0,640357
3.	R	0,639492
4.	P	0,598152
5.	R	0,575394
6.	E	0,548465
7.	P	0,522268

8.	A	0,498428
9.	P	0,471223
10.	G	0,443776
11.	E	0,421277
12.	C	0,405809
13.	C	0,39722
14.	G	0,388176

15.	S	0,384038
16.	G	0,387124
17.	C	0,382906
18.	T	0,381422
19.	R	0,370614
20.	C	0,343683
21.	V	0,322397

22.	W	0,306571
23.	D	0,29973
24.	I	0,28544
25.	Y	0,276159
26.	Y	0,271204
27.	D	0,271541
28.	E	0,277434
29.	V	0,290923
30.	A	0,299873
31.	R	0,309785
32.	F	0,31811
33.	E	0,330235
34.	E	0,348202
35.	L	0,363029
36.	I	0,383434
37.	A	0,405205
38.	G	0,437638
39.	G	0,464944
40.	G	0,483331
41.	I	0,50195
42.	E	0,520837
43.	E	0,546707
44.	D	0,560245
45.	C	0,573829
46.	T	0,593444
47.	Q	0,603399
48.	S	0,59316
49.	S	0,587948
50.	E	0,58593
51.	E	0,58
52.	E	0,56761
53.	E	0,548514
54.	V	0,533439
55.	V	0,511956
56.	N	0,481478
57.	Y	0,459254
58.	I	0,447261
59.	G	0,438635
60.	S	0,423386
61.	V	0,407379
62.	V	0,386378
63.	V	0,376096
64.	K	0,366998

65.	Y	0,352946
66.	I	0,350265
67.	D	0,365138
68.	P	0,384334
69.	P	0,395149
70.	A	0,406802
71.	L	0,421619
72.	P	0,426712
73.	T	0,426605
74.	T	0,428971
75.	G	0,439836
76.	S	0,435778
77.	P	0,433523
78.	G	0,423647
79.	E	0,419544
80.	W	0,41094
81.	E	0,408446
82.	R	0,406759
83.	A	0,406444
84.	E	0,403488
85.	M	0,398388
86.	K	0,388437
87.	A	0,373103
88.	R	0,363125
89.	G	0,357356
90.	F	0,354745
91.	F	0,354305
92.	P	0,359641
93.	I	0,365777
94.	D	0,362417
95.	R	0,368466
96.	I	0,372013
97.	E	0,377818
98.	L	0,382274
99.	V	0,387875
100.	S	0,400918
101.	C	0,40107
102.	S	0,400033
103.	T	0,398641
104.	S	0,395835
105.	L	0,39345
106.	F	0,396097
107.	S	0,391487

108.	P	0,387787
109.	T	0,383796
110.	D	0,378522
111.	P	0,372576
112.	G	0,371408
113.	I	0,374178
114.	S	0,375291
115.	V	0,370002
116.	V	0,366426
117.	N	0,362688
118.	L	0,35561
119.	F	0,349443
120.	T	0,357683
121.	S	0,369311
122.	A	0,378772
123.	K	0,382987
124.	G	0,380475
125.	R	0,371189
126.	T	0,375143
127.	M	0,376302
128.	L	0,380089
129.	P	0,384894
130.	G	0,387639
131.	D	0,381687
132.	V	0,386419
133.	V	0,389658
134.	E	0,394975
135.	V	0,40072
136.	L	0,405927
137.	V	0,419573
138.	T	0,42649
139.	N	0,429164
140.	S	0,42573
141.	R	0,424499
142.	G	0,426645
143.	T	0,442465
144.	Q	0,451753
145.	D	0,446361
146.	A	0,443248
147.	D	0,42543
148.	D	0,411787
149.	V	0,398864
150.	E	0,395321

151.	R	0,374245
152.	L	0,358281
153.	C	0,349087
154.	K	0,346792
155.	A	0,339901
156.	L	0,329244
157.	R	0,319198
158.	L	0,315146
159.	D	0,308042
160.	P	0,305801
161.	Y	0,304683
162.	A	0,294515
163.	W	0,294831
164.	C	0,306816
165.	E	0,314611
166.	L	0,324515
167.	H	0,344684
168.	R	0,357016
169.	S	0,364933
170.	P	0,384852
171.	F	0,396825
172.	V	0,400377
173.	P	0,411273
174.	E	0,413606
175.	D	0,415899
176.	N	0,42068
177.	F	0,425703
178.	P	0,435928
179.	P	0,4356
180.	W	0,427904
181.	L	0,432447
182.	P	0,438019
183.	L	0,440348
184.	Q	0,451722
185.	K	0,465166
186.	P	0,468103
187.	L	0,463777
188.	T	0,459184
189.	L	0,45423
190.	G	0,445435
191.	Q	0,450025
192.	L	0,439439
193.	L	0,433527

194.	S	0,427615
195.	A	0,416433
196.	Y	0,409905
197.	V	0,401404
198.	D	0,405409
199.	I	0,404035
200.	S	0,398137
201.	S	0,388583
202.	S	0,377101
203.	S	0,362327
204.	Y	0,350917
205.	L	0,343756
206.	L	0,346659
207.	H	0,357929
208.	Q	0,372579
209.	S	0,392217
210.	F	0,405694
211.	F	0,424427
212.	E	0,452082
213.	S	0,479421
214.	L	0,511641
215.	F	0,538768
216.	R	0,569568
217.	I	0,589979
218.	Y	0,626148
219.	S	0,660498
220.	D	0,695379
221.	S	0,729571
222.	K	0,758676
223.	P	0,790627
224.	S	0,81606
225.	S	0,836782
226.	A	0,850453
227.	S	0,855178
228.	S	0,860578
229.	T	0,860837
230.	S	0,862786
231.	T	0,855223
232.	T	0,844216
233.	P	0,828548
234.	S	0,808553
235.	P	0,785815
236.	D	0,775695

237.	P	0,749109
238.	E	0,719947
239.	K	0,697269
240.	V	0,672093
241.	R	0,650253
242.	L	0,627831
243.	L	0,608134
244.	E	0,598924
245.	A	0,593526
246.	C	0,580715
247.	A	0,573361
248.	S	0,564404
249.	S	0,54867
250.	E	0,537118
251.	T	0,534433
252.	G	0,534402
253.	P	0,5409
254.	Q	0,535851
255.	L	0,529259
256.	L	0,529546
257.	R	0,536144
258.	S	0,539239
259.	L	0,541413
260.	S	0,544122
261.	K	0,533896
262.	S	0,535381
263.	S	0,532984
264.	T	0,521435
265.	P	0,517284
266.	L	0,501203
267.	C	0,490029
268.	Y	0,481839
269.	P	0,487807
270.	S	0,485302
271.	L	0,474679
272.	V	0,455681
273.	D	0,446707
274.	V	0,431239
275.	L	0,423503
276.	E	0,417244
277.	V	0,401485
278.	F	0,389013
279.	S	0,37339

280.	F	0,377748
281.	V	0,374386
282.	Q	0,369023
283.	I	0,364135
284.	P	0,358975
285.	L	0,361994
286.	D	0,361512
287.	R	0,365426
288.	L	0,355011
289.	L	0,358826
290.	E	0,369206
291.	V	0,374829
292.	S	0,382854
293.	G	0,393226
294.	P	0,403087
295.	L	0,411695
296.	Q	0,420847
297.	T	0,431319
298.	R	0,44133
299.	R	0,442022
300.	Y	0,441746
301.	S	0,437672
302.	L	0,439637
303.	A	0,441706
304.	N	0,445392
305.	W	0,446164
306.	I	0,449272
307.	P	0,454958
308.	A	0,449237
309.	T	0,448712
310.	L	0,458111
311.	P	0,464834
312.	P	0,466166
313.	S	0,462746
314.	P	0,460212
315.	L	0,456106
316.	Q	0,45228
317.	L	0,453501
318.	C	0,457076
319.	M	0,462911
320.	R	0,473838
321.	E	0,470994
322.	V	0,476035

323.	C	0,482028
324.	A	0,499018
325.	R	0,510596
326.	R	0,520103
327.	S	0,519818
328.	A	0,527297
329.	N	0,520565
330.	L	0,513073
331.	P	0,514887
332.	A	0,513182
333.	A	0,505322
334.	T	0,504854
335.	A	0,502718
336.	V	0,501049
337.	G	0,493013
338.	A	0,495592
339.	D	0,491865
340.	A	0,507765
341.	Q	0,516921
342.	R	0,521269
343.	V	0,525785
344.	A	0,530906
345.	D	0,53096
346.	M	0,536272
347.	L	0,528566
348.	N	0,53552
349.	R	0,543336
350.	A	0,546625
351.	A	0,55753
352.	Q	0,567208
353.	D	0,568339
354.	A	0,565852
355.	S	0,563765
356.	R	0,562218
357.	D	0,550807
358.	H	0,543791
359.	S	0,533516
360.	D	0,519
361.	F	0,507393
362.	F	0,49937
363.	F	0,492703
364.	G	0,49605
365.	H	0,507152

366.	T	0,512274
367.	S	0,513836
368.	H	0,514488
369.	P	0,518595
370.	L	0,526066
371.	C	0,535502
372.	C	0,545554
373.	A	0,565499
374.	A	0,577909
375.	R	0,592467
376.	S	0,606098
377.	M	0,617805
378.	T	0,623667
379.	R	0,631104
380.	S	0,636939
381.	A	0,639146
382.	A	0,634097
383.	A	0,623144
384.	A	0,606905
385.	G	0,597607
386.	Q	0,581772
387.	R	0,574426
388.	G	0,553967
389.	M	0,530906
390.	Y	0,507685
391.	V	0,489292
392.	S	0,466008
393.	F	0,449781
394.	S	0,437173
395.	L	0,419331
396.	F	0,414595
397.	G	0,417278
398.	N	0,40936
399.	S	0,400863
400.	L	0,391838
401.	F	0,389633
402.	A	0,387997
403.	R	0,400455
404.	Q	0,406902
405.	L	0,423069
406.	Q	0,430234
407.	A	0,433778
408.	G	0,441382

409.	C	0,45075
410.	T	0,466865
411.	A	0,477783
412.	L	0,481885
413.	C	0,478268
414.	N	0,468713
415.	P	0,456442
416.	A	0,443424
417.	Q	0,442911
418.	A	0,456372
419.	K	0,463191
420.	S	0,463132
421.	L	0,466508
422.	C	0,459012
423.	S	0,45773
424.	Q	0,451038
425.	L	0,451467
426.	F	0,44346
427.	L	0,430122
428.	I	0,419245
429.	G	0,406546
430.	C	0,398633
431.	G	0,394445
432.	T	0,403371
433.	G	0,413026
434.	I	0,426021
435.	A	0,428968
436.	P	0,439905
437.	L	0,436566
438.	I	0,444091
439.	A	0,454791
440.	A	0,464647
441.	V	0,480533
442.	T	0,496556
443.	Q	0,500797
444.	L	0,499633
445.	M	0,512953
446.	L	0,524522
447.	R	0,528958
448.	R	0,540284
449.	A	0,553299
450.	S	0,555031
451.	T	0,541603

452.	A	0,536022
453.	A	0,517944
454.	G	0,515731
455.	S	0,504955
456.	A	0,488831
457.	P	0,459274
458.	F	0,432972
459.	P	0,405454
460.	C	0,372556
461.	W	0,341513
462.	V	0,335604
463.	F	0,32809
464.	Y	0,322387
465.	G	0,323895
466.	A	0,322521
467.	R	0,310401
468.	T	0,294536
469.	K	0,291095
470.	A	0,294249
471.	E	0,303256
472.	L	0,315424
473.	L	0,309681
474.	Y	0,323118
475.	D	0,338903
476.	E	0,345838
477.	T	0,345162
478.	L	0,346134
479.	Q	0,359493
480.	E	0,361911
481.	A	0,359008
482.	L	0,357228
483.	R	0,363308
484.	T	0,362371
485.	G	0,364833
486.	A	0,369248
487.	I	0,37769
488.	A	0,391869
489.	K	0,402156
490.	Y	0,396921
491.	E	0,393238
492.	Y	0,412194
493.	A	0,417713
494.	L	0,423388

495.	S	0,449483
496.	R	0,472467
497.	E	0,487544
498.	E	0,493597
499.	D	0,49817
500.	N	0,502736
501.	K	0,503348
502.	K	0,487026
503.	Q	0,48488
504.	G	0,4819
505.	R	0,479487
506.	Y	0,481294
507.	V	0,467406
508.	T	0,458733
509.	D	0,45911
510.	L	0,458901
511.	V	0,449508
512.	K	0,436891
513.	R	0,423328
514.	N	0,398643
515.	R	0,386849
516.	L	0,38121
517.	M	0,375897
518.	V	0,387917
519.	T	0,392448
520.	G	0,400796
521.	S	0,414332
522.	L	0,419225
523.	Q	0,419393
524.	N	0,419188
525.	E	0,410964
526.	G	0,406995
527.	Q	0,408625
528.	L	0,405382
529.	F	0,395333
530.	V	0,380419
531.	C	0,371701
532.	G	0,366998
533.	P	0,377521
534.	A	0,383754
535.	K	0,381914
536.	A	0,38404
537.	L	0,381429

538.	L	0,37433
539.	S	0,37512
540.	V	0,372958
541.	R	0,374981
542.	Q	0,392027
543.	L	0,41697
544.	V	0,443812
545.	K	0,474075
546.	C	0,501064
547.	D	0,528087
548.	L	0,55169
549.	L	0,575828
550.	A	0,600821
551.	E	0,622915
552.	P	0,62315
553.	D	0,631025

554.	D	0,640478
555.	D	0,640983
556.	D	0,62408
557.	S	0,614574
558.	V	0,601575
559.	Q	0,592383
560.	E	0,584008
561.	Q	0,566852
562.	R	0,539012
563.	L	0,513267
564.	L	0,483801
565.	M	0,455333
566.	L	0,432417
567.	E	0,420669
568.	D	0,407592
569.	R	0,385896

570.	G	0,365139
571.	R	0,355149
572.	L	0,332726
573.	N	0,318814
574.	F	0,306187
575.	D	0,314174
576.	I	0,32253
577.	W	0,32363
578.	S	0,336068
579.	T	0,329485
580.	G	0,324501
581.	N	0,332751
582.	I	0,325877
583.	F	0,338405
584.	E	0,350156

Anexo 6: picos obtidos nos espectros de MALDI-FT-ICR

Quadro A.4 – Picos obtidos após hidrólise do *Li*NOS tetramérico na ausência de cofatores

m/z	z	I	Res.
599,2637	1+	307551	160830
606,0824	1+	191002	174341
689,2118	1+	303056	116952
733,1757	1+	240306	144629
788,3061	1+	210126	134101
795,1246	1+	214315	130130
810,2873	1+	260680	98800
842,5091	1+	599484	110929
851,4406	1+	483963	109846
856,5251	1+	272641	127776
861,0705	1+	161368	122355
870,5412	1+	564294	113646
878,2544	1+	245481	93104
887,4	1+	340067	82623
922,2175	1+	167756	108025
938,182	1+	239581	106031
977,3496	1+	156570	100114
984,1665	1+	237987	81475
999,33	1+	263011	94226
1015,296	1+	177197	107908

1021,313	1+	110527	110315
1045,563	1+	149749	100343
1061,28	1+	280795	97588
1067,297	1+	302895	96406
1076,444	1+	169547	101201
1105,243	1+	104343	71609
1111,261	1+	133357	84761
1127,225	1+	163362	91973
1166,391	1+	222789	81186
1173,21	1+	126729	68876
1175,537	1+	150303	85143
1182,355	1+	105859	86228
1188,373	1+	181306	66579
1204,335	1+	87834	74348
1212,693	1+	637164	78070
1234,678	1+	132459	65684
1265,487	1+	111809	77499
1393,382	1+	95717	58254
1729,916	1+	163129	53302
1765,737	1+	138155	48543

Quadro A.5 – Picos obtidos após hidrólise do *Li*NOS tetramérico na presença de 1mM BH₄:

m/z	z	I	Res.
656,0631	1+	267519	140336
733,1757	1+	260607	152430
842,5093	1+	302955	109924
851,4408	1+	478588	111073
861,0705	1+	228166	117563
870,5406	1+	151197	120569
922,2184	1+	173253	109610
938,1819	1+	214868	106425
999,33	1+	132685	95874
1034,149	1+	99379	89727
1050,112	1+	123379	91207
1067,298	1+	195043	99296
1111,262	1+	93808	100995
1114,545	1+	145797	80072
1127,225	1+	131481	88548
1149,207	1+	93357	103430
1157,246	1+	99214	104802
1166,391	1+	97502	100111
1212,692	1+	453726	74842
1234,677	1+	123411	71659
1729,916	1+	162134	48399
1744,889	1+	257057	42892
1985,972	1+	123409	39870

Quadro A.6 – Picos obtidos após hidrólise do *Li*NOS tertamérico na presença de 1mM BH₄ e 100μM hemina

m/z	z	I	Res.
606,0826	1+	435650	165312
795,1249	1+	450056	130189
832,489	1+	486717	122830
842,5094	1+	2219864	109557
851,4409	1+	1354748	113136
856,5249	1+	459867	119504
870,5415	1+	959567	118470
984,1666	1+	560202	77747
1045,563	1+	476573	89512
1061,279	1+	368565	93138
1173,21	1+	301698	77820
1211,159	1+	109869	79677
1212,693	1+	1952851	70107
1220,596	1+	94772	67014
1234,676	1+	309017	52779
1235,513	1+	102678	86742
1235,531	1+	211332	91184
1254,608	1+	213681	60409
1277,708	1+	590779	50558
1383,691	1+	291607	56526
1401,737	1+	196583	50300
1434,771	1+	229397	74967
1459,679	1+	254695	63581
1475,748	1+	268667	51267
1475,784	1+	297849	48578
1668,875	1+	263901	50623
1707,766	1+	238193	39831
1729,916	1+	883094	48251
1744,901	1+	948926	40793
1765,736	1+	370427	51970
1791,728	1+	234919	54378
1896,889	1+	229616	42918
1985,969	1+	417584	42741
2383,951	1+	418385	36321