



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LARISSA GONÇALVES MACIEL

**3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE DE *Aedes Aegypti*:
CLONAGEM, EXPRESSÃO, AVALIAÇÃO FUNCIONAL E SÍNTESE DE
PROVÁVEIS INIBIDORES SELETIVOS**

Recife

2016

LARISSA GONÇALVES MACIEL

**3-HIDRÓXI-QUINURENINA TRANSAMINASE DE *Aedes Aegypti*:
CLONAGEM, EXPRESSÃO, AVALIAÇÃO FUNCIONAL E SÍNTESE DE
PROVÁVEIS INIBIDORES SELETIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final à obtenção do título de Mestre em Química.

ORIENTADORA:

PROFA. JANAÍNA VERSIANI DOS ANJOS

COORIENTADORA:

PROFA. THEREZA AMÉLIA SOARES DA SILVA

Recife

2016

Catálogo na fonte

Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB 4-572

M152t Maciel, Larissa Gonçalves.

3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti*: clonagem, expressão, avaliação funcional e síntese de prováveis inibidores seletivos / Larissa Gonçalves Maciel. – 2016.

85 f.: fig., tab.

Orientadora: Janaína Versiani dos Anjos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, Recife, 2016.

Inclui referências e anexos.

1. Química orgânica. 2. *Aedes aegypti*. I. Anjos, Janaína Versiani dos (Orientadora). II. Título.

LARISSA GONÇALVES MACIEL

**"3-HIDRÓXI- QUINURENINA TRANSAMINASE DE *AEDES AEGYPTI*:
CLONAGEM, EXPRESSÃO, AVALIAÇÃO FUNCIONAL E SÍNTESE DE
PROVÁVEIS INIBIDORES SELETIVOS"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em: 11/04/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Janaína Versiani dos Anjos (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Lothar Wilhelm Bieber

Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Química Fundamental

Prof. Christian Robson de Souza Reis

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
FIOCRUZ

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos,
familiares e amigos por todo o apoio e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Às professoras Janaína e Thereza pela oportunidade de participar deste projeto, pela orientação, discussões e ensinamentos exemplares.

Às pesquisadoras Maria Helena Neves e Tatiany Romão do Departamento de Entomologia - CPqAM/FIOCRUZ pela colaboração, ensinamentos e conselhos indispensáveis.

À professora Ana Maria Souto-Maior e aos integrantes do Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos pelo auxílio na realização dos ensaios enzimáticos.

Aos integrantes do Departamento de Entomologia - CPqAM/FIOCRUZ por todo o auxílio em bancada, discussões e momentos de descontração.

Aos integrantes do Laboratório de Síntese Orgânica pelas discussões, auxílios nos experimentos e amizade.

Aos técnicos da Central Analítica e secretários da Pós-Graduação.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A busca por novos métodos de controle do vetor *Aedes aegypti* tem sido amplamente realizada para diminuir a transmissão de arboviroses como Zika e Chikungunya que têm um grande impacto em saúde pública atualmente. Macromoléculas envolvidas em vias metabólicas essenciais para a sobrevivência do mosquito tornam-se alvos moleculares importantes para o controle desses vetores. Uma das vias de detoxificação desta espécie é a via das quinureninas, que em uma das etapas, converte 3-hidroxiquinurenina (3-HK - espécie reativa de oxigênio e nitrogênio) em ácido xanturênico (substância atóxica) por meio da 3-hidroxiquinurenina transaminase (HKT). A proposta deste trabalho é desenvolver larvicidas que atuam como inibidores da atividade enzimática da HKT, causando morte do inseto. Os inibidores sintetizados foram planejados após resultados de Docking Molecular obtidos por nosso grupo com a HKT ortóloga de *Anopheles gambiae*. Esses compostos são inéditos e foram bem caracterizados, exibindo alto grau de pureza. A síntese foi realizada em três etapas e com rápida purificação, fatores facilitadores para a produção em larga escala. A proteína HKT recombinante fusionada à Glutathione-S-transferase (HKT/GST) foi produzida em *Escherichia coli* para avaliação da inibição dos compostos sintetizados. A HKT/GST purificada e dialisada apresentou um padrão de migração de aproximadamente 62 kDa e exibiu atividade em avaliação funcional através de ensaio enzimático desenvolvido para análise em HPLC com detector UV. Os 12 compostos testados mostraram inibição parcial da HKT/GST, sendo os compostos com o anel aromático com substituição *para*-anisoila e sem substituição os melhores inibidores, com valores de razão da área do pico de 3-HK na reação sem inibidor e após a inibição que são 0,69 e 0,64 respectivamente. Isso significa em relação à razão das áreas do pico do 3-HK, quanto mais próxima de zero, mais diferentes são as áreas e consequentemente maior o acúmulo do substrato. Esses resultados corroboram com a hipótese de que os sais sintetizados são inibidores da HKT e servirão como molde para o desenvolvimento de inibidores mais potentes.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. 3-hidróxi-quinurenina transaminase. inibidores competitivos. 1,2,4 – oxadiazóis.

ABSTRACT

The search for new methods of control of *Aedes aegypti* has been widely performed to reduce the transmission of arboviruses as Zika and Chikungunya that have a major impact on public health today. Macromolecules involved in essential metabolic pathways for the mosquito survival become important molecular targets for the control of these vectors. One of the detoxification pathways of this species is the kynurenine pathway that in one of the steps, converts 3-hydroxykynurenine (3-HK - reactive oxygen and nitrogen species) in xanturenic acid (non-toxic substance) by 3-hydroxykynurenine transaminase (HKT). The purpose of this work is to develop larvicides that act as inhibitors of the enzymatic activity of HKT, causing insect death. The synthesized inhibitors were planned after results of Molecular Docking obtained by our group with HKT ortholog of *Anopheles gambiae*. These compounds are unpublished and were well characterized, exhibiting high purity. The synthesis was carried out in three stages and rapid purification, facilitating factors for large-scale production. Recombinant HKT protein fused to the Glutathione S-transferase (HKT/GST) was produced in *Escherichia coli* for evaluation of inhibition of the synthesized compounds. The HKT/GST purified and dialyzed showed a pattern of migration of approximately 62 kDa and exhibited activity in functional assessment by enzymatic assay developed for analysis on HPLC with UV detector. The 12 tested compounds showed partial inhibition of HKT/GST, which compounds with the aromatic ring substitution *para*-anisole and without substituent the best inhibitors with ratio values of the peak area of 3-HK in no inhibitor reaction and after inhibition which are 0.69 and 0.64, respectively. This means in relation to the peak area ratio of 3-HK, the nearer to zero, the different between the areas are higher and therefore there is more accumulation of the substrate. These results corroborate the hypothesis that the salts synthesized are HKT inhibitors and serve as a template for the development of more potent inhibitors.

Keywords: *Aedes aegypti*. 3-hidroxykynurenine transaminase. competitive inhibitors. 1,2,4 – oxadiazoles.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLA OU ABREVIATURA	SIGNIFICADO
3-HK	3-hidróxi-quinurenina
Ar	Grupo arila
AX	Ácido xanturênico
AChE	Acetilcolinesterase
AeAGT	Alanina glioxilato transferase de <i>Aedes aegypti</i>
AeHKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase de <i>Aedes aegypti</i>
AnHKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase de <i>Anopheles gambiae</i>
BHC	Benzenohexacloro
BSA	Albumina de soro bovino
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL₅₀	Concentração letal para 50% da população de indivíduos
d	Duplete
dd	Duplo duplete
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DENV	Vírus da Dengue
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
GenBank	Banco de genes
GST	Glutathiona-S-transferase

HCH	Hexaclorociclohexanos
HKT	3-hidróxi-quinurenina transaminase
HKT1/GST	Clone 1 da 3-hidróxi-quinurenina transaminase fusionada à Glutathione-S-transferase
HKT2/GST	Clone 2 da 3-hidróxi-quinurenina transaminase fusionada à Glutathione-S-transferase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
KAT	Quinurenina aminotransferase
KFM	Quinurenina formamidase
KMO	Quinurenina monooxigenase
m	Multiplete
NAD⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina no estado oxidado
O.D.	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
P.F.	Ponto de fusão
PLP	Piridoxal-5-fosfato
q	Quinteto
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
s	Simpleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SUS	Sistema Único de Saúde

t	Tripleto
T.A.	Temperatura ambiente
TDO	Triptofano dioxigenase
ZIKV	Vírus da Zika
δ	Deslocamento químico

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Via das quinureninas em mosquitos. TDO: triptofano dioxigenase; KFM: quinurenina formamidase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase e HKT: 3-hidróxi-quinurenina transaminase	25
Esquema 2 - Síntese dos sais sódicos 2a-l a partir dos ácidos 1a-l	31
Esquema 3 - Mecanismo de formação arilamidoximas a partir de arilnitrilas com hidroxilamina por ataque pelo oxigênio	32
Esquema 4 - Mecanismo da síntese do ácido 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il] butanóico..	33
Esquema 5 - Conversão da 3-hidróxi-quinurenina em ácido xanturênico	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição dos casos notificados e confirmados de Chikungunya (A) e Zika (B) até 23 de abril de 2016	20
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i> que se inicia na oviposição e após a eclosão, passagem por quatro estágios larvais, fase pupa e adulto	21
Figura 3 - Organoclorados inseticidas	23
Figura 4 - Inseticidas organofosforados e carbamatos	23
Figura 5 - Inseticida piretróide	24
Figura 6 - Estrutura tridimensional da AnHKT, com ampliação em seu sítio ativo preenchido com um inibidor, o ácido 4-(2-aminofenil)-4-oxobutírico, na presença do cofator piridoxal-5-fosfato (PLP)	27
Figura 7 - Comparação entre o inibidor testado e o proposto por nosso grupo	28
Figura 8 - 1,2,4-Oxadiazóis utilizados na terapêutica	28
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) da substância 2a	34
Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) da substância 2a	35
Figura 11 - Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) da substância 2a	35
Figura 12 – Separação eletroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de RT-PCR amplificados. A reação foi feita em quadruplicata (HKT 1-4). PM: 1 kb Plus Ladder	36
Figura 13 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da HKT de <i>Aedes aegypti</i> depositada no <i>GenBank</i> (AF435806) com as clonadas a partir de larvas de <i>Aedes aegypti</i> da linhagem Reclab	37

Figura 14 – Alinhamento *online* realizado da sequência obtida em comparação com o banco de genes com 99% de similaridade. Somente dois nucleotídeos não estavam de acordo com a sequência base. A substituição em azul não foi prejudicial, porém a deleção da citosina modificou a fase de leitura, alterando os aminoácidos seguintes..... 38

Figura 15 – Separação eletroforética de proteínas de cultura de *Escherichia coli*. Setas apontam a expressão da proteína recombinante HKT antes e após a indução por IPTG. SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. PM: Benchmark Protein Ladder® em kDa 39

Figura 16 - Separação eletroforética de proteínas de uma amostra da HKT/GST purificada e dialisada. SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. PM: Benchmark Protein Ladder® em kDa 40

Figura 17 – Cromatogramas de uma das replicatas dos ensaios enzimáticos das enzimas HKT1/GST (superior) e HKT/GST2 (inferior). O pico com tempo de retenção igual a 2,5 min é relativo ao 3-HK e o pico de 3,5 min é relativo ao ácido xanturênico... 43

Figura 18 – Representação esquemática do plasmídeo pGEM-T Easy usado para clonagem do gene da HKT 56

Figura 19 – Vetor pGEX 4T₃ utilizado para subclonagem e expressão da HKT 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados experimentais das substâncias 2a-l	31
Tabela 2 – Padronização do ensaio enzimático	41
Tabela 3 - Áreas dos picos de 3-HK e AX após a reação enzimática	42
Tabela 4 - Formação de ácido xanturênico na variação das quantidades de enzima e o tempo de reação	44
Tabela 5 – Acúmulo de 3-HK nos ensaios de inibição enzimática	45
Tabela 6 - Oligonucleotídeos desenhados a partir da sequência do <i>GenBank</i> nº AF435806.1 para amplificação da proteína HKT de <i>Aedes aegypti</i> . As letras em negrito indicam sítios de restrição para as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Xho</i> I	55
Tabela 7 - Soluções preparadas em tampão fosfato 200 mM pH 7 para realizar os ensaios enzimáticos. *Por ter concentração final pequena, a primeira solução de PLP foi diluída 10 vezes para ser ajustada ao volume de reação	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1. Arboviroses transmitidas por <i>Aedes aegypti</i>	19
1.2. <i>Aedes aegypti</i>	21
1.3. Controle do inseto	22
1.4. Via das quinureninas	24
1.5. Os 1,2,4-oxadiazóis	28
2 HIPÓTESE	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Síntese dos sais sódicos 1,2,4-oxadiazólicos	31
3.2. Caracterização dos 4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoatos de sódio	33
3.3. Análise <i>in silico</i> da HKT	36
3.4. Amplificação do cDNA por RT-PCR	36
3.5. Expressão da HKT recombinante	39
3.6. Purificação da HKT recombinante	40
3.7. Ensaios enzimáticos	40
3.8. Ensaios de inibição enzimática	44
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	46
5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	47
5.1. Procedimentos gerais	47
5.2. Equipamentos utilizados	47
5.3. Síntese dos ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) butanóicos	47
5.4. Síntese dos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) butanoatos de sódio	51
5.5. Clonagem da HKT para expressão heteróloga	54
5.5.1. Colônias de <i>Aedes aegypti</i>	54
5.5.2. Extração do RNA	54
5.5.3. Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	55
5.5.4. Clonagem no pGEM-T Easy	56
5.5.5. Digestão dupla com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>XhoI</i>	57
5.5.6. Subclonagem com o vetor de expressão pGEX4T ₃	57
5.5.7. Expressão da HKT recombinante	58

5.5.8. Purificação por cromatografia de afinidade	59
5.6. Avaliação da funcionalidade da HKT recombinante	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2b	64
ANEXO B: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2b	65
ANEXO C: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2c	66
ANEXO D: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2c	67
ANEXO E: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2d	68
ANEXO F: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2d	69
ANEXO G: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2e	70
ANEXO H: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2e	71
ANEXO I: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2f	72
ANEXO J: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2f	73
ANEXO K: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2g	74
ANEXO L: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2g	75
ANEXO M: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2h	76
ANEXO N: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2h	77
ANEXO O: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2i	78
ANEXO P: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2i	79

ANEXO Q: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2j	80
ANEXO R: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2j	81
ANEXO S: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2k	82
ANEXO T: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2k	83
ANEXO U: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2l	84
ANEXO V: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2l	85

1 INTRODUÇÃO

1.1. Arboviroses transmitidas por *Aedes aegypti*

Arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes.¹ As fêmeas de mosquitos vetores são hematófagas, pois precisam de sangue para maturação de seus ovos. Por esta razão, a fêmea infectada transmite vírus durante sua alimentação.^{1,2}

Várias arboviroses já foram notificadas no Brasil, entre elas a febre amarela, dengue, febre Chikungunya e Zika.^{3,4} Os surtos de febre amarela foram erradicados no país com a introdução da vacina no Sistema Único de Saúde (SUS), em que toda criança após os seis meses de nascimento deve ser vacinada.⁵

As doenças causadas pelos vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) estão entre as principais preocupações emergenciais no país. O DENV e ZIKV pertencem à família *Flaviviridae* e o CHIKV pertence à família *Togaviridae*. Os três são vírus de RNA de fita simples positiva, possuem envelope e simetria icosaédrica.²

A dengue foi introduzida no país há alguns anos, mas os vírus ZIKV e CHIKV foram detectados em 2015 e 2014, respectivamente. Atenção deve ser dada às complicações causadas por essas doenças, como a síndrome congênita do Zika presente em nascituros de grávidas infectadas pelo ZIKV e forte dores articulares por longos períodos em infectados por CHIKV.⁴ Em 2016, foram registrados 1.054.127 casos prováveis de dengue no país entre os dias 3 de janeiro e 23 de abril. Em 2015, foram notificados no país 38.332 casos prováveis de febre Chikungunya e 6 óbitos foram confirmados (nos estados da Bahia, Sergipe, São Paulo e Pernambuco).⁶ Dois genótipos do vírus foram identificados, com 735 casos no Amapá do genótipo oriundo da Ásia e 778 casos na Bahia com o genótipo africano.⁷ Até o dia 23 de abril deste ano, 64.349 casos prováveis de febre Chikungunya foram notificados ao Ministério da Saúde (Figura 1). Os óbitos foram confirmados em cinco estados, dentre eles Pernambuco e Rio de Janeiro. Em relação à Zika, 120.161 casos prováveis foram notificados e 39.993 foram confirmados (Figura 1). Três óbitos de adultos foram confirmados nos estados do Maranhão, Pará e Rio Grande do Norte.⁶ Até dezembro de 2015, 2.975 casos suspeitos de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika foram notificados à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e 37 óbitos suspeitos.⁶

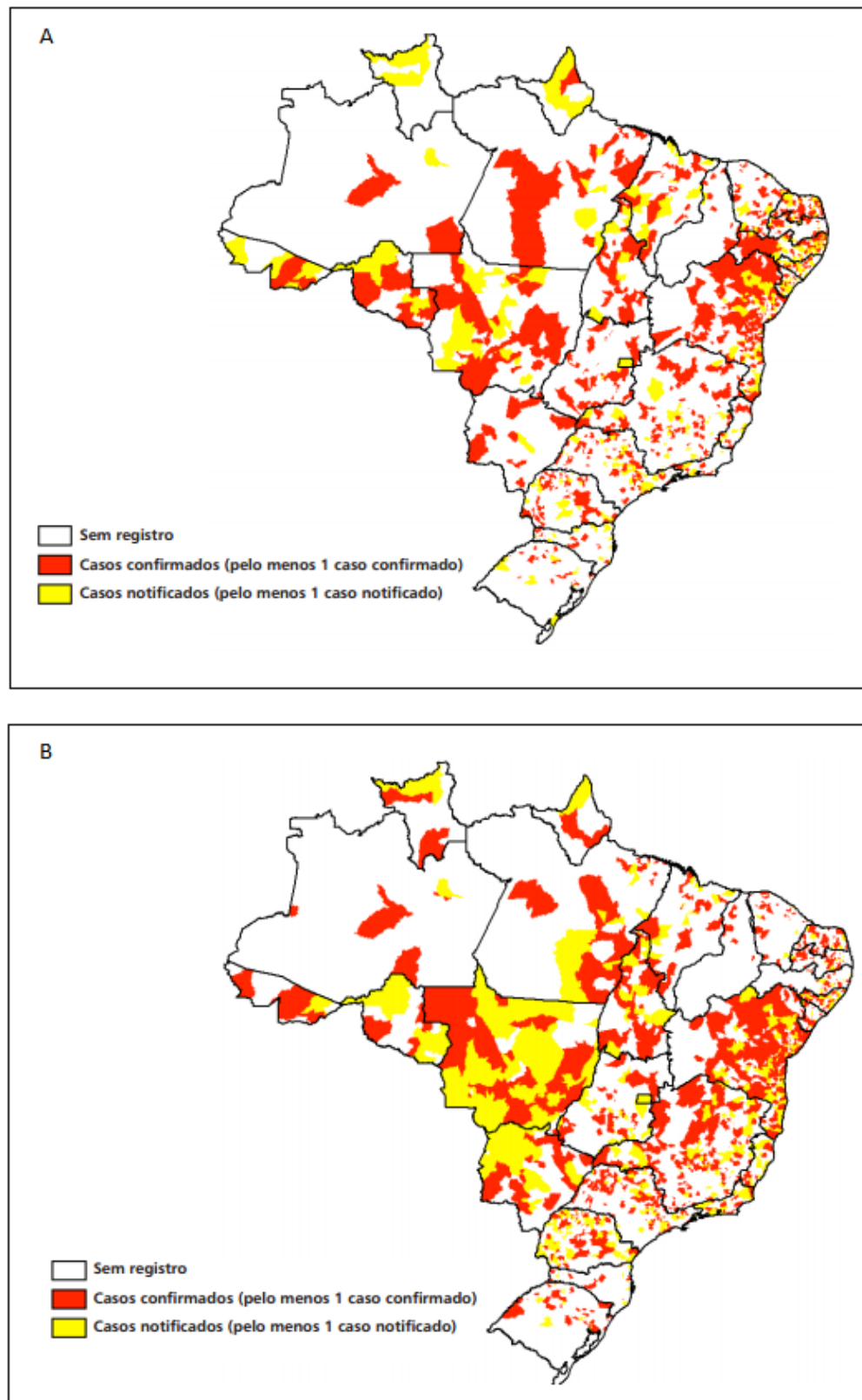


Figura 1 – Mapa de distribuição dos casos notificados e confirmados de Chikungunya (A) e Zika (B) até 23 de abril de 2016.⁶

1.2. *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é de origem africana que vem se espalhando em regiões tropicais e subtropicais desde o século XVI.⁸ O mosquito pertence à família *Culicidae* e é facilmente adaptável a ambientes urbanos, proliferando-se em quaisquer locais com água parada e vasta opção para a hematofagia da fêmea. O ciclo de vida do mosquito vai desde o ovo, passando por quatro estágios larvais, pela fase pupa até a fase adulta (Figura 2). Este possui hábitos diurnos, tanto para o repasto sanguíneo quanto para a postura dos ovos.⁹

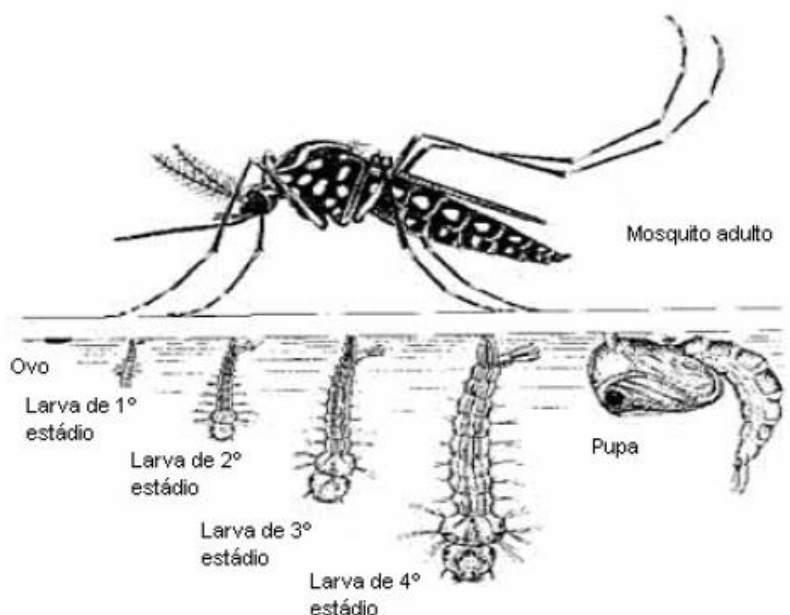


Figura 2 - Ciclo biológico do *Aedes aegypti* que se inicia na oviposição e após a eclosão, passagem por quatro estágios larvais, fase pupa e adulto.¹⁰

Os locais de desenvolvimento dos ovos e larvas são chamados de criadouros e estes são normalmente recipientes com água parada, como calhas, vasos de plantas e grandes reservatórios de água. Quando possível, a eliminação desses criadouros é uma forma de controle da população do mosquito, pois impede o inseto de chegar à fase adulta. O controle em recipientes que o estoque de água é indispensável pode ser feito com aditivos químicos como no caso de piscinas ou vedação para impedir que a fêmea deposite os ovos, como em caixas d'água e tonéis.⁸

As arboviroses requerem transferência do vírus entre o mosquito e o ser humano. O vírus é de tamanho microscópico, o que torna sua detecção difícil em relação ao mosquito. Assim, o mosquito se torna o agente mais fácil de ser controlado para a diminuição da

transmissão das doenças. Por ter sua fase larval delimitada geograficamente no criadouro, a erradicação desses indivíduos se torna mais acessível. E para trabalhar com o terceiro componente que é o ser humano, deve-se desenvolver vacinas contra todos os tipos e sorotipos das arbovirose, tornando o método caro e de longo prazo. Portanto, o controle mais promissor das arbovirose é por meio de uso de inseticidas.¹¹

1.3. Controle do inseto

Os inseticidas mais utilizados no controle de vetores podem ser classificados em inseticidas de origem vegetal, inseticidas químicos (inorgânicos e orgânicos) e inseticidas biológicos. Estes também podem ser divididos em larvicidas e adulticidas (substâncias que matam o inseto na fase ovo e larval e adulta, respectivamente).¹²

O controle químico é uma das formas mais utilizadas de controle de vetores em Saúde Pública. O primeiro inseticida sintetizado com efeito prolongado foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT), um inseticida organoclorado. Outros inseticidas que atuam no sistema nervoso dos insetos pertencem aos grupos dos organofosforados, carbamatos e piretróides.¹³

Os organoclorados são classificados em quatro grupos: difenilalifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos, e policloroterpenos. O DDT está incluso no grupo dos difenilalifáticos, que é o primeiro grupo de inseticidas sintéticos. O benzenohexacloro (BHC), do grupo dos hexaclorociclohexanos (HCH), também comercializado com o nome de Lindano, atua de maneira semelhante ao DDT. Os ciclodienos, como Clordano e Aldrina, são inibidores do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), que, após ligação do neurotransmissor, aumenta a permeabilidade dos íons cloreto nos neurônios. Os policloroterpenos, como o Toxafeno e o Estrobane, possuem modo de ação equivalente aos ciclodienos. Apesar de seu vasto uso no controle de malária, os organoclorados foram proibidos em vários países devido a sua permanência no ambiente e ao acúmulo em tecidos animais (Figura 3).¹³

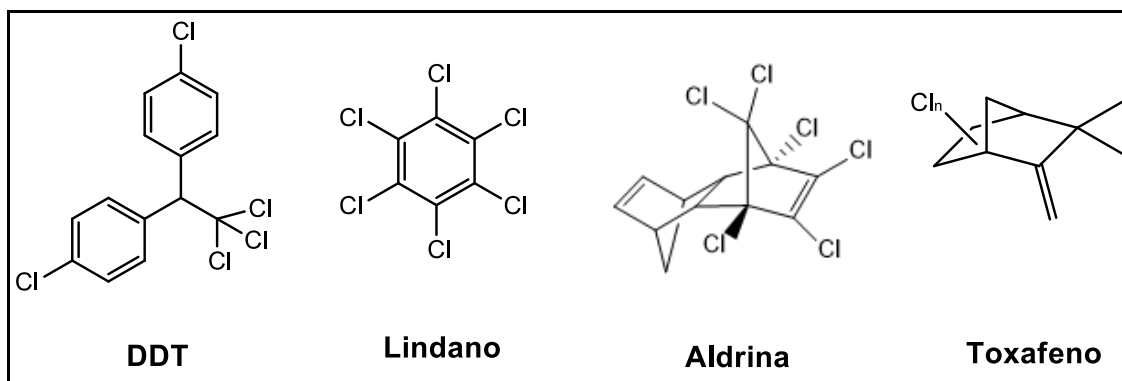


Figura 3 - Organoclorados inseticidas

Os organofosforados são divididos em alifáticos, aromáticos e heterocíclicos e inibem a acetilcolinesterase (AChE) irreversivelmente, importante enzima na transmissão sináptica. Contrariamente aos organoclorados, estes não se acumulam nos tecidos, mas são instáveis, necessitando de renovação periódica. O Temefós é um larvicida organofosforado recomendado pela OMS para uso em água potável.

Já os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e possuem ação similar aos organofosforados, exceto pela inibição reversível da AChE. Alguns dos carbamatos conhecidos são o Propoxur, Carbaril e Carbofurano (Figura 4).^{13,14}

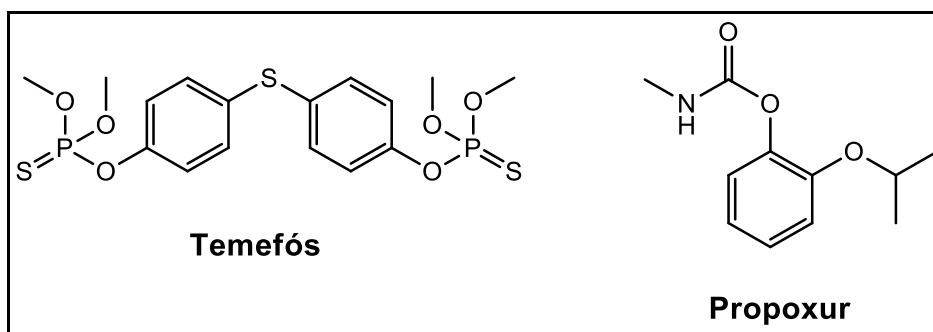


Figura 4 - Inseticidas organofosforados e carbamatos

Os piretróides possuem modo de ação similar ao DDT. São biodegradáveis e praticamente não causam intoxicações em aves e mamíferos, mas são extremamente tóxicos para os animais aquáticos. Os piretróides foram desenvolvidos em quatro gerações. Somente na terceira geração, os piretróides foram aplicados em uso agrícola pela alta atividade inseticida e fotoestabilidade dos compostos. A quarta geração é a atualmente usada e inclui o Cipermetrina, Fluvalinato e Teflutrina (Figura 5).¹³

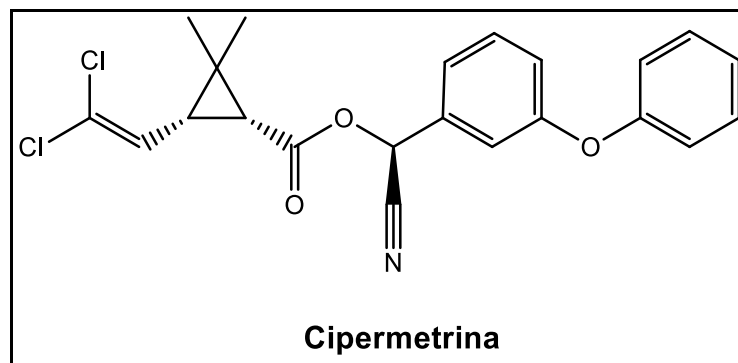


Figura 5 - Inseticida piretróide.

Os inseticidas têm sido bastante usados e seu uso contínuo tem provocado resistência aos insetos. A resistência foi detectada para todas as classes de inseticidas, provocando o reaparecimento de doenças transmitidas por vetores.¹³ Existem quatro principais mecanismos de resistência que os mosquitos podem desenvolver: Resistência metabólica, por mutação, por penetração e comportamental. Na resistência metabólica, os insetos se detoxificam ou destroem o inseticida com maior rapidez, expressando as enzimas de detoxificação em maior quantidade, como as Glutathione-S-transferases. É o mecanismo mais eficiente por ter um amplo espectro de atividade. A mutação diminui ou impede a interação do inseticida com seu alvo, reduzindo ou eliminando o efeito. Resistência por penetração faz com que o inseto desenvolva barreiras na cutícula, absorvendo o inseticida mais lentamente que os insetos suscetíveis. E a resistência comportamental é a capacidade do inseto de identificar o inseticida e evitá-lo. Os insetos podem simplesmente parar de se alimentar de plantas ou saírem da área se identificarem os inseticidas. Contudo, a resistência é desenvolvida após algumas gerações depois que o inseto entra em contato com o inseticida. Para uso imediato, é necessário o desenvolvimento de inseticidas com modo de ação diferenciado aos existentes no mercado, com maior especificidade e menor toxicidade. Todavia, a resistência dos atuais e novos inseticidas deve ser acompanhada para entender o mecanismo e promover o desenvolvimento de novas estratégias de controle dos vetores.^{15,16}

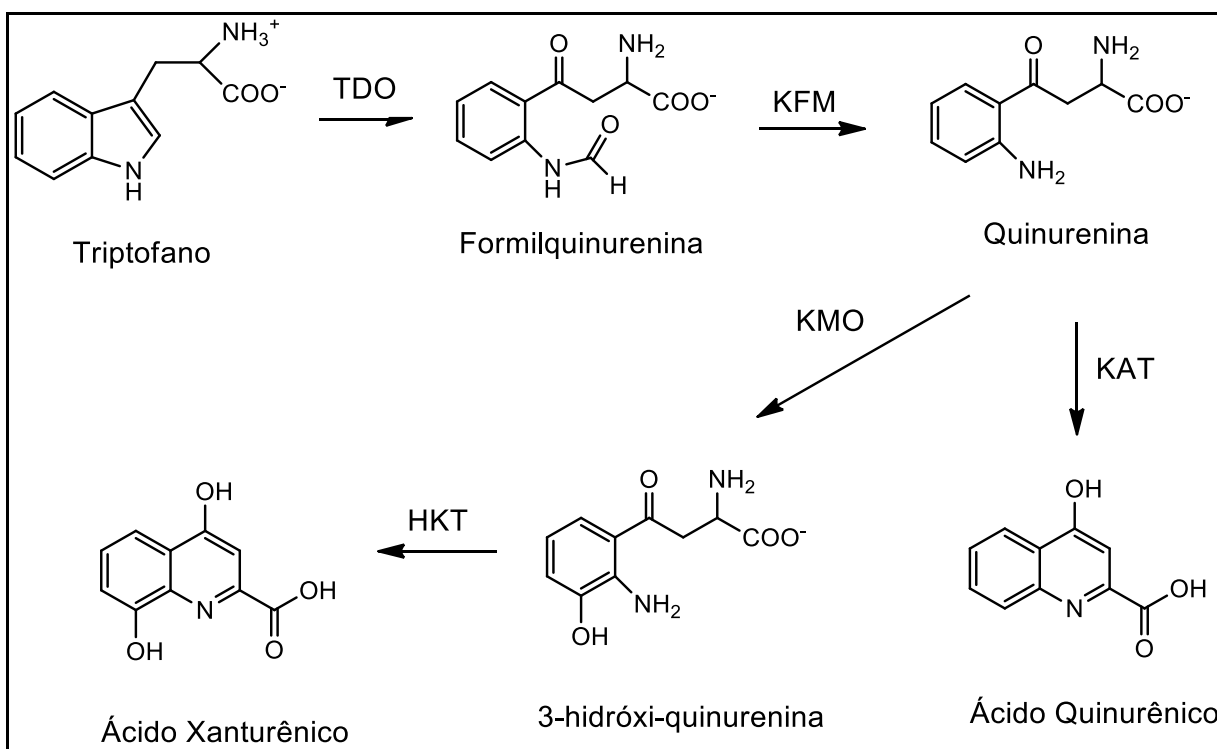
1.4. Via das quinureninas

A via das quinureninas é uma das vias metabólicas mais importantes na detoxificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.¹⁷ Esta é a maior via de metabolização do triptofano nos organismos vivos, em que o triptofano é oxidado a ácido quinolínico ou quinurênico ou ainda a ácido xanturênico, dependendo do organismo vivo estudado.¹⁸⁻²⁰ Em

mamíferos, estes ácidos podem ser transformados em dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NAD^+ , coenzima necessária na respiração celular).²¹⁻²⁴

Este trabalho tem como foco um intermediário da via das quinureninas, a 3-hidróxi-quinurenina. Esta substância, quando presente em quantidades maiores que as normais em humanos, está relacionada a doenças como esquizofrenia, mal de Parkinson e Alzheimer.^{20,24} Outros estudos indicam que o acúmulo deste intermediário metabólico nos insetos leva à sua oxidação espontânea a espécies reativas de oxigênio, provocando estresse oxidativo.^{19,24,25}

A 3-hidróxi-quinurenina (3-HK) é produzida a partir da quinurenina e leva à formação do ácido xanturênico. Este último metabólito é atóxico para o inseto, o que sugere que a reação é uma via de detoxificação da 3-HK nos mosquitos^{18,26-28} (Esquema 1).



Esquema 1 - Via das quinureninas em mosquitos. TDO: triptofano dioxigenase; KFM: quinurenina formamidase; KMO: quinurenina monooxigenase; KAT: quinurenina aminotransferase e HKT: 3-hidróxi-quinurenina transaminase.²⁶

Pesquisadores concluíram em estudos com *Anopheles ssp.* que o ácido xanturênico é essencial na reprodução sexual do *Plasmodium falciparum* no vetor.^{29,30} Assim, a inibição desta reação na via das quinureninas, gerando acúmulo de 3-HK e evitando a formação do ácido xanturênico seria nocivo ao metabolismo não só de *Aedes aegypti*, mas também dos mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores da malária.

Han e colaboradores observaram que a AeHKT (3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Aedes aegypti*) tem duas funções: a primeira é realizar a transaminação da 3-HK para formar o ácido xanturênico. A segunda é realizar a conversão do glioxilato à glicina.²⁸ Ainda foi observado que o mosquito possui dois tipos de alanina-glioxilato aminotransferases (AeHKT e AeAGT) e estas apresentam 46% de similaridade. Entretanto, somente a AeHKT consegue metabolizar a 3-HK.²⁵ A AeHKT tem sua sequência depositada no *GenBank*, mas ainda não há relatos de sua estrutura cristalográfica.

A AeHKT e a AnHKT (3-hidróxi-quinurenina transaminase de *Anopheles gambiae*) são ortólogas e possuem 73% de similaridade em suas sequências. A estrutura cristalográfica da AnHKT já é conhecida (*Protein Data Bank* 2CH1 e 2CH2)³¹, possibilitando estudos computacionais por homologia (Figura 6).

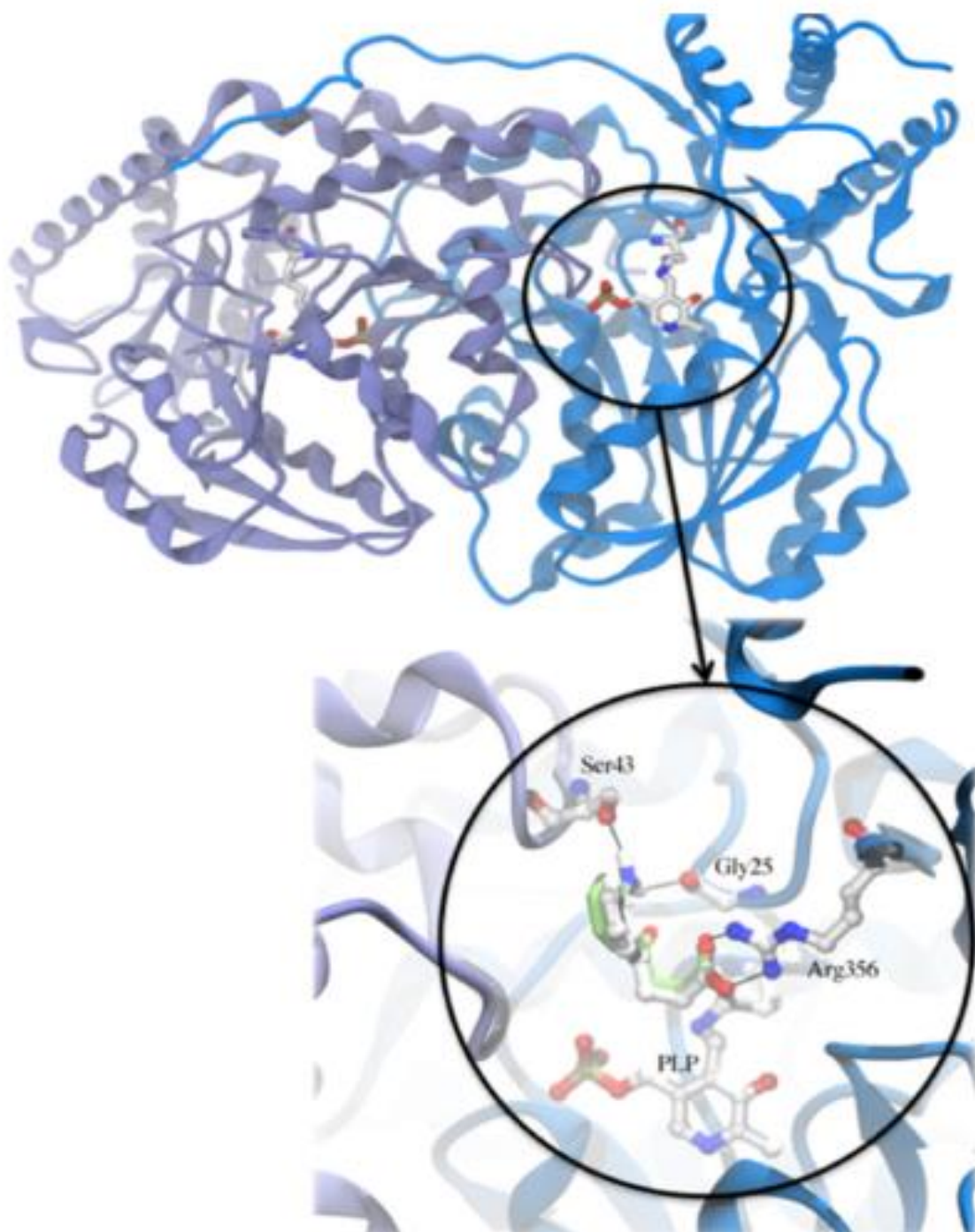


Figura 6 - Estrutura tridimensional da AnHKT, com ampliação em seu sítio ativo preenchido com um inibidor, o ácido 4-(2-aminofenil)-4-oxobutírico, na presença do cofator piridoxal-5-fosfato (PLP).³²

O inibidor testado na AnHKT é uma molécula similar ao substrato natural da enzima, exceto pela ausência de um grupo amina, justificando a ausência da transaminação.³¹ Sua estrutura é comparável à de ácidos 1,2,4-oxadiazólicos, por sua cadeia ácida e presença de

nitrogênio e oxigênio na molécula (Figura 7). Assim, esses compostos heterocíclicos foram testados por nosso grupo como prováveis inibidores da AeHKT.³²

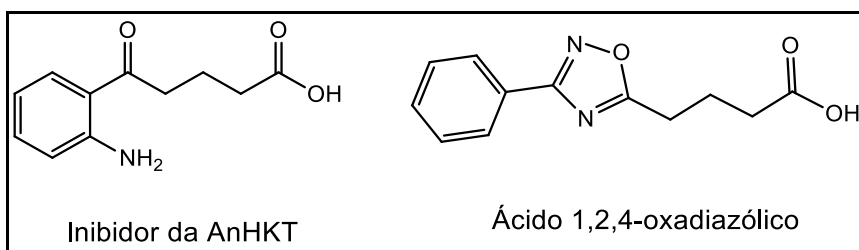


Figura 7 - Comparação estrutural entre o inibidor testado e o proposto por nosso grupo.

1.5. Os 1,2,4-Oxadiazóis

1,2,4-Oxadiazóis são compostos heterocíclicos de cinco membros, contendo um oxigênio na posição 1 e dois nitrogênios nas posições 2 e 4. Existem vários métodos de síntese desses compostos, como na reação de amidoximas e derivados de ácido, oxidação de um grupo imina e reação de sal de amidoximas com amidas.³³ Este anel é resistente à hidrólise e pode agir como bioisótero de grupos ésteres e amidas, o que o torna promissor para a substituição desses grupos em moléculas bioativas. Exemplos com atividade terapêutica são o Oxolamina, o Irrigor e o Libexin (Figura 8).

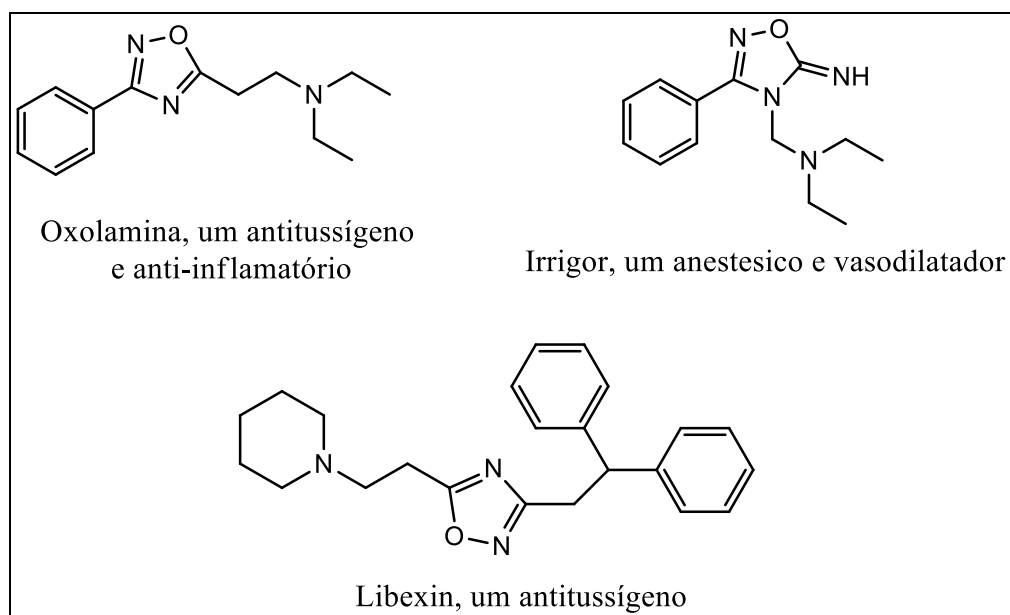


Figura 8- 1,2,4-Oxadiazóis utilizados na terapêutica.

Diante do interesse em obter moléculas inibidoras da atividade da HKT em *Aedes aegypti*, foram feitos estudos de Docking Molecular de várias séries de compostos sintetizados em laboratório. A partir destes resultados, foram feitos ensaios *in vivo* destes compostos em larvas de *Aedes aegypti*. Diferentes alterações de substituintes e tamanhos da cadeia lateral em C-5 foram testadas e observou-se que os 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-butanoatos de metila apresentaram maior atividade larvícida provavelmente pelo tamanho da cadeia lateral em C-5 e melhor lipofilicidade, facilitando a entrada da molécula no tecido larval. Efeitos diferenciados dos substituintes no anel aromático não foram observados nos cálculos computacionais, mas ácidos e ésteres contendo substituinte halogenado no anel aromático possuem valores menores de CL₅₀ (concentração da substância em que provoca a morte de 50% dos indivíduos expostos).³² Contudo, o uso de co-solventes para solubilizar os larvicidas foi necessário, pois são moléculas orgânicas insolúveis em água. Com essa observação, surgiu a necessidade de sintetizar moléculas que fossem mais facilmente solubilizadas em meio aquoso para entrar em contato com as larvas.

Portanto, a proposta deste trabalho é sintetizar sais sódicos de ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-butanóicos com variações na substituição do anel aromático, obter a AeHKT recombinante e avaliar as atividades inibidoras destes compostos na frente à enzima recombinante.

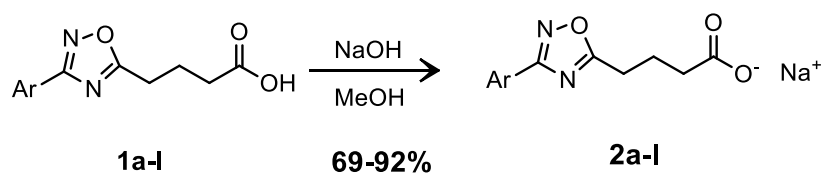
2 HIPÓTESE

A série de 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-butanoatos de sódio sintetizados consegue inibir a enzima HKT de *Aedes aegypti*, gerando acúmulo de 3-HK?

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese dos sais sódicos 1,2,4-oxadiazólicos

Após estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa,³² decidiu-se obter larvicidas 1,2,4-oxadiazólicos solúveis em água. Foram sintetizados sais sódicos derivados de ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-butanóicos (Esquema 2).



Ar			
a: Fenila	d: 4-Br-Fenila	g: 3-Toluíla	j: 4-I-Fenila
b: 4-Anisoíla	e: 4-NO ₂ -Fenila	h: α-Naftila	k: 4-Cl-Fenila
c: 3,4-diCl ₂ -Fenila	f: 4-Toluíla	i: 4-CF ₃ -Fenila	l: 3,4-Benzodioxolila

Esquema 2 - Síntese dos sais sódicos **2a-l** a partir dos ácidos **1a-l**

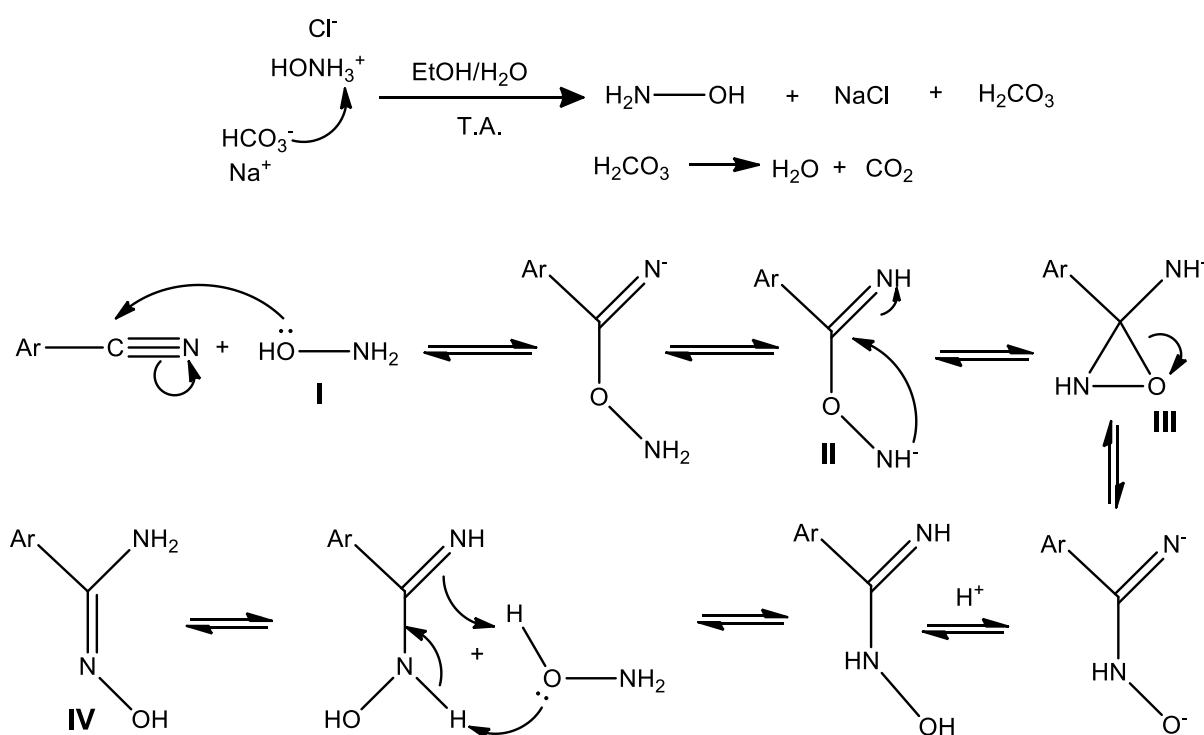
Os sais foram obtidos com rendimentos acima de 65% e recristalizados em clorofórmio (Tabela 1).

Tabela 1: Dados experimentais das substâncias **2a-l**

Substância	Rendimento (%)	P.F. (°C)
2^a	89	225-226
2b	91	243-244
2c	90	244-245
2d	92	285-286
2e	69	248-249
2f	79	243-244
2g	91	246-247
2h	83	244-246
2i	79	195-197
2j	90	277-278
2k	88	285-286
2l	89	277-278

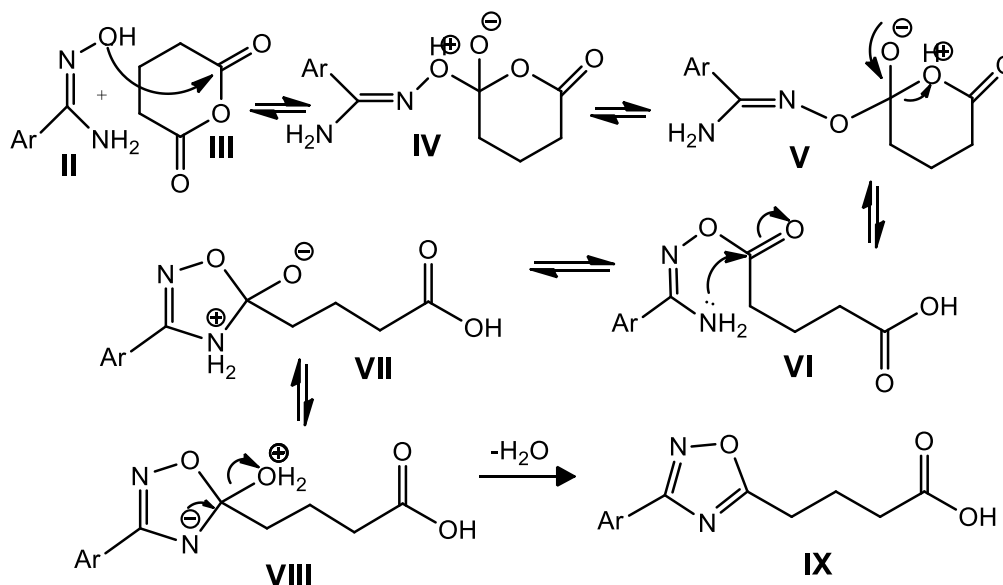
Estes sais foram obtidos a partir de amidoximas (Esquema 3) com seus respectivos substituintes, reagidas com anidrido glutárico para formar os ácidos 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il] butanóicos e depois desprotonados para formar os sais sódicos.

A hidroxilamina (**I**) é um nucleófilo ambidentado e possibilita dois tipos de ataques. Se for feito pelo átomo de oxigênio (base dura atacando ácido intermediário), a amida poderá ser formada (controle cinético). Contudo, o átomo de carbono atacado continua ácido, facilitando um ataque intramolecular pelo átomo de nitrogênio (**II**). O anel oxaziridínio formado é instável, clivando a ligação C-O (**III**) e formando a arilamidoxima (**IV**) (Esquema 3).³⁴



Esquema 3 - Mecanismo de formação de arilamidoximas a partir de arilnitrilas com hidroxilamina por ataque pelo oxigênio.

Após a síntese da amidoxima, a etapa seguinte foi sintetizar os ácidos butanóicos fundindo a amidoxima (**II**) com anidrido glutárico (**III**). O intermediário **IV** é formado, e em seguida ocorre uma transferência de hidrogênio (**V**) e a ciclização (**VI**), formando o anel 1,2,4-oxadiazólico (**VII**). Depois que a desidratação ocorre (**VIII**), o ácido final é formado (**IX**) (Esquema 4).



Esquema 4 - Mecanismo da síntese do ácido 4-[3-(aril)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-butanóico

3.2. Caracterização dos 4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)-butanoatos de sódio

Foram feitas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 1H , ^{13}C e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para os 12 compostos supracitados. Os dados que serão discutidos aqui se aplicam para o composto **2a**. Nos compostos restantes foram observados padrões espectroscópicos semelhantes.

No espectro de RMN de 1H obtido para a substância **2a**, observa-se um quinteto em 1,87 ppm com constante de acoplamento $J=7,6$ Hz relativo ao CH_2 do centro da cadeia lateral em C-5. Os outros dois sinais mais blindados, de deslocamentos químicos 2,15 ppm e 2,75 ppm (tripletos com $J=7,6$ Hz) são referentes aos metilenos ligados ao anel 1,2,4-oxadiazólico e ao grupo carboxilato, respectivamente. O multipletto no intervalo de 7,29-7,40 ppm é relativo a três hidrogênios na região aromática, reconhecidos pela integração do pico. Já no sinal em 7,61 ppm, é possível observar um duplo duplete com integração para dois hidrogênios, com $^2J=7,6$ Hz e $^3J=1,6$ Hz, característicos de hidrogênios com vizinhos *orto* e *meta* à sua posição (Figura 9).

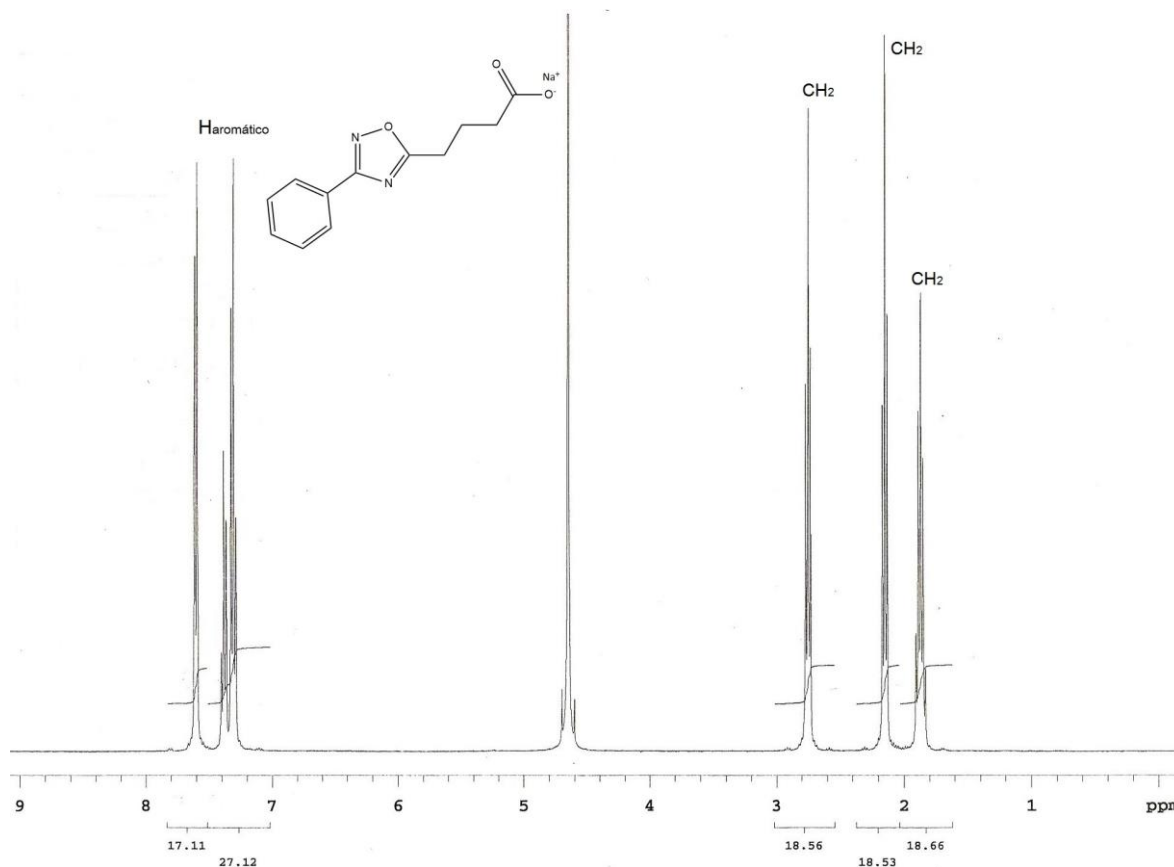


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) da substância **2a**.

No espectro de RMN de ^{13}C , os sinais estão bem definidos e cada um corresponde a um carbono, com exceção dos sinais de 129,6 ppm e 131,7 ppm, equivalentes a dois carbonos por causa da simetria do anel aromático. Os picos dos grupos metilenos são os de menor deslocamento químico, 25,3 ppm, 28,2 ppm e 39,2 ppm. Os sinais na região de 160 ppm são relativos aos carbonos do heterociclo e o sinal mais desblindado é referente ao carbono do grupo carboxilato (Figura 10).

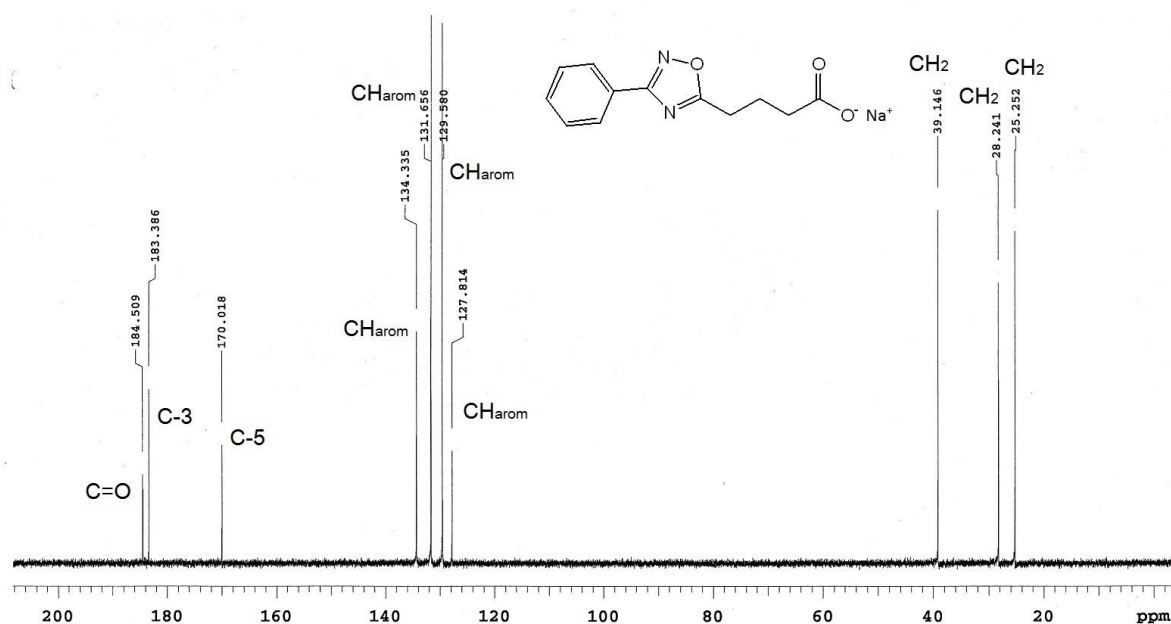


Figura 10 - Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) da substância **2a**.

Já no espectro de infravermelho, é possível identificar as bandas de estiramento C=O em 1545 cm⁻¹, estiramento C=N em 1475 cm⁻¹ e estiramento N-O em 1260 cm⁻¹, confirmando a presença dos grupos oxadiazol e carboxilato (Figura 11).

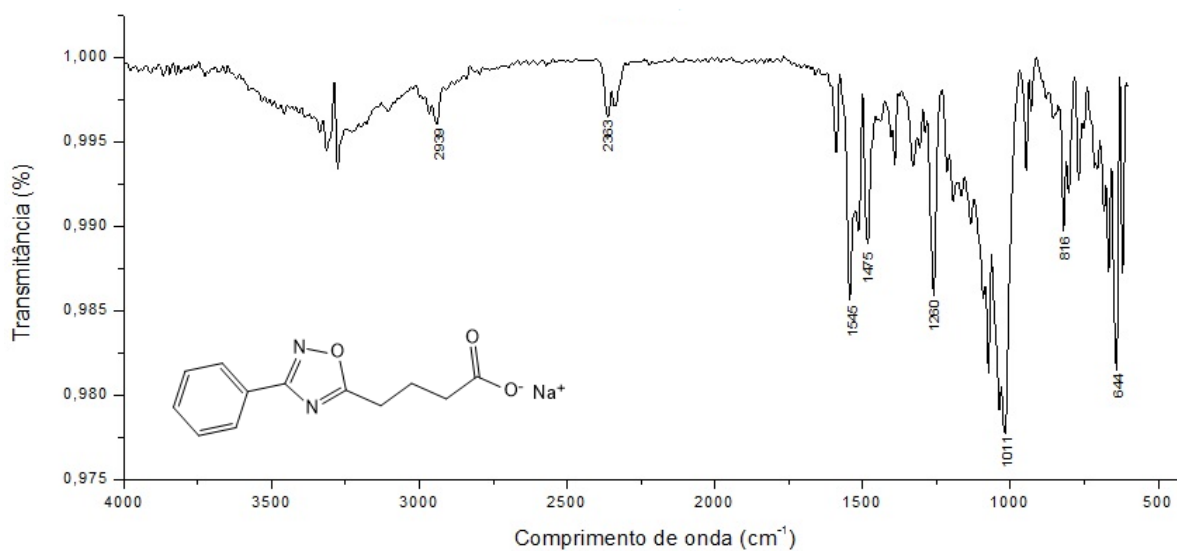


Figura 11 - Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) da substância **2a**.

3.3. Análise *in silico* da HKT

A sequência do mRNA da HKT de *Aedes aegypti* foi obtida no *GenBank* (número de acesso AF435806) e possui 1167 pares de bases. Oligonucleotídeos foram desenhados a partir dessa sequência e foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *XhoI* para realização da clonagem. A análise de íntrons e éxons não foi necessária, pois foi determinado que a clonagem se iniciaria pelo mRNA obtido por extração do RNA e não pelos genes a partir de DNA.

3.4. Amplificação do cDNA por RT-PCR

As reações de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foram realizadas a partir do RNA total extraído das larvas para obtenção do cDNA da HKT. Amostras do RNA da linhagem Reclab foram submetidas à reação e o fragmento de 1167 pares de bases foi amplificado, indicando a presença de mRNA no RNA total (Figura 12). Os fragmentos foram purificados, clonados em pGEM-T Easy e sequenciados para identificar e avaliar a integridade das sequências obtidas. Estas sequências clonadas foram traduzidas e alinhadas com a depositada no *GenBank* e foi observado um polimorfismo em todos os clones (Figura 13 e 14).

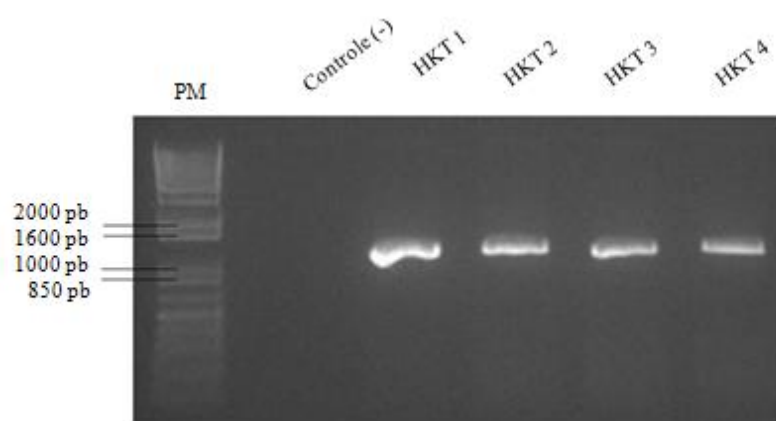


Figura 12 - Separação eletroforética em gel de agarose a 1% dos produtos de RT-PCR amplificados. A reação foi feita em quadruplicata (HKT 1-4). PM: 1 kb Plus Ladder.

Foram obtidos quatro construtos e destes foram selecionados o HKT1(pGEM-T Easy) e HKT2(pGEM-T Easy) para subclonagem em vetor de expressão procariótica pGEX4T₃.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>Aedes aegypti</i> 3hidroxykynurenine	N-	MKFTPPSSSL	RGPLVIPDKI	MMGPGPSNCS	KRVLAALNNT	CLSNFHDELF	QVIDEVKDL	RYIFQTENRT	TMCITGSAHT	GMEALLCNLL	EEGDIVLIAN
HKT1	N-	MKFTPPSSSL	RGPLVIPDKI	MMGPGPSNCS	KRVLAALNNT	CLSNFHDELF	QVIDEVKDL	RYIFQTENRT	TMCITGSAHT	GMEALLCNLL	EEGDIVLIAN
HKT2	N-	MKFTPPSSSL	RGPLVIPDKI	MMGPGPSNCS	KRVLAALNNT	CLSNFHDELF	QVIDEVKDL	RYIFQTENRT	TMCITGSAHT	GMEALLCNLL	EEGDIVLIAN
HKT3	N-	MKFTPPSSSL	RGPLVIPDKI	MMGPGPSNCS	KRVLAALNNT	CLSNFHDELF	QVIDEVKDL	RYIFQTENRT	TMCITGSAHT	GMEALLCNLL	EEGDIVLIAN
HKT4	N-	MKFTPPSSSL	RGPLVIPDKI	MMGPGPSNCS	KRVLAALNNT	CLSNFHDELF	QVIDEVKDL	RYIFQTENRT	TMCITGSAHT	GMEALLCNLL	EEGDIVLIAN
		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
<i>Aedes aegypti</i> 3hidroxykynurenine		NGIWAERAIN	MATRYGADV	VLEGPADKPF	SMTDFKKAIE	QHRPKCLFVV	HGDSSSGLLQ	PLEGLGKICH	DYDCLLLVDA	VASLCGVPFY	MDKWEIDGVY
HKT1		NGIWAERAIN	MATRYGADV	VLEGPADKPF	SMTDFKKAIE	QHRPKCLFVV	HGDSSSGLLQ	PLEGLGKICH	DYDCLLLVDA	VASLCGVPFY	MDKWEIDGVY
HKT2		NGIWAERAIN	MATRYGADV	VLEGPADKPF	SMTDFKKAIE	QHRPKCLFVV	HGDSSSGLLQ	PLEGLGKICH	DYDCLLLVDA	VASLCGVPFY	MDKWEIDGVY
HKT3		NGIWAERAIN	MATRYGADV	VLEGPADKPF	SMTDFKKAIE	QHRPKCLFVV	HGDSSSGLLQ	PLEGLGKICH	DYDCLLLVDA	VASLCGVPFY	MDKWEIDGVY
HKT4		NGIWAERAIN	MATRYGADV	VLEGPADKPF	SMTDFKKAIE	QHRPKCLFVV	HGDSSSGLLQ	PLEGLGKICH	DYDCLLLVDA	VASLCGVPFY	MDKWEIDGVY
		210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
<i>Aedes aegypti</i> 3hidroxykynurenine		TGSQKVLGAP	PGITPISISP	KALEVIRSRL	TPSKVFYDWL	LILGNYWGCV	DEQKRYHHTV	PSNLI FALRE	ATAQIAEEGL	EPVIRRRQEC	AEQMYRGLQA
HKT1		TGSQKVLGAP	PGITPISISP	KALEVIRSRL	TPSKVFYDWL	LILGNYWGCV	DEQKRYHHTV	PSNLI FALRE	ATAQIAEEGL	EPVIRRRQEC	AEQMYRGLQA
HKT2		TGSQKVLGAP	PGITPISISP	KALEVIRSRL	TPSKVFYDWL	LILGNYWGCV	DEQKRYHHTV	PSNLI FALRE	ATAQIAEEGL	EPVIRRRQEC	AEQMYRGLQA
HKT3		TGSQKVLGAP	PGITPISISP	KALEVIRSRL	TPSKVFYDWL	LILGNYWGCV	DEQKRYHHTV	PSNLI FALRE	ATAQIAEEGL	EPVIRRRQEC	AEQMYRGLQA
HKT4		TGSQKVLGAP	PGITPISISP	KALEVIRSRL	TPSKVFYDWL	LILGNYWGCV	DEQKRYHHTV	PSNLI FALRE	ATAQIAEEGL	EPVIRRRQEC	AEQMYRGLQA
		310	320	330	340	350	360	370	380		
<i>Aedes aegypti</i> 3hidroxykynurenine		MGLEIFVKDP	EYRLPTVTCT	MIPKGVNWWK	VSEYAMNNFS	LEIQGGFGPT	MGI AWRAGIM	G-ESSTLQ	LLSVCVQGIS	QSYPSGLRI	-C
HKT1		MGLEIFVKDP	EYRLPTVTCT	MIPKGVNWWK	VSEYAMNNFS	LEIQGGFGPT	MGI AWRAGIM	G-ESSTLQ	-----	-----	-C
HKT2		MGLEIFVKDP	EYRLPTVTCT	MIPKGVNWWK	VSEYAMNNFS	LEIQGGFGPT	MGI AWRAGIM	G-ESSTLQ	-----	-----	-C
HKT3		MGLEIFVKDP	EYRLPTVTCT	MIPKGVNWWK	VSEYAMNNFS	LEIQGGFGPT	MGI AWRAGIM	G-ESSTLQ	-----	-----	-C
HKT4		MGLEIFVKDP	EYRLPTVTCT	MIPKGVNWWK	VSEYAMNNFS	LEIQGGFGPT	MGI AWRAGIM	G-ESSTLQ	-----	-----	-C

Figura 13 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da HKT de *Aedes aegypti* depositada no *GenBank* (número de acesso AF435806) com as clonadas a partir de larvas de *Aedes aegypti* da linhagem Reclab.

Figura 14 - Alinhamento *online* realizado da sequência obtida em comparação com o banco de genes com 99% de similaridade. Somente dois nucleotídeos não estavam de acordo com a sequência base. A substituição em azul não foi prejudicial, porém a deleção da citosina modificou a fase de leitura, alterando os aminoácidos seguintes.

O polimorfismo observado no aminoácido 360 presente em todos os clones evidencia que esta é uma mutação da linhagem avaliada (Reclab). A deleção de uma citosina provocou uma mudança na fase de leitura, alterando os aminoácidos formados. Entretanto, a mutação está presente na porção C-terminal da sequência após os aminoácidos do sítio ativo (Ser-43; Gly-25 e Arg-356) e não alterou a atividade funcional da enzima e a fusão da GST para purificação.

3.5. Expressão da HKT recombinante

As cepas de *E. coli* transformadas com as construções HKT1(pGEX4T3) e HKT2(pGEX4T3) foram induzidas por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para a produção de suas respectivas proteínas recombinantes. A proteína HKT/GST apresentou um perfil de migração de 62 kDa, próximo ao predito de 69 kDa (43 kDa²⁸ da HKT e 26 kDa da GST) (Figura 15).

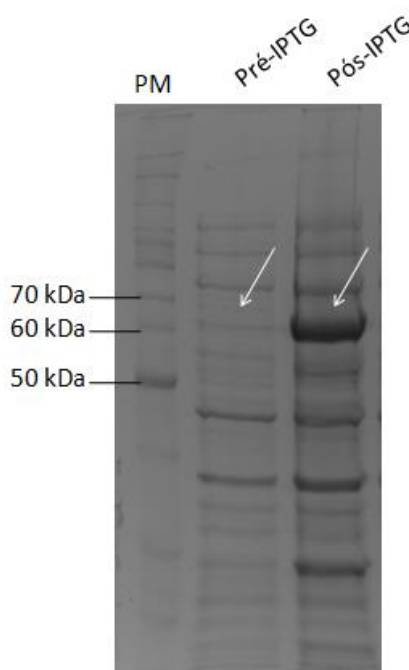


Figura 15 - Separação eletroforética de proteínas de cultura de *Escherichia coli*. Setas apontam a expressão da proteína recombinante HKT antes e após a indução por IPTG. SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. PM: Benchmark Protein Ladder® em kDa.

3.6. Purificação da HKT recombinante

Foi realizada uma purificação por cromatografia de afinidade da HKT fusionada à GST e a resina com Glutathiona imobilizada. Após a purificação e diálise das proteínas produzidas por *E. coli*, um SDS-PAGE 10% foi preparado para quantificar a proteína purificada comparando a intensidade da banda com uma curva de BSA (Figura 16). A proteína foi quantificada em 0,7 µg/µL.

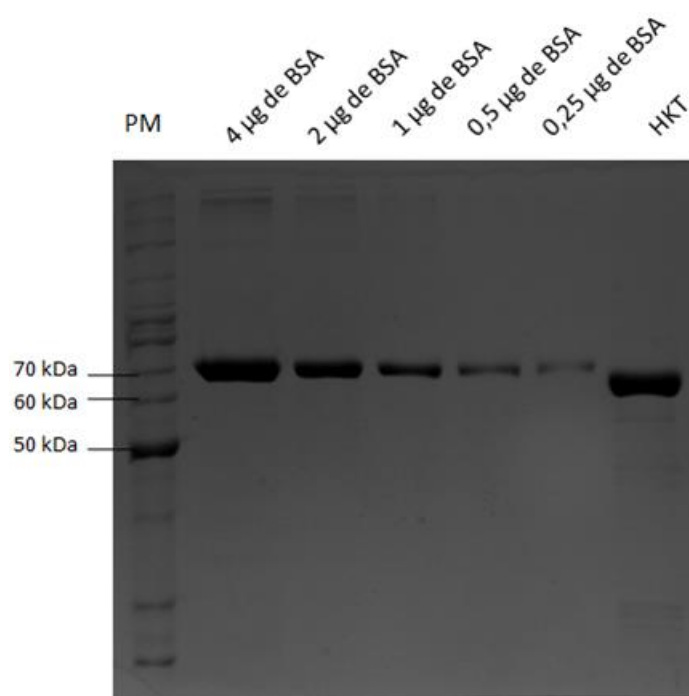
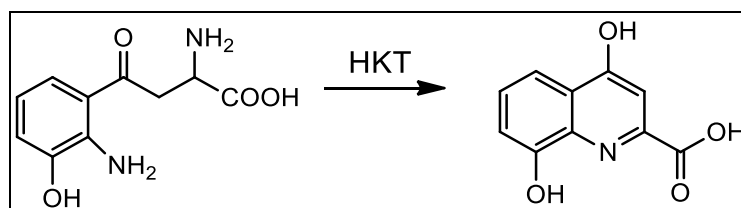


Figura 16 - Separação eletroforética de proteínas de uma amostra da HKT/GST purificada e dialisada. SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. PM: Benchmark Protein Ladder® em kDa.

3.7. Ensaios enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados com dois diferentes clones da proteína recombinante purificada. Este ensaio verificou a atividade funcional de clones diferentes da mesma enzima, permitindo a conversão de 3-HK a ácido xanturênico (AX) (Esquema 5).



Esquema 5 - Conversão da 3-hidróxiquinurenina em ácido xanturênico

Para tal, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia que permitisse avaliar a ação da HKT/GST. Esta metodologia foi desenvolvida por reação enzimática seguida da análise dos produtos dessa reação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A reação se processou utilizando a enzima HKT/GST, o substrato aminodoador (3-HK), o aminoceptor (piruvato sódico) e o cofator PLP em banho-maria a 50°C. A padronização do método foi feita de acordo com os parâmetros desenvolvidos (Tabela 2). A curva de calibração foi feita com 5 pontos e foi obtido um R^2 igual a 0,92.

Tabela 2 – Padronização do ensaio enzimático

Metabólito	Replicata	Área após a reação (mUA)	Média (mUA)	Desvio Padrão	Concentração
AX	1	4850,4	4878,4	55,8	5×10^{-8} mol
	2	4942,6			
	3	4842,1			
3-HK	1	22135,1	21709,9	440,0	5×10^{-8} mol
	2	21256,5			
	3	21738,1			

Os ensaios foram realizados em triplicata para as proteínas dos dois clones e a média foi usada para posterior análise de inibição (Tabela 3). Os dois clones foram testados e não houve diferenças no tempo de retenção dos picos, evidenciando que as duas proteínas recombinantes são funcionais (Figura 17).

Tabela 3 - Áreas dos picos de 3-HK e AX após a reação enzimática.

Clone testado	Metabólito	Área média após a reação (mUA)	Desvio padrão
HKT1/GST	3-HK	8512,5	549,6
	AX	5912,1	890,6
HKT2/GST	3-HK	9391,3	525,7
	AX	5459,4	506,5

O clone HKT2/GST foi usado nos ensaios de inibição enzimática e o substrato comercial utilizado é uma mistura dos dois isômeros (D e L). Por isso, ainda era detectado 3-HK após a reação pois o isômero L foi quase totalmente consumido e o isômero D é inócuo.

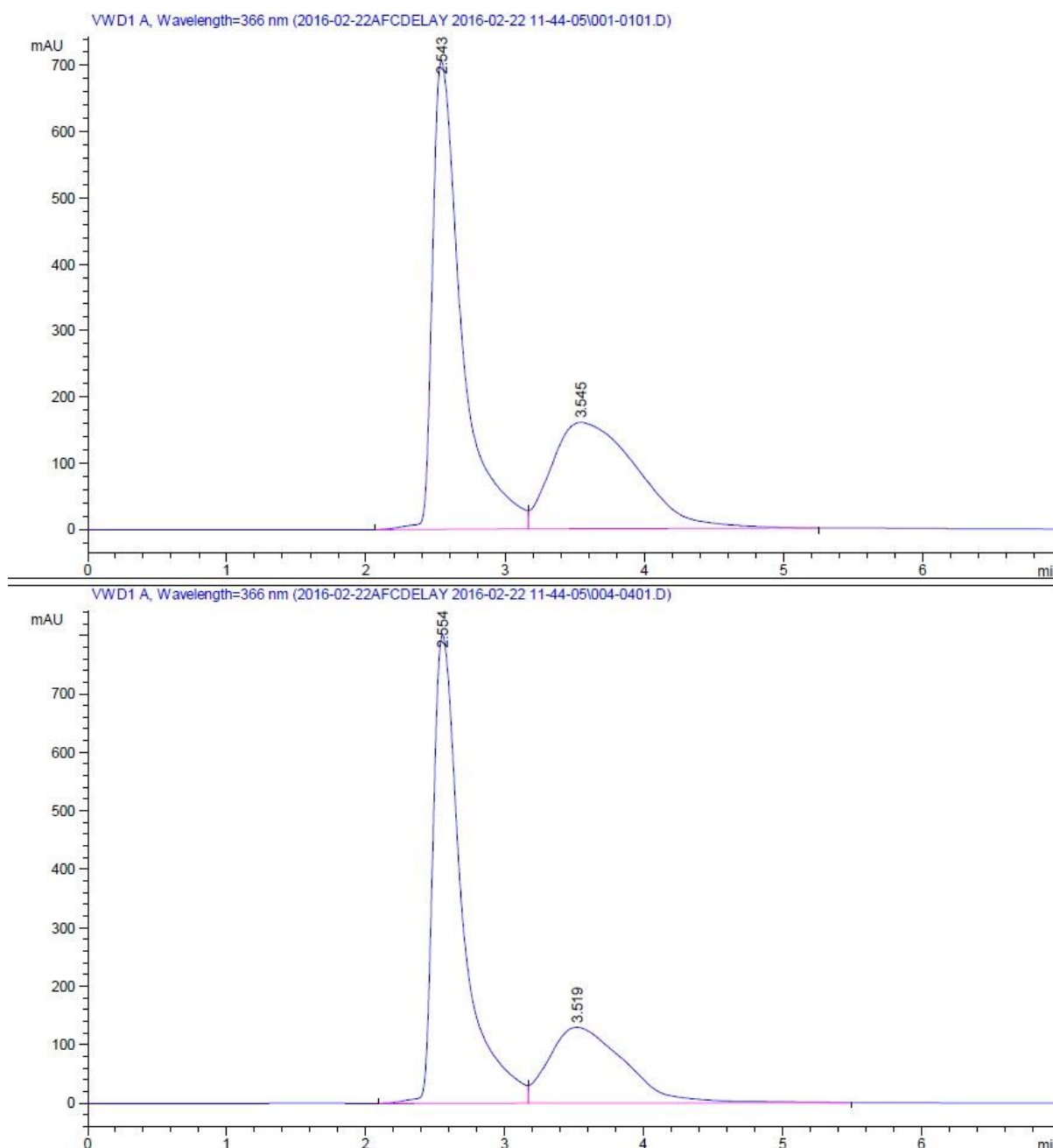


Figura 17 - Cromatogramas de uma das replicatas dos ensaios enzimáticos das enzimas HKT1/GST (superior) e HKT2/GST (inferior). O pico com tempo de retenção igual a 2,5 min é relativo ao 3-HK e o pico de 3,5 min é relativo ao ácido xanturênico.

Para verificar a atividade máxima da HKT/GST na conversão de 3-HK em AX, foram realizados ensaios com diferentes tempos na reação enzimática. Foi observado que mesmo que a área do AX aumentasse, a porcentagem do pico em relação à área total quantificada (picos do 3-HK e AX) era por volta de 40% e não ultrapassava esse valor. Assim, foi decidido usar uma quantidade de enzima e tempo de reação em que não houvesse gasto excessivo de enzima nem longos tempos de reação (Tabela 4).

Tabela 4 - Formação de ácido xanturênico na variação das quantidades de enzima e o tempo de reação.

Enzima (μg)	Tempo de reação (min)	Conversão (%)
0,7	5	2,6
	20	20,2
4,0	10	19,8
	15	43,1
	20	38,9
7,0	20	38,8
	60	35,1

3.8. Ensaios de inibição enzimática

Os 12 sais sintetizados foram testados em triplicata, adicionando 1 mM de suas soluções em tampão fosfato 200 mM pH 7 à reação enzimática. Todos os ensaios de inibição aumentaram a quantidade de 3-HK no meio reacional, corroborando com a hipótese do acúmulo de 3-HK e comprovando a inibição desses compostos. O aumento foi mensurado a partir da razão entre as áreas do pico de 3-HK da reação enzimática em relação à reação com cada inibidor. Isso significa que se a razão é mais próxima de 1, os valores são mais próximos e não há tanto acúmulo de 3-HK em relação à reação enzimática sem o inibidor (Tabela 5).

Tabela 5 – Acúmulo de 3-HK nos ensaios de inibição enzimática

Amostra	Área de 3-HK	Diferença entre as áreas	Razão entre as áreas
2a	13623,6	4232,3	0,689
2b	14626,5	5235,2	0,642
2c	12743,4	3332,0	0,737
2d	11724,1	1431,4	0,801
2e	10511,2	1119,9	0,893
2f	11655,4	2264,1	0,806
2g	12373,9	2982,6	0,759
2h	11981,8	2590,5	0,784
2i	10417,1	1025,8	0,902
2j	12154,6	2763,3	0,773
2k	13214,5	3823,2	0,711
2l	13270,2	3878,9	0,708

Os sais que provocaram o maior acúmulo de 3-HK foram os **2b** e **2a**, evidenciando que a substituição no anel aromático não aumenta a capacidade de inibição destes sais. Estes ensaios preliminares servirão como base para o estudo e desenvolvimento de novos protótipos moleculares capazes de inibir a enzima seletivamente.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A enzima HKT recombinante foi obtida com a finalidade de testar sua funcionalidade e a capacidade de inibição dos sais sintetizados. Durante o processo de clonagem, foi identificado um polimorfismo na sequência da HKT da linhagem de laboratório. Esta observação nos atenta a possibilidade de outros polimorfismos nas colônias em campo.

Para expressar a HKT recombinante, foi desenvolvido um protocolo de expressão em procarioto, que é um método mais rápido e eficiente de obtenção da enzima. Este é um método inédito de obtenção desta enzima.

Nos ensaios enzimáticos, foi observada a estereosseletividade da enzima, que converte somente o isômero L da 3-HK e o isômero D é inócuo e não teve atividade inibidora da enzima. Isso facilita os próximos testes, pois não há a necessidade de separação dos enantiômeros para avaliação funcional da enzima e dos prováveis inibidores.

Para a realização dos ensaios enzimáticos e de inibição, foi desenvolvido um método de quantificação dos metabólitos dessa reação via CLAE com detector UV.

A partir dos ensaios de inibição, foi possível concluir que os sais sintetizados são inibidores da enzima HKT recombinante obtida de *E. coli*, promovendo o acúmulo de 3-HK no meio reacional. Este é um metabólito tóxico para as larvas, o que provavelmente causaria a morte por estresse oxidativo.

Perspectivas

- Desenvolver protótipos moleculares que tenham maior atividade inibidora da enzima, gerando maior acúmulo de 3-HK;
- Obter a estrutura tridimensional da AeHKT para realizar estudos computacionais com a própria enzima em questão;
- Obter a HKT recombinante expressa em sistema eucarioto e avaliar a atividade em comparação com a expressa em procarioto.

5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1. Procedimentos gerais

Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos através dos fornecedores Aldrich®, Vetec®, Dinâmica®, Merck®, Invitrogen®, New England Biolabs®, Promega®, Affymetrix®, GE Healthcare Life Sciences® e QIAGEN®.

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando-se placas de sílica em suporte de alumínio contendo indicador fluorescente F₂₅₄ da marca Fluka®. Para a revelação das manchas utilizou-se lâmpada ultravioleta.

5.2. Equipamentos utilizados

Para a determinação dos pontos de fusão, foi utilizado o aparelho Electro-thermal modelo Mel-Temp analógico e os pontos de fusão dos compostos obtidos não são corrigidos. Para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C foi utilizado o instrumento Varian® UNMRS 400 MHz, utilizando como solventes clorofórmio deuterado e água deuterada. Para a obtenção dos espectros de infravermelho foi utilizado o espectrofotômetro FT-IR em pastilhas de KBr. Para a obtenção dos percentuais de análise elementar, foi utilizado o analisador elementar (CHNS-O), da marca CE instruments, modelo EA 1110.

Nas etapas de clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes foram utilizados o termociclador *T3 termocycler* da marca BIOMETRA®, uma centrífuga refrigerada 5810R da marca Eppendorf®, *shaker* Environ da marca Lab-line® e fontes de marcas Bio-Rad® e Amersham pharmacia biotech® para a eletroforese.

5.3. Síntese dos ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-butanóicos

As arilamidoximas foram sintetizadas de acordo com o método de Tiemann³⁵. Os demais reagentes foram obtidos comercialmente.

Procedimento geral para síntese dos ácidos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il)-butanóicos

Foram adicionados 30 mmol do anidrido glutárico (1,5 equivalentes) e 20 mmol da amidoxima correspondente em um balão médio. A reação seguiu em banho de óleo a 200 °C. Após aproximadamente uma hora de reação, verificou por CCD o consumo total da amidoxima. Quando a reação terminou, foram adicionados 10 mL de solução de bicarbonato de sódio saturado e 10 mL de diclorometano. A extração foi realizada *overnight* sob agitação

magnética. No dia seguinte, as fases foram separadas e foi adicionado ácido cítrico anidro à fase aquosa até pH ácido. A solução foi transferida para um funil de separação e foram realizadas extrações com diclorometano (3 x 20 mL). As alíquotas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O sólido foi recristalizado com uma mistura de clorofórmio e hexano.

Ácido 4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanóico (a): cristais incolores; rendimento: 95%; R_f : 0,27 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 100-103°C; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,22 (q; 2H; $J=7,2$ Hz; 7,6 Hz; CH_2); 2,56 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 3,05 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 7,45-7,51 (m, 3H, $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,06 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 2,4 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 21,3; 25,6; 32,7; 126,7; 127,4; 128,8; 131,2; 168,3; 178,3; 178,9. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1581,49 (C=N); 1704,56 (C=O); 2972,72 (C- $\text{H}_{\text{aromático}}$). Análise Elementar Calculada: C, 62.1; H, 5.2; N, 12.1. Análise Elementar Encontrada: C, 61.2; H, 4.8; N, 11.7.

Ácido 4-[3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (b): cristais amarelos; rendimento: 56%; R_f : 0,27 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 79 – 83 °C; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,2 (q; 2H; $J=7,6$ Hz; 7,2 Hz; CH_2); 2,55 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 3,03 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 3,85 (s; 3H; CH_3); 6,97 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,99 (d, 2H; $J=8,8$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm): 21,4; 25,6; 32,7; 55,4; 114,3; 119,1; 129,0; 161,9; 167,9; 178,4; 178,8. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1601,13 (C=N); 1709,52(C=O); 2964,78 (C- $\text{H}_{\text{aromático}}$). Análise Elementar Calculada: C, 59.5; H, 5.4; N, 10.7. Análise Elementar Encontrada: C, 59.1; H, 5.0; N, 10.4.

Ácido 4-[3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (c): cristais incolores; rendimento: 69%; R_f : 0,23 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 80 – 85 °C; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,22 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,57 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 3,05 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,55 (d; 1H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,90 (d; 1H; $J=8,4\text{Hz}$; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,17 (s; 1H; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 10,36 (s; 1H; OH). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 21,2; 25,6; 32,8; 126,4; 126,6; 129,3; 131,0; 133,3; 135,5; 166,7; 178,5; 179,4. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1593,70 (C=N); 1705,63(C=O); 2954,95 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 47.9; H, 3.4; N, 9.3. Análise Elementar Encontrada: C, 55.3; H, 4.3; N, 10.0.

Ácido 4-[3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (d): cristais incolores; rendimento: 89%; R_f : 0,22 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 214 - 220°C; RMN de ^1H (CDCl_3 ,

400 MHz) δ (ppm): 1,25 (s; 1H; OH); 2,22 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH₂); 2,57 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH₂); 3,05 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH₂); 7,61 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; H_{aromático}); 7,94 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; H_{aromático}). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 21,4; 25,6; 32,8; 125,7; 128,1; 128,9; 131,7; 131,9; 132,1; 178,1. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1581,73 (C=N); 1681,73(C=O); 2971,86 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 46.3; H, 3.6; N, 9.0. Análise Elementar Encontrada: C, 46.3; H, 3.4; N, 8.6.

Ácido 4-[3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (e): cristais amarelos; rendimento: 61%; R_f: 0,14 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 111-114°C; RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2,24 (q, 2H, $J=7,2$ Hz, 7,2 Hz; CH₂); 2,59 (t; 2H, $J=7,2$ Hz, CH₂); 3,09 (t; 2H, $J=7,2$ Hz, CH₂); 8,26 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; H_{aromático}); 8,34 (d; 2H; $J=8,8$ Hz, H_{aromático}). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 21,3; 25,6; 32,6; 124,1; 128,4; 132,6; 149,5; 166,8; 178,0, 179,8. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1712,77 (C=O) 2951,96 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 52.0; H, 4.0; N, 15.2. Análise Elementar Encontrada: C, 51.9; H, 3.8; N, 14.6.

Ácido 4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanóico (f): cristais incolores; rendimento: 68%; R_f: 0,32 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 57 - 60°C. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2,21 (q; 2H; $J=7,6$ Hz; 7,2 Hz; CH₂); 2,41(s; 3H; CH₃); 2,56 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH₂) 3,04 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH₂) 7,28 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; H_{aromático}); 7,95 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; H_{aromático}). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 21,4; 21,5; 25,6; 32,7; 123,8; 127,3; 129,5; 141,5; 168,3; 178,1; 178,7. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1719,48 (C=O) 2952,63 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 63.4; H, 5.7; N, 11.4. Análise Elementar Encontrada: C, 64.0; H, 5.0; N, 12.5.

Ácido 4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanóico (g): cristais incolores; rendimento: 68%; R_f: 0,32 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 89-92°C. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 2,21 (q; 2H; $J=7,2$ Hz; 7,6 Hz; CH₂); 2,42 (s; 3H, CH₃); 2,55 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH₂); 3,04 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH₂); 7,26-7,38 (m, 2H, H_{aromático}); 7,86 (d; 1H; $J=8,4$ Hz, H_{aromático}); 7,89 (s,1H, H_{aromático}); 10,75 (s,1H,OH). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 21,3; 21,4; 25,6; 32,7; 124,5; 126,5; 127,9; 128,7; 131,9; 138,6; 168,3; 178,5; 178,8. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1577,53 (C=N); 1686,02 (C=O); 2663,60 (C-H); 3029,11 (O-H). Análise Elementar Calculada: C, 63.4; H, 5.7; N, 11.4. Análise Elementar Encontrada: C, 63.1; H, 5.5; N, 11.3.

Ácido 4-[3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (h): cristais rosas; rendimento: 57%; R_f: 0,21 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 94-96°C. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz)

δ (ppm): 2,13 (q; 2H; $J=7,2$ Hz; 7,6 Hz; CH_2); 2,56 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,98 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,42-7,53 (m, 3H, $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,83 (dd; 2H; $J=8,0$ Hz, 8,4 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,13 (dd; 1H, $J=0,8$ Hz, 1,2 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,78 (d; 1H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 21,3; 25,6; 32,7; 123,7; 125,0; 126,2; 126,3; 127,6; 128,6; 129,3; 130,5; 131,8; 133,8; 168,6; 177,9; 178,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1580,99 (C=N); 1711,55 (C=O); 2918,89 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 68.1; H, 5.0; N, 9.9. Análise Elementar Encontrada: C, 64.8; H, 4.4; N, 8.9.

Ácido 4-[3-(4-trifluorometil-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (i): cristais incolores; rendimento: 46%; R_f : 0,22 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 75-78°C. RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,23 (q, 2H, $J=7,2$ Hz; 7,6 Hz, CH_2); 2,57 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, CH_2); 3,07 (t, 2H, $J=7,6$ Hz, CH_2); 7,74 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,19 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, $\text{H}_{\text{aromático}}$); 10,40 (s, 1H, OH). I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1565,06 (C=N); 1723,28 (C=O); 2964,39 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 52.0; H, 3.7; N, 9.3. Análise Elementar Encontrada: C, 52.2; H, 3.4; N, 8.9.

Ácido 4-[3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (j): cristais amarelos, rendimento: 25%; R_f : 0,27 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 86-90°C; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,21 (q, 2H, $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz, CH_2); 2,56 (t, 2H, $J=7,2$ Hz, CH_2); 3,05 (t, 2H, $J=7,6$ Hz, CH_2); 7,75-7,84 (m, 4H, $\text{H}_{\text{aromático}}$). I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1590,24 (C=N); 1695,87 (C=O); 2940,89 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 40.2; H, 3.1; N, 7.8. Análise Elementar Encontrada: C, 40.3; H, 2.8; N, 7.3.

Ácido 4-[3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (k): cristais incolores; rendimento: 72%; R_f : 0,32 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 86-89°C. RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,22 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,56 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 3,05 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,45 (ddd, 2H, $J=2,0$ Hz, 8,4 Hz, 2,4 Hz, 1,5 Hz, $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,00 (ddd, 2H, $J=2,0$ Hz, 8,4 Hz, 2,4 Hz, 1,5 Hz, $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 21,3; 25,6; 32,7; 125,2; 128,7; 129,2; 137,3; 167,5; 178,5; 179,1. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1596,78 (C=N); 1697,30 (C=O); 2942,56 (C-H). Análise Elementar Calculada: C, 54.1; H, 4.2; N, 10.5. Análise Elementar Encontrada: C, 59.9; H, 4.7; N, 10.4.

Ácido 4-[3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il]butanóico (l): cristais incolores; rendimento: 60%; R_f : 0,25 (7:3, hexano: acetato v/v); P.F.: 112-115°C; RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2,21 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 6,8 Hz; CH_2); 2,56 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 3,03 (t; 2H; $J=6,8$ Hz; CH_2); 6,03 (s; 2H; CH_2); 6,89 (d; 1H; $J=8,4$ Hz, 1,6 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,51 (d; 1H;

$J=1,6$ Hz; $H_{\text{aromático}}$); 7,63 (dd; 1H; $J=8,4$ Hz, $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 21,4; 25,6; 32,6; 101,6; 107,5; 108,6; 120,6; 122,3; 148,1; 150,1; 167,9; 177,8; 178,7. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1570, 76($\text{C}=\text{N}$); 1705,79($\text{C}=\text{O}$); 2909,68 ($\text{C}-\text{H}$); 3065,36 ($\text{O}-\text{H}$). Análise Elementar Calculada: C, 56.5; H, 4.4; N, 10.1. Análise Elementar Encontrada: C, 56.4; H, 4.0; N, 9.6.

5.4. Síntese dos 3-(3-aril-1,2,4-oxadiazol-5-il) butanoatos de sódio

Preparou-se uma solução-mãe de NaOH 1% em metanol (m/v) no dia do experimento. Em um balão pequeno, foram adicionados 0,8 mmol de ácido 4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanóico (1 equivalente) e 3,2 mL da solução-mãe de NaOH 1% (1 equivalente) e deixou sob agitação com barra magnética por 1 hora. Após esse tempo, evaporou-se o metanol em rotaevaporador e o produto foi seco durante uma hora em bomba de alto vácuo. A recristalização foi realizada em clorofórmio.

4-(3-fenil-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (a): sólido branco; rendimento: 89 %; P.F.: 225-226°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,87 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,15 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,75 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,29-7,40 (m; 3H; $H_{\text{aromático}}$); 7,61 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 1,6 Hz; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,2; 39,2; 127,8; 129,6; 131,7; 134,3; 170,0; 183,4; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1545 ($\text{C}=\text{O}$); 1475 ($\text{C}=\text{N}$); 1260 ($\text{N}-\text{O}$). Análise Elementar Calculada: C, 56.70; H, 4.36; N, 11.02; Na, 9.04; O, 18.88. Análise Elementar Encontrada: C, 55.93; H, 4.18; N, 10,70.

4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (b): sólido branco; rendimento: 91%; P.F.: 243-244°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,88 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,17 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,76 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 3,65 (s; 3H; CH_3); 6,74 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; $H_{\text{aromático}}$); 7,46 (d; 2H; $J=8,8$ Hz; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,2; 39,2; 57,9; 116,8; 120,4; 131,3; 163,9; 169,6; 183,1; 184,4. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1545 ($\text{C}=\text{O}$); 1487 ($\text{C}=\text{N}$); 1259 ($\text{N}-\text{O}$). Análise Elementar Calculada: C, 54.93; H, 4.61; N, 9.86; Na, 8.09; O, 22.52. Análise Elementar Encontrada: C, 53.88; H, 4.66; N, 9.52.

4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (c): sólido branco; rendimento: 90%; P.F.: 244-245°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,97 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,21 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,91 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,36 (d; 1H; $J=$

8,8 Hz; $H_{\text{aromático}}$); 7,46 (dd; 1H; $J = 8,8$ Hz, 2,0 Hz; $H_{\text{aromático}}$); 7,62 (d; 1H; $J = 2,0$ Hz; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 127,9; 129,0; 131,1; 133,6; 135,1; 137,7; 168,4; 184,0; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1550 (C=O); 1478 (C=N); 1258 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 44.61; H, 2.81; Cl, 21.95; N, 8.67; Na, 7.12; O, 14.86. Análise Elementar Encontrada: C, 43.77; H, 2.78; N, 8.40.

4-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (d): sólido branco; rendimento: 92%; P.F.: 285-286°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,93 (q; 2H; $J = 7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,19 (t; 2H; $J = 7,2$ Hz; CH_2); 2,86 (t; 2H; $J = 7,6$ Hz; CH_2); 7,36 (d; 2H; $J = 8,4$ Hz; $H_{\text{aromático}}$); 7,42 (d; 2H; $J = 8,4$ Hz; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,2; 126,8; 128,2; 131,1; 134,6; 169,4; 183,7; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1543 (C=O); 1478 (C=N); 1263 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 43.27; H, 3.03; Br, 23.99; N, 8.41; Na, 6.90; O, 14.41. Análise Elementar Encontrada: C, 42.53; H, 2.98; N, 8.09.

4-(3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (e): sólido branco; rendimento: 79%; P.F.: 243-244°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,99 (q; 2H; $J = 7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,21 (t; 2H; $J = 7,6$ Hz; CH_2); 2,94 (t; 2H; $J = 7,2$ Hz; CH_2); 7,97 (d; 2H; $J = 8,8$ Hz; $H_{\text{aromático}}$); 8,19 (d; 2H; $J = 8,8$ Hz; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 126,9; 131,0; 134,4; 151,8; 169,0; 184,3; 184,6. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 (C=O); 1482 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 48.17; H, 3.37; N, 14.04; Na, 7.68; O, 26.74. Análise Elementar Encontrada: C, 46.19; H, 3.79; N, 12.76.

4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (f): sólido branco; rendimento: 91%; P.F.: 246-247°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,90 (q; 2H; $J = 8,0$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,16 (t; 2H; $J = 7,6$ Hz; CH_2); 2,22 (s, 1H, CH_3); 2,80 (t; 2H; $J = 8,0$ Hz; CH_2); 7,16 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz; $H_{\text{aromático}}$); 7,56 (d; 2H; $J = 8,0$ Hz; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 23,2; 25,3; 28,2; 39,1; 125,0; 129,7; 132,3; 145,3; 170,1; 183,4; 184,6. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 (C=O); 1482 (C=N); 1330 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 58.21; H, 4.88; N, 10.44; Na, 8.57; O, 17.89. Análise Elementar Encontrada: C, 57.53; H, 4.57; N, 10.06.

4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (g): sólido branco; rendimento: 83%; P.F.: 244-245°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,91 (q; 2H; $J = 7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,18 (t; 2H; $J = 7,2$ Hz; CH_2); 2,22 (s, 1H, CH_3); 2,82 (t; 2H; $J = 7,6$ Hz; CH_2); 7,51 - 7,24 (m; 4H; $H_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 23,0; 25,2; 28,2; 38,9; 126,7; 127,9; 130,1; 131,6; 135,0; 141,9; 170,2; 183,4; 184,3. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 (C=O); 1482

(C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 58.21; H, 4.88; N, 10.44; Na, 8.57; O, 17.89. Análise Elementar Encontrada: C, 56.58; H, 4.69; N, 9.70.

4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (h): sólido branco; rendimento: 79%; P.F.: 195-197°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,80 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 8,0 Hz; CH_2); 2,11 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,67 (t; 2H; $J=8,0$ Hz; CH_2); 7,16 – 7,25 (m; 4H; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,54 (dd; 2H; $J=7,2$ Hz, $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 8,08 (d; 1H; $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,1; 28,1; 38,9; 124,9; 127,6; 127,6; 129,0; 130,0; 131,1; 131,5; 132,3; 134,4; 135,9; 170,0; 182,3; 184,2. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 (C=O); 1477 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 63.16; H, 4.31; N, 9.21; Na, 7.56; O, 15.77. Análise Elementar Encontrada: C, 60.94; H, 4.19; N, 8.68.

4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (i): sólido branco; rendimento: 90%; P.F.: 277-278°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,95 (q; 2H; $J=7,2$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,19 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,88 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,60 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,79 (d; 2H; $J=8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 124,9; 127,6; 128,5; 128,6; 130,1; 131,5; 134,7; 135,1; 169,3; 184,0; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 (C=O); 1482 (C=N); 1261 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 48.46; H, 3.13; F, 17.69; N, 8.69; Na, 7.13; O, 14.90. Análise Elementar Encontrada: C, 46.24; H, 3.09; N, 8.34.

4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (j): sólido branco; rendimento: 88%; P.F.: 285-286°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,96 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,6 Hz; CH_2); 2,20 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,90 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,40 (d; 2H; $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,68 (d; 2H; $J=7,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 100,6; 127,5; 131,1; 140,8; 169,7; 183,8; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1541 (C=O); 1472 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 37.92; H, 2.65; I, 33.39; N, 7.37; Na, 6.05; O, 12.63. Análise Elementar Encontrada: C, 37.88; H, 2.85; N, 7.37.

4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (k): sólido branco; rendimento: 89%; P.F.: 277-278°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,96 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,19 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 2,89 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 7,39 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 2,0 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,67 (dd; 2H; $J=7,6$ Hz, 2,0 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,3; 39,1; 126,7; 131,2; 131,8; 139,8; 169,5; 183,8; 184,6. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 (C=O); 1477 (C=N); 1257 (N-O). Análise Elementar Calculada: C, 49.93; H, 3.49; Cl, 12.28; N, 9.70; Na, 7.96; O, 16.63. Análise Elementar Encontrada: C, 48.29; H, 3.33; N, 9.23.

4-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio (I): sólido branco; rendimento: 87%; P.F.: 257-259°C; RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: 1,92 (q; 2H; $J=7,6$ Hz, 7,2 Hz; CH_2); 2,18 (t; 2H; $J=7,6$ Hz; CH_2); 2,83 (t; 2H; $J=7,2$ Hz; CH_2); 5,87(s, 2H, CH_2); 6,73 (d; 1H; $J= 8,4$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,03 (d; 1H; $J= 1,6$ Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$); 7,20 (dd; 1H; $J= 8,4$ Hz, 1,6 Hz; $\text{H}_{\text{aromático}}$). RMN de ^{13}C (D_2O) $\delta(\text{ppm})$: 25,3; 28,2; 39,1; 104,5; 109,4; 111,3; 121,7; 124,9; 150,2; 152, 5; 169,7; 183,3; 184,5. I.V. (pastilha de KBr) $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1546 ($\text{C}=\text{O}$); 1477 ($\text{C}=\text{N}$); 1257 ($\text{N}-\text{O}$) Análise Elementar Calculada: C, 52.36; H, 3.72; N, 9.39; Na, 7.71; O, 26.82. Análise Elementar Encontrada: C, 51.26; H, 3,70; N, 9.26.

5.5. Clonagem da HKT para expressão heteróloga

5.5.1. Colônias de *Aedes aegypti*

As duas linhagens de *Aedes aegypti* (Reclab, origem de Recife- PE, e Rockefeller) mantidas no insetário do CPqAM/FIOCRUZ – PE, foram utilizadas para a obtenção do material genético. Os adultos foram mantidos a 26 ± 1 °C, em umidade relativa de 65 a 85% e fotoperíodo de 12:12 h dia/noite. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose 10% e as fêmeas foram alimentadas artificialmente com sangue de coelhos Nova Zelândia. As larvas foram mantidas em água decolorada e alimentadas com ração para gatos.

Para a realização do experimento, 20 larvas em estágio L_4 foram coletadas, lavadas com água destilada e mantidas em gelo para realizar a extração do RNA.

5.5.2. Extração do RNA

O RNA das larvas foi extraído de acordo com Romão e colaboradores.³⁶ Amostras de 500 μL de Trizol e 200 μL de clorofórmio foram adicionados aos microtubos contendo as larvas maceradas. O RNA foi precipitado com 300 μL de isopropanol gelado e lavado com 200 μL de etanol 75%. Depois, o sedimento foi ressuspenso com 30 μL de água ultrapura e estocado a -80 °C. A quantificação foi realizada por espectrofotometria em NanoDrop® 2000 com comprimento de onda de 260 nm.

Após a extração do RNA, foi realizado o tratamento do RNA total com a enzima rDNase I, RNase-Free (Affymetrix®) para descartar contaminantes de DNA. Assim, 4 μg (8 μL) do RNA total foram tratados com 10 U da rDNase e 1 μL do tampão de reação 10x (400 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2). Após a incubação a temperatura ambiente por 15 minutos, foi adicionado 1 μL da solução de término da reação (50mM EDTA, pH 8.0) e incubou o microtubo a 65 °C em termociclador por 10 minutos.

5.5.3. Transcrição Reversa seguida da Reação em cadeia da Polimerase (RT-PCR)

A transcrição reversa foi realizada com o kit *Cloned AMV First-Strand Synthesis* (Invitrogen®). Para cada 5 µL do RNA tratado, foram adicionados em um microtubo 1 µL de oligo dT 50 mM, 2 µL de dNTP 10 mM e água ultrapura para completar o volume de reação para 14 µL. A amostra foi incubada a 65 °C por 5 minutos, colocada em gelo para dar choque término e imediatamente foram adicionados 40 U de RNase out, 4 µL do tampão de reação 5x e 15 U da enzima AMV Transcriptase Reversa. A reação foi incubada em banho-maria a 37 °C por uma hora e após o término, colocadas em gelo.

Alíquotas de 5 µL do cDNA recém-sintetizado foram transferidas para novos microtubos e submetidas à PCR com o par de oligonucleotídeos para ligação no vetor pGEX4T₃, plasmídeo usado para expressão em células procarióticas (Tabela 6). Assim, 1 µL de dNTP 10 mM, 2,5 µL de tampão de reação da Platinum® *Taq* DNA Polimerase High Fidelity 10x, 3 U da Platinum® *Taq* DNA Polimerase High Fidelity, 1 µL de cada oligonucleotídeo a 10 mM, 1 µL de MgSO₄ 50 mM e 13 µL de água ultrapura foram adicionados ao tubo contendo o cDNA. Um controle negativo foi preparado, substituindo o cDNA por água ultrapura. A amplificação foi realizada no termociclador T3 termocycle (BIOMETRA®) e seguiu com a primeira desnaturação a 94 °C por 3 min, 34 ciclos de 94 °C por 50 seg para desnaturação, 60 °C por 1 min para anelamento e 72 °C por 50 seg para extensão. Após os ciclos, houve a extensão final de 72 °C por 10 min.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos desenhados a partir da sequência do *GenBank* n° AF435806.1 para amplificação da proteína HKT de *Aedes aegypti*. As letras em negrito indicam sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Xho*I.

Oligonucleotídeo	Sequência
HKT 1F pGEX <i>Bam</i> HI	5'-CAC GGA TCC ATG AAA TTT ACC CCG CCG-3'
HKT 1R pGEX <i>Xho</i> I	5'-CAC CTC GAG AAT ACG TAA TCC GGA TGG GTA GCT TTG-3'

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,05% (Tris 8,9 mM; ácido bórico 8,9 mM; EDTA 2 mM) corado com brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada a 120V, 100W, 100mA e 45 minutos de corrida. As bandas de interesse foram visualizadas em transluminador com luz ultravioleta, cortadas com lâmina

estéril e purificadas com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences®) conforme a metodologia descrita no kit.

5.5.4. Clonagem no pGEM-T Easy

As reações de PCR foram conduzidas por uma enzima capaz de inserir uma cauda de adenina nas extremidades dos insertos amplificados. Esta extremidade possibilita a ligação do inserto no vetor pGEM-T Easy (Figura 18), que tem extremidades 3'T livres. Para a reação de ligação foram usados 50 ng do vetor pGEM-T Easy, 55 ng do produto de PCR, 5 µL do tampão da T4 DNA ligase 2x, 3 U da T4 DNA ligase e água ultrapura. A reação foi incubada a 4°C *overnight*.

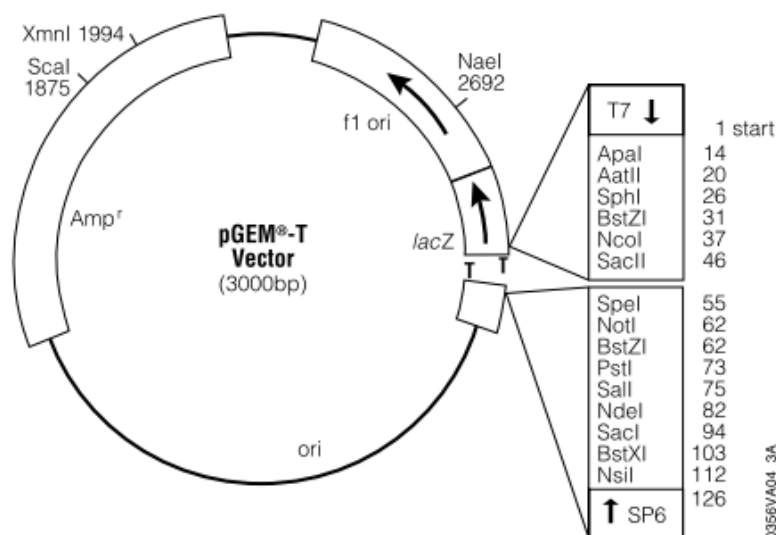


Figura 18 – Representação esquemática do plasmídeo pGEM-T Easy usado para clonagem do gene da HKT.³⁷

A ligação foi utilizada na etapa de transformação química por choque térmico em 50 µL de células de *Escherichia coli* cepa TOP 10 competentes (Invitrogen®) e 25 µL de tampão de transformação. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi dado um choque térmico de 42°C por 1 min e em seguida, incubadas em gelo por 2 minutos. Uma amostra de 500 µL de meio SOC foram adicionados ao microtubo e incubado em agitador orbital a 37 °C com agitação de 200 rpm por 60 minutos. 100 µL das células transformadas foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo ampicilina a 100 µg/mL. Além da marca de resistência ao antibiótico, a placa de Petri continha uma mistura de IPTG/X-Gal utilizada para selecionar as construções cujo inserto estava inserido no operon *lac*, causando a repressão do gene que codifica a β-galactosidade.

Neste sistema, as colônias de cor branca continham o construto enquanto que as azuis não o continham.

Em seguida, os inóculos de uma colônia branca isolada foram preparados em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina a 100 µg/mL. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada e o sedimento de células foi submetido a lise alcalina para liberação dos construtos com o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). As mini preparações foram quantificadas em NanoDrop® 2000 e enviadas para sequenciamento automático no sequenciador ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems®) no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM/FIOCRUZ - PE para confirmação da identidade e integridade das sequências clonadas.

5.5.5. Digestão com as enzimas *BamHI* e *XhoI*

A digestão das construções plasmidiais foi realizada com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (NEB®) para liberar o inserto do vetor e realizar a subclonagem deste inserto com o vetor de expressão. A reação foi realizada com 10 µL das minipreparações, 2 µL de cada enzima de restrição, 4 µL do tampão 3 10x (100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100µg/ml BSA e pH 7.9 a 1x) e água ultrapura para completar o volume de reação para 40 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas.

5.5.6. Subclonagem no plasmídeo de expressão pGEX4T₃

O inserto digerido foi purificado com o mesmo kit de purificação de PCR e posteriormente inserido ao vetor pGEX4T₃, que possibilita a expressão da proteína fusionada com a GST. O vetor já estava digerido com as mesmas enzimas (Figura 19). Após a ligação *overnight* nas mesmas condições descritas do item 5.5.4, células de *E. coli* cepa TOP 10® quimiocompetentes foram transformadas com o vetor e plaqueadas em LB sólido contendo ampicilina a 100 µg/mL. Inóculos foram crescidos em LB líquido para obter a minipreparação, conforme descrito no item 5.5.4.

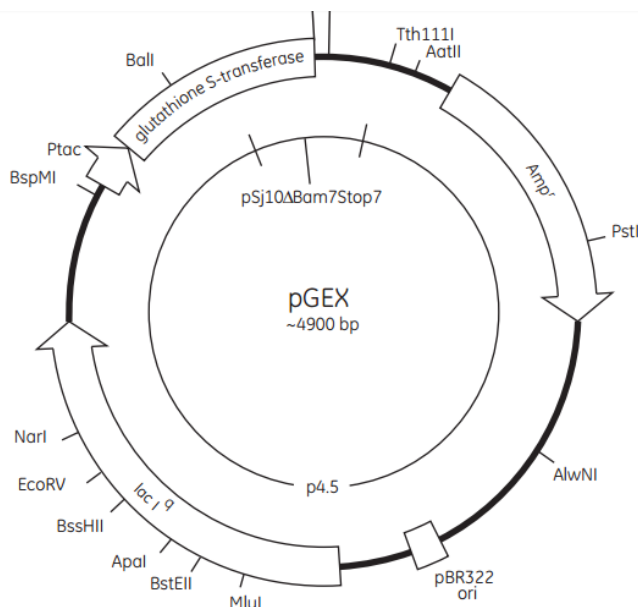


Figura 19 - Vetor pGEX4T₃ utilizado para subclonagem e expressão da HKT.³⁸

5.5.7. Expressão da HKT recombinante

Para expressar a HKT recombinante, células de *E. coli* cepa BL21 quimiocompetentes foram transformadas com os construtos HKT1/pGEX4T3 e HKT2/pGEX4T3 e plaqueadas em LB ágar contendo ampicilina a 100 µg/mL. Inóculos de colônias isoladas foram preparados em 10 mL de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL, conforme descrito no item 5.5.4. Após 12 horas a 37 °C, o volume total do inóculo foi transferido para 400 mL de meio LB sem antibiótico e colocado em *shaker* a 37°C com agitação de 200 rpm. O crescimento das células foi monitorado em espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm) até O.D. de 0,5. Ao atingir essa absorvância, uma alíquota de 200 µL foi retirada e as células na cultura foram induzidas a produção protéica com IPTG a 0,1 mM durante 4 horas. Após esse tempo, outra alíquota de 200 µL foi retirada e ambas foram centrifugadas a 5000 *g* por 3 min. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos de bactérias foram ressuspensos em 40 µL de tampão Laemmli 2X contendo β-mercaptoetanol cada, fervidos a 100 °C por 5 min e submetidos a eletroforese em SDS-PAGE 10% para constatar a indução. Uma alíquota após a indução com IPTG foi coletada e analisada em SDS-PAGE. O volume restante da cultura induzida foi centrifugado a 4 °C, 5000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias foi ressuspensos em 20 mL de PBS 1x. As células foram submetidas à lise em sonicador Sonics Vibra-Cell® VC 505 incubada em gelo. Ao sobrenadante, foi adicionado 200 µL de Triton-X100, homogeneizado e centrifugado a 4 °C, 5000 *g* por 25 min.

5.5.8. Purificação por Cromatografia de Afinidade

O sobrenadante obtido a partir da sonicação foi transferido para um tubo cônico de 50 mL contendo 200 µL da resina Glutathione-Sepharose 4B® pré-equilibrada com 3 lavagens com PBS 1x de 10 mL cada. A incubação foi realizada sob agitação leve a 4 °C por 1 hora. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 5000 *g*, 4 °C por 2 min e o sobrenadante descartado. A resina foi transferida para microtubo e lavada três vezes com PBS 1x. O processo de eluição da HKT/GST da resina de glutathione ocorreu em 500 µL de solução de Glutathione Reduzida a 20 mM em Tris-HCl 100 mM pH 8 por 1 hora e posterior eluição em solução de Glutathione Reduzida a 50 mM em Tris-HCl 100 mM pH 8 por mais 1 hora. Foram adicionados 200 µL de PBS 1x contendo 10 % de glicerol à resina e todos os eluídos foram estocados a -80 °C até a sua utilização. A solução com a proteína eluída da resina foi dialisada com tampão de diálise (PBS contendo Triton X-100 a 0,1 % e 5 % de glicerol). Os eluatos foram transferidos para uma membrana de diálise e o tampão foi trocado duas vezes, em intervalos de 90 min. Após a diálise, a proteína foi recuperada da membrana de diálise e transferida para um microtubo. As proteínas foram submetidas ao SDS-PAGE 10% para constatar a eficiência da purificação e quantificação da proteína. A quantificação foi feita por densitometria de bandas utilizando uma curva padrão de BSA (4, 2, 1, 0.5 e 0.25 µg da proteína) e a HKT, através do programa Kodak MI®.

5.6. Avaliação da funcionalidade da HKT recombinante

O método desenvolvido foi adaptado de Han, Q. e Li, J.²⁸. As soluções de 3-HK (substrato aminoadador), PLP (cofator), piruvato sódico (substrato aminoceptor) e ácido xanturênico (produto) foram preparadas em tampão fosfato 200 mM pH 7,0 e estocadas a -20 °C (Tabela 7).

Tabela 7 - Soluções preparadas em tampão fosfato 200 mM pH 7 para realizar os ensaios enzimáticos. *Por ter concentração final pequena, a primeira solução de PLP foi diluída 10 vezes para ser ajustada ao volume de reação.

Substância	Massa/Volume	Volume de tampão	Concentração (estoque)
3-HK	11,22 mg	2 mL	0,025 M
PLP*	49 mg	10 mL	0,02 M
PLP final	100 µL	900 µL	0,002 M
Piruvato sódico	275 mg	10 mL	0,025 M
Ácido Xanturênico	30,77 mg	5 mL	0,03 M

Assim, foram adicionados a um microtubo 20 µL de 3-HK, 5 µL da solução final de PLP, 10 µL de piruvato sódico, 3,5 µg da HKT/GST e tampão para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 50 °C por 15 min e 50 µL do tampão e 100 µL de ácido fórmico foram adicionados à reação. A centrifugação foi feita a 6440 *g* por 5 min e o sobrenadante foi transferido para um *vial* âmbar.

A reação foi analisada por CLAE com detector UV. A separação foi feita com coluna Agilent® Zorbax RX-C18 4,6×150 mm e 5 µm de tamanho de partículas e fase móvel 3:2 metanol/água ultrapura em 7 minutos de corrida e fluxo de coluna de 1,0 mL/min. Uma amostra de 20 µL da reação foi injetada por injetor automático no cromatógrafo e detectada em comprimento de onda de 366 nm. Os reagentes e o padrão de ácido xanturênico foram injetados em triplicata para a determinação da média e desvios-padrão e os ensaios foram realizados em triplicata com única injeção.

Ensaio de inibição

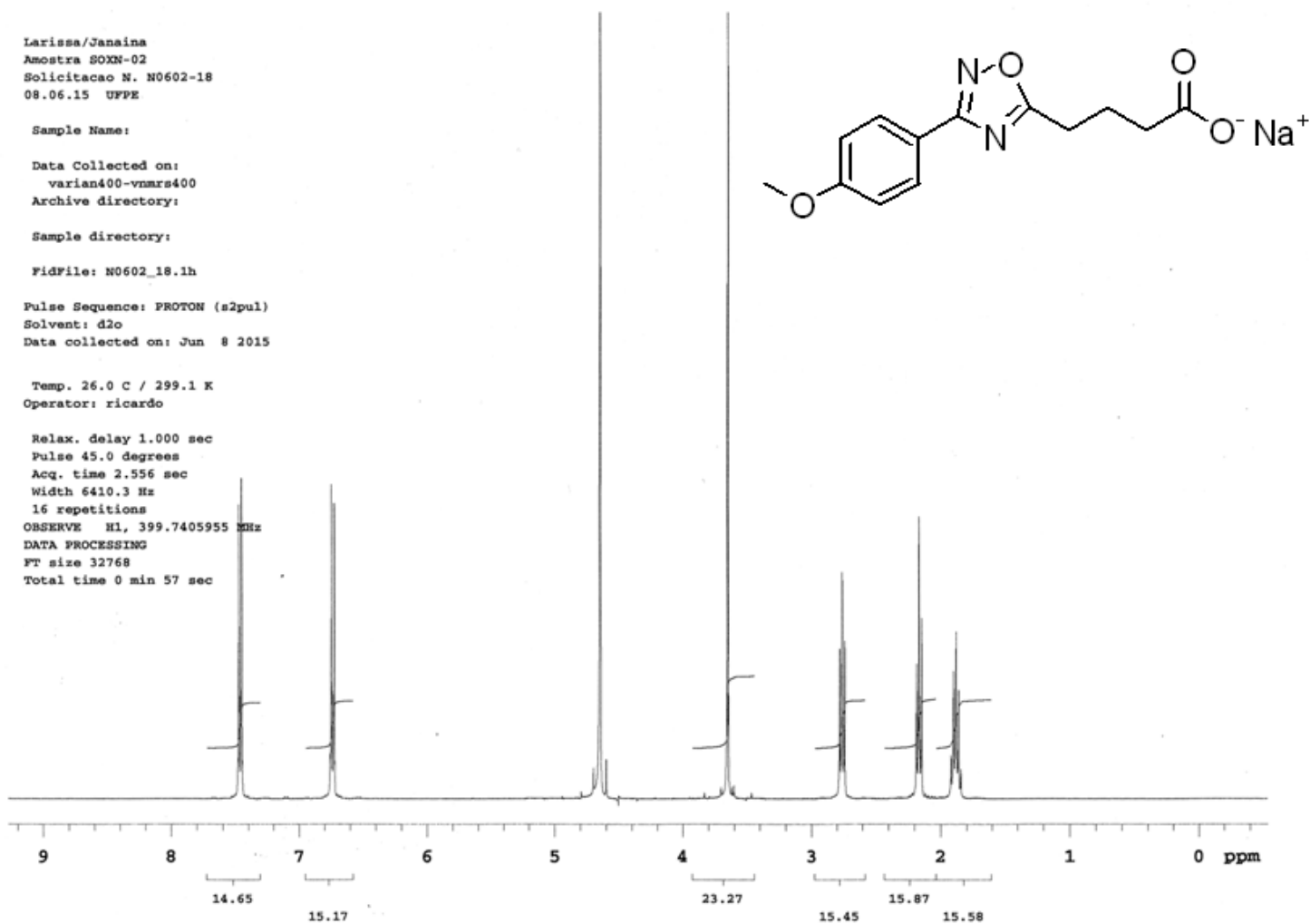
Os ensaios de inibição enzimática foram realizados baseados nos mesmos parâmetros dos ensaios enzimáticos, exceto pela adição dos inibidores preparados em tampão fosfato 200 mM pH 7 em concentração final de 1 mM no volume reacional descrito.

REFERÊNCIAS

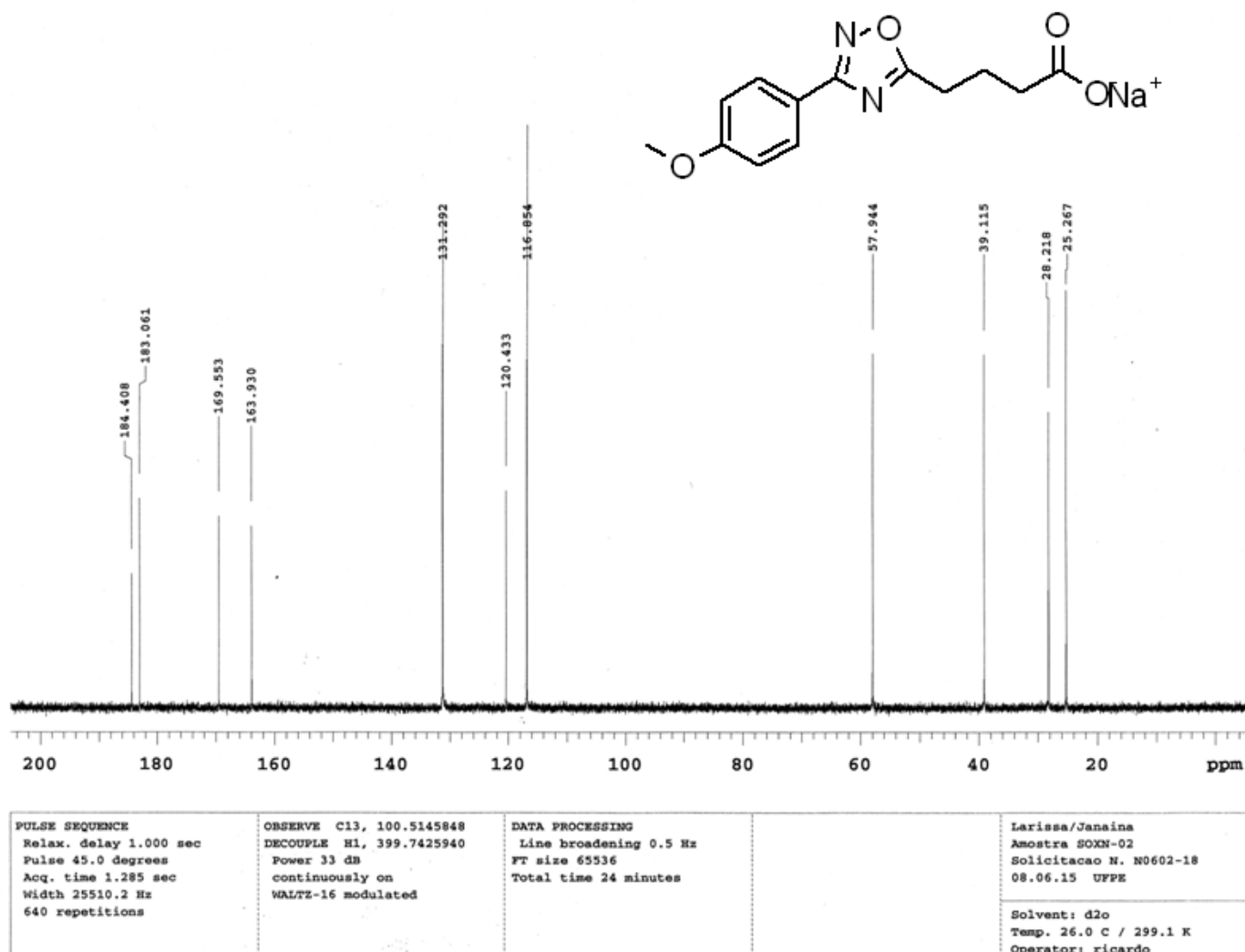
- (1) Lopes, N.; Nozawa, C.; Linhares, R. E. C. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* **2014**, 5 (3), 55–64.
- (2) Hunt, M. *Microbiology and Immunology*.
- (3) Figueiredo, L. T. M. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2007**, 40 (2), 224–229.
- (4) Fiocruz. Aedes em foco: Arboviroses em expansão no Brasil
<http://periodicos.fiocruz.br/pt-br/content/aedes-em-foco-arboviroses-em-expans%25C3%25A3o-no-brasil>.
- (5) Ferreira, K. V.; Rocha, K. C.; Caputto, L. Z.; Luiz, A.; Fonseca, A.; Luiz, F. *Arq. Bras. Ciências da Saúde* **2011**, 36 (1), 40–47.
- (6) Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2016, pp 1–10.
- (7) Honório, N. A.; Câmara, D. C. P.; Calvet, G. A.; Brasil, P. *Cad. Saude Publica* **2015**, 31 (5), 906–908.
- (8) Fiocruz. Aedes aegypti - Introdução aos aspectos científicos do vetor
<http://auladengue.ioc.fiocruz.br/?p=68>.
- (9) Clements, A. N. *The biology of mosquitoes*. v.1.; 1992.
- (10) Fiocruz. MOSQUITO AEDES AEGYPTI - O Aedes Aegypti
https://dengue.cecom.unicamp.br/?page_id=215.
- (11) Liang, G.; Gao, X.; Gould, E. A. *Emerg. Microbes Infect.* **2015**, 4 (3), e18.
- (12) ENCOP - Controle de pragas. Inseticidas mais utilizados no controle de vetores e pragas urbanas http://www.encoppragas.com.br/inseticidas_92.html.
- (13) Braga, I. A.; Valle, D. *Epidemiol. e Serviços Saúde* **2007**, 16 (4), 279–293.
- (14) Santaladchaiyakit, Y.; Srijaranai, S.; Burakham, R. *J. Sep. Sci.* **2012**, 35 (18), 2373–2389.
- (15) Pesticide Environmental Stewardship. .
- (16) Insecticide Resistance Action Committee. .
- (17) Stone, T. W.; Darlington, L. G. *Int. Congr. Ser.* **2007**, 1304, 298–304.
- (18) Li, J.; Li, G. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 27 (10), 859–867.
- (19) Li, J. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 29 (4), 329–338.
- (20) Chen, Y.; Guillemin, G. J. *Int. J. Tryptophan Res.* **2009**, 2 (1), 1–19.
- (21) Phillips, R. S. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2011**, 1814 (11), 1481–1488.

- (22) Hazari, N.; Bhad, R. *J. Psychopharmacol.* **2015**, 29 (10), 1133–1134.
- (23) Schwarcz, R. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, 4 (1), 12–17.
- (24) Stone, T. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35 (2), 179–186.
- (25) Han, Q.; Kim, S. R.; Ding, H.; Li, J. *Biochem. J.* **2006**, 397 (3), 473–481.
- (26) Han, Q.; Beerntsen, B. T.; Li, J. *J. Insect Physiol.* **2007**, 53 (3), 254–263.
- (27) Han, Q. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (18), 15781–15787.
- (28) Han, Q.; Li, J. *FEBS Lett.* **2002**, 527 (1–3), 199–204.
- (29) Vidhyanandhini, R.; Kumar, N. P. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, 103 (6), 595–597.
- (30) Rossi, F.; Lombardo, F.; Paglino, A.; Cassani, C.; Miglio, G.; Arca, B.; Rizzi, M. *FEBS J.* **2005**, 272 (21), 5653–5662.
- (31) Rossi, F.; Garavaglia, S.; Giovenzana, G. B.; Arca, B.; Li, J.; Rizzi, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (15), 5711–5716.
- (32) Oliveira, V. S.; Pimenteira, C.; da Silva-Alves, D. C. B.; Leal, L. L. L.; Neves-Filho, R. A. W.; Navarro, D. M. A. F.; Santos, G. K. N.; Dutra, K. A.; dos Anjos, J. V.; Soares, T. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21 (22), 6996–7003.
- (33) Bora, R.; Dar, B.; Pradhan, V.; Farooqui, M. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2014**, 14 (4), 355–369.
- (34) Srivastava, R. M.; Pereira, M. C.; Faustino, W. W. M.; Coutinho, K.; dos Anjos, J. V.; de Melo, S. J. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **2009**, 140 (11), 1319–1324.
- (35) Tiemann, F. *Chem. Ber.* **1884**, 17, 126–129.
- (36) Romão, T. P.; De Melo Chalegre, K. D.; Key, S.; Junqueira Ayres, C. F.; Fontes De Oliveira, C. M.; De-Melo-Neto, O. P.; Silva-Filha, M. H. N. L. *FEBS J.* **2006**.
- (37) Promega. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Technical Manual.
- (38) Healthcare, G. E. pGEX Vectors , GST Gene Fusion System.

ANEXOS



ANEXO A: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2b**



ANEXO B: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) do 4-(3-(4-metoxifenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2b**

Larissa/Jenaina
 Amostra SOXN-03
 Solicitação N. N0602-19
 08.06.15 UFPE

Sample Name:

Data Collected on:
 varian400-vnmrs400
 Archive directory:

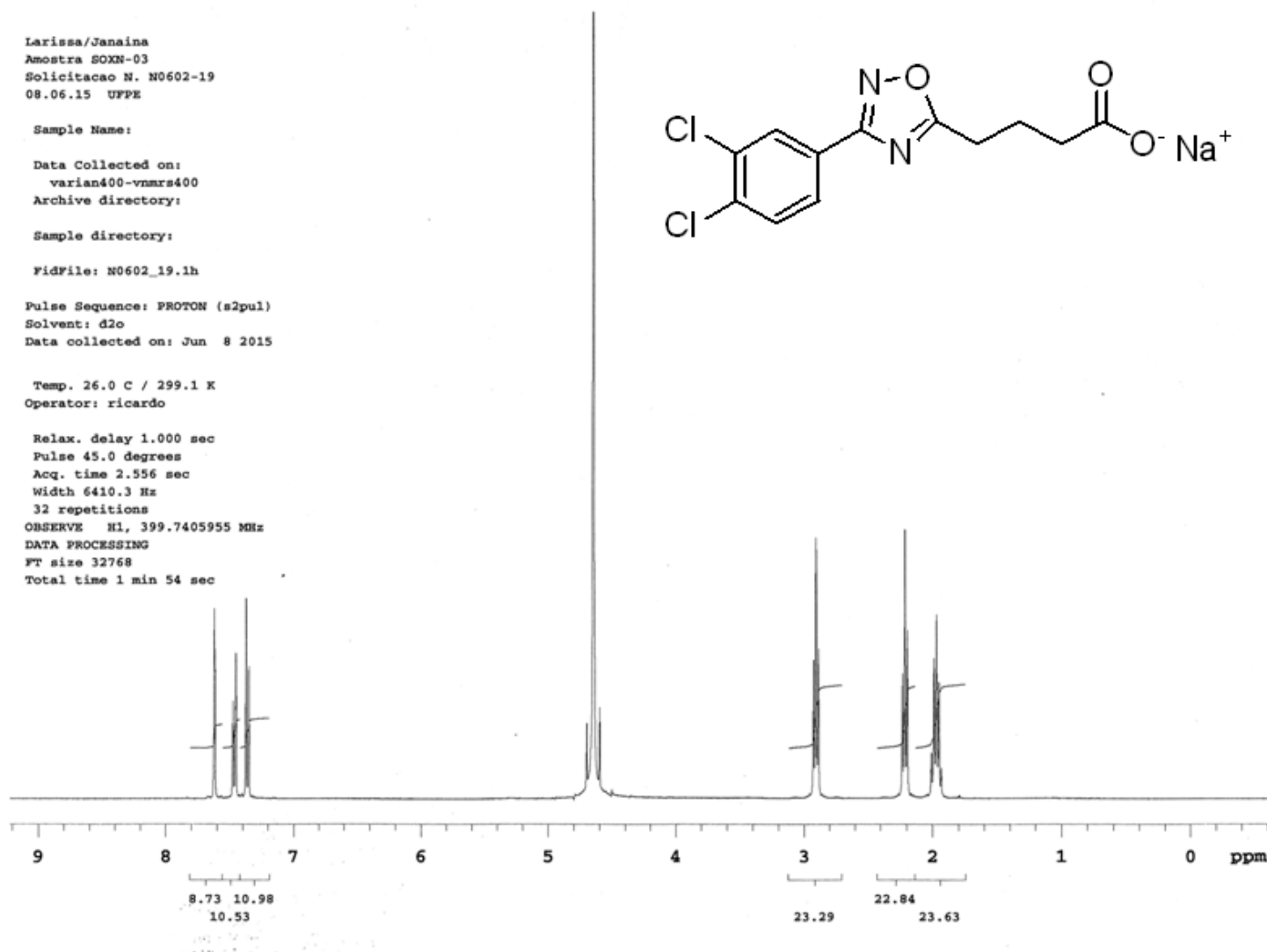
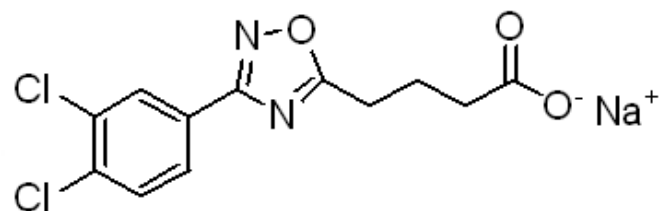
Sample directory:

FidFile: N0602_19.1h

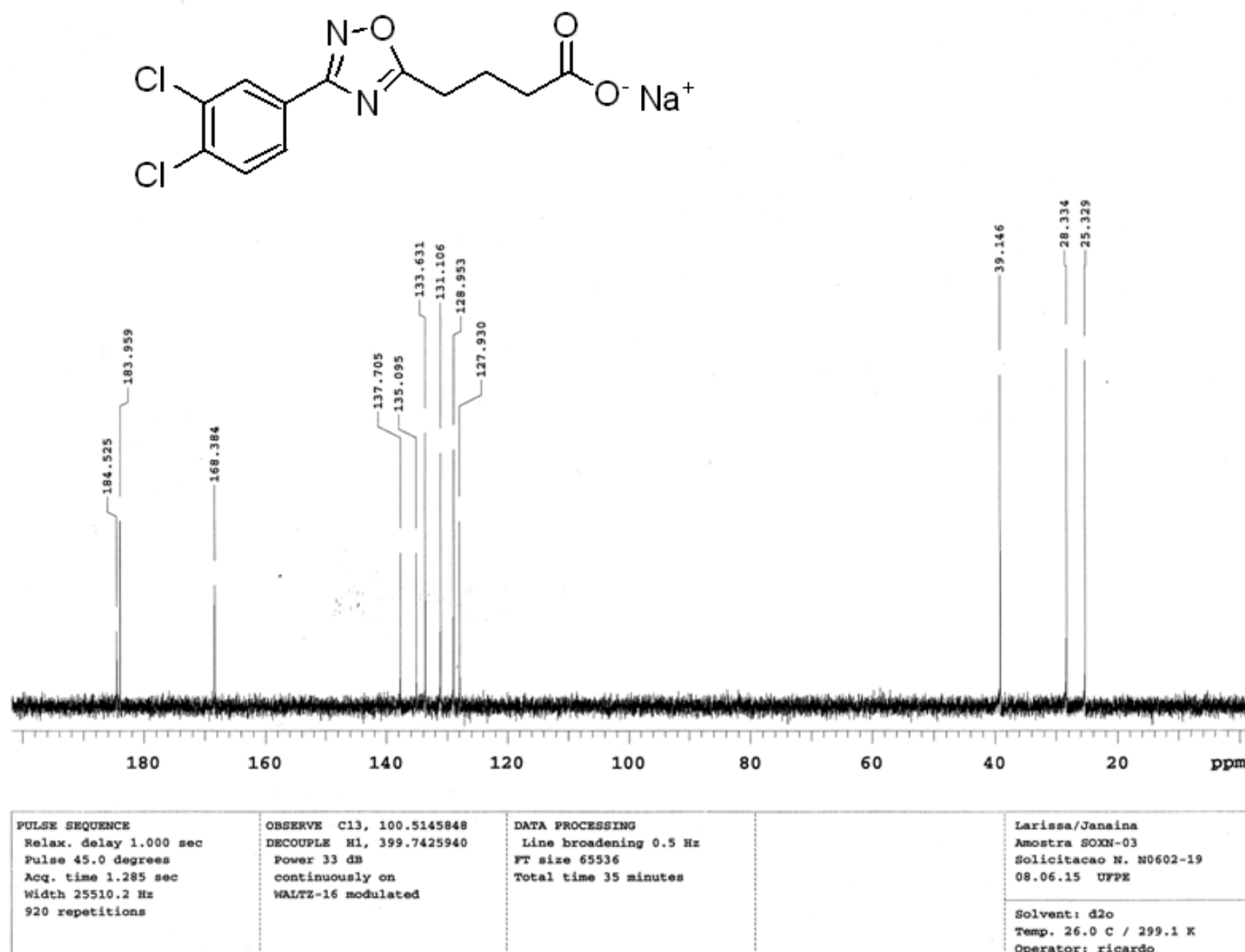
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: d2o
 Data collected on: Jun 8 2015

Temp. 26.0 C / 299.1 K
 Operator: ricardo

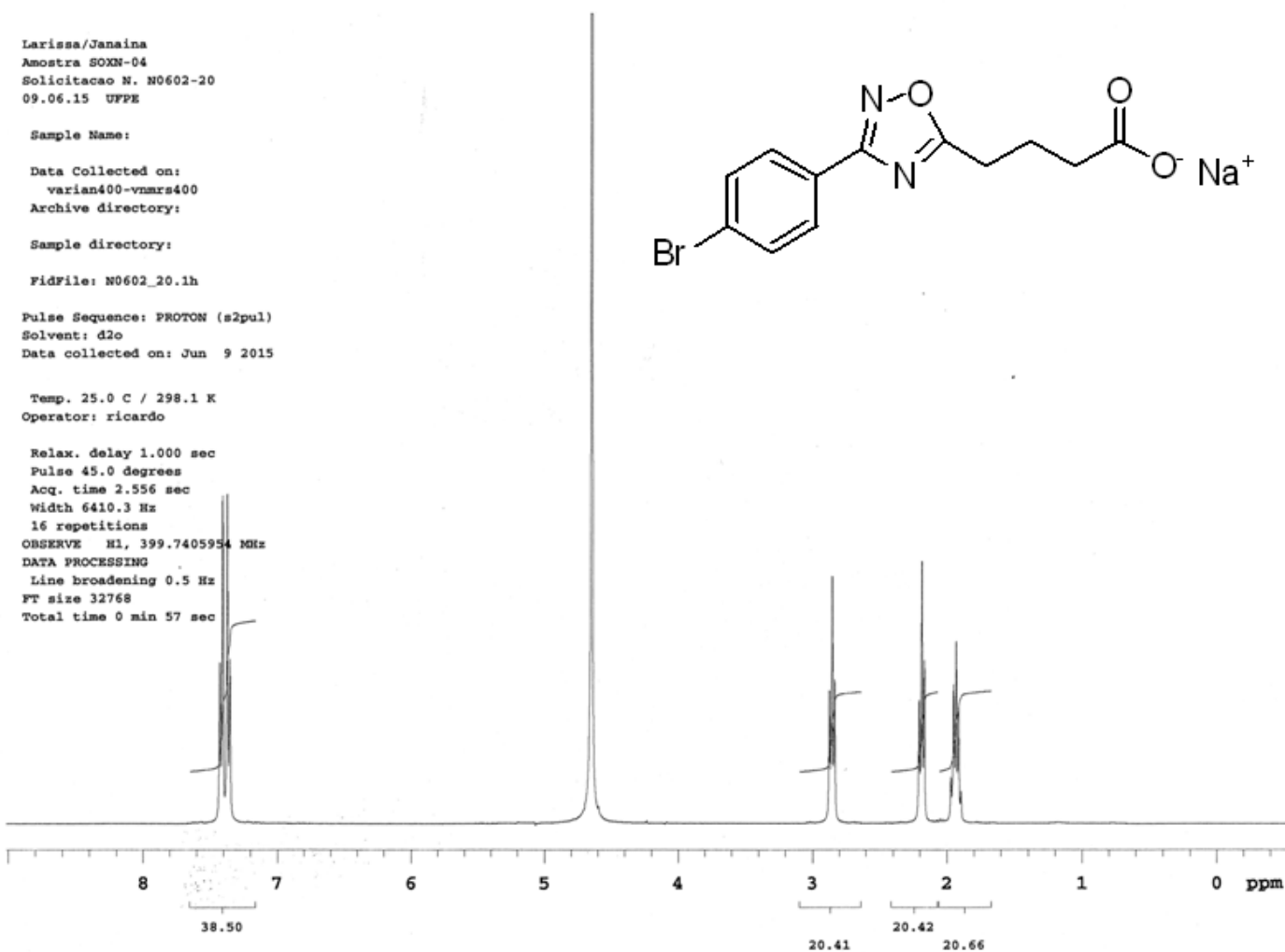
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 2.556 sec
 Width 6410.3 Hz
 32 repetitions
 ONSERVE H1, 399.7405955 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 1 min 54 sec



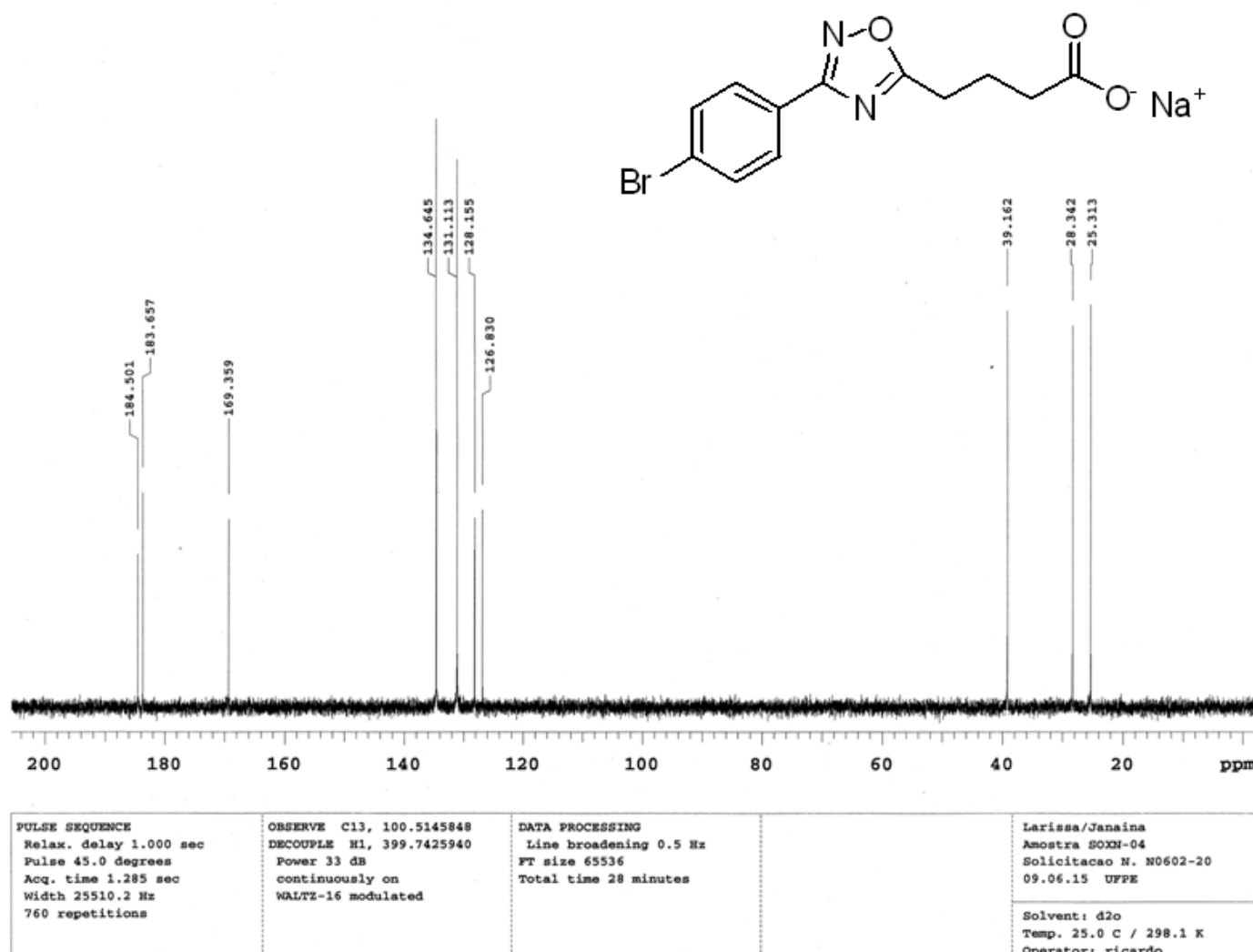
ANEXO C: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2c**



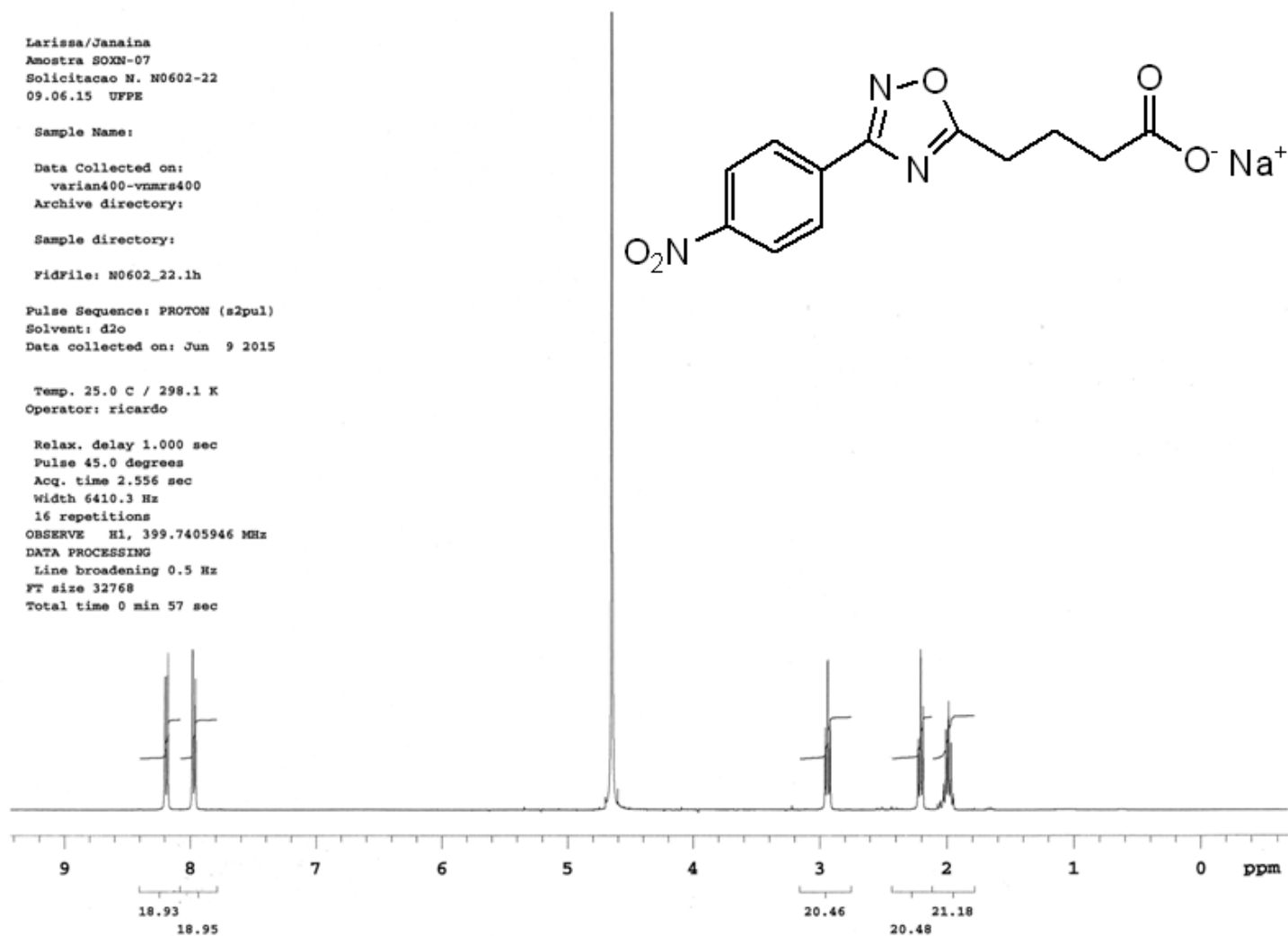
ANEXO D: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3,4-diclorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2c**



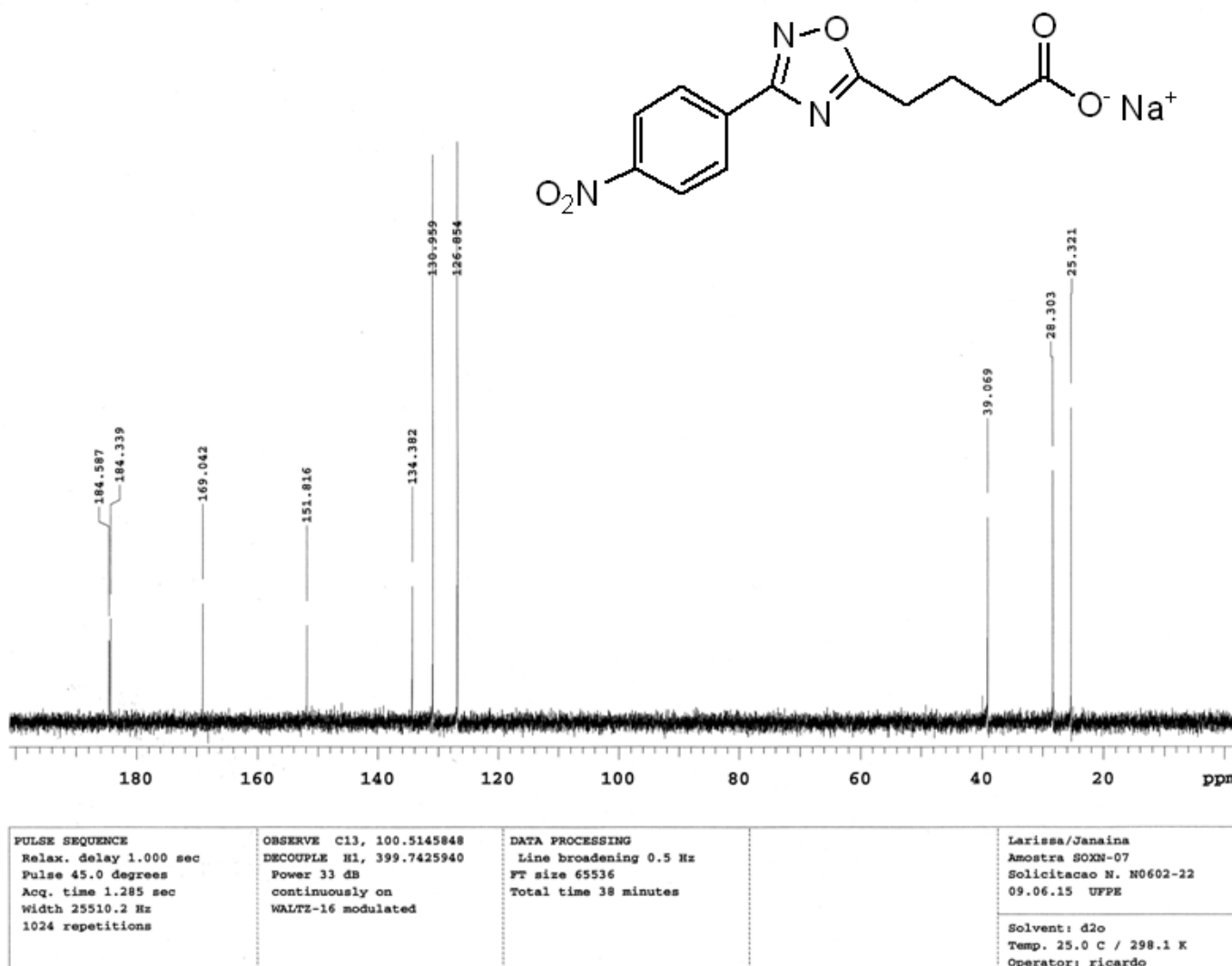
ANEXO E: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2d**



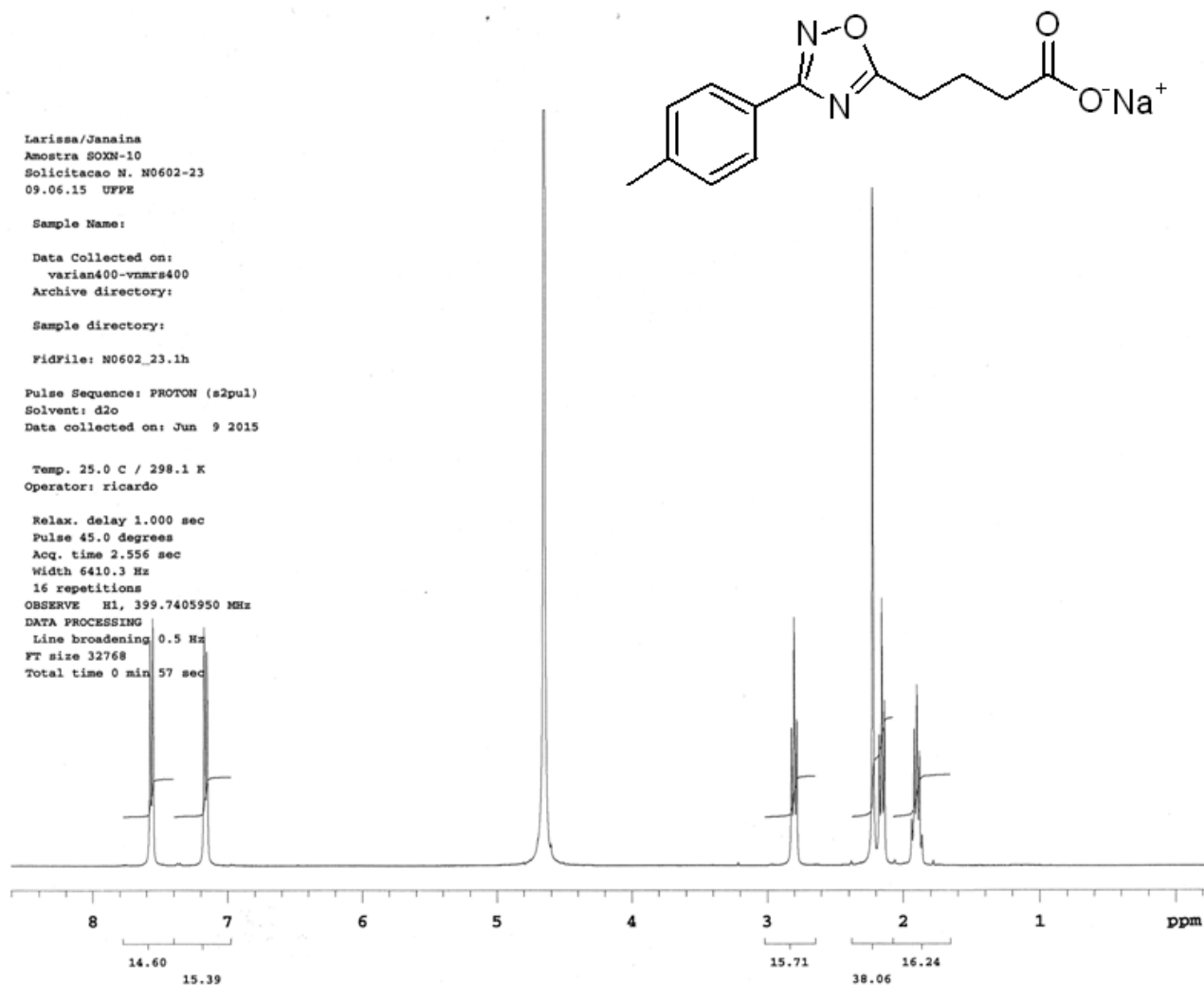
ANEXO F: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-bromofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2d**



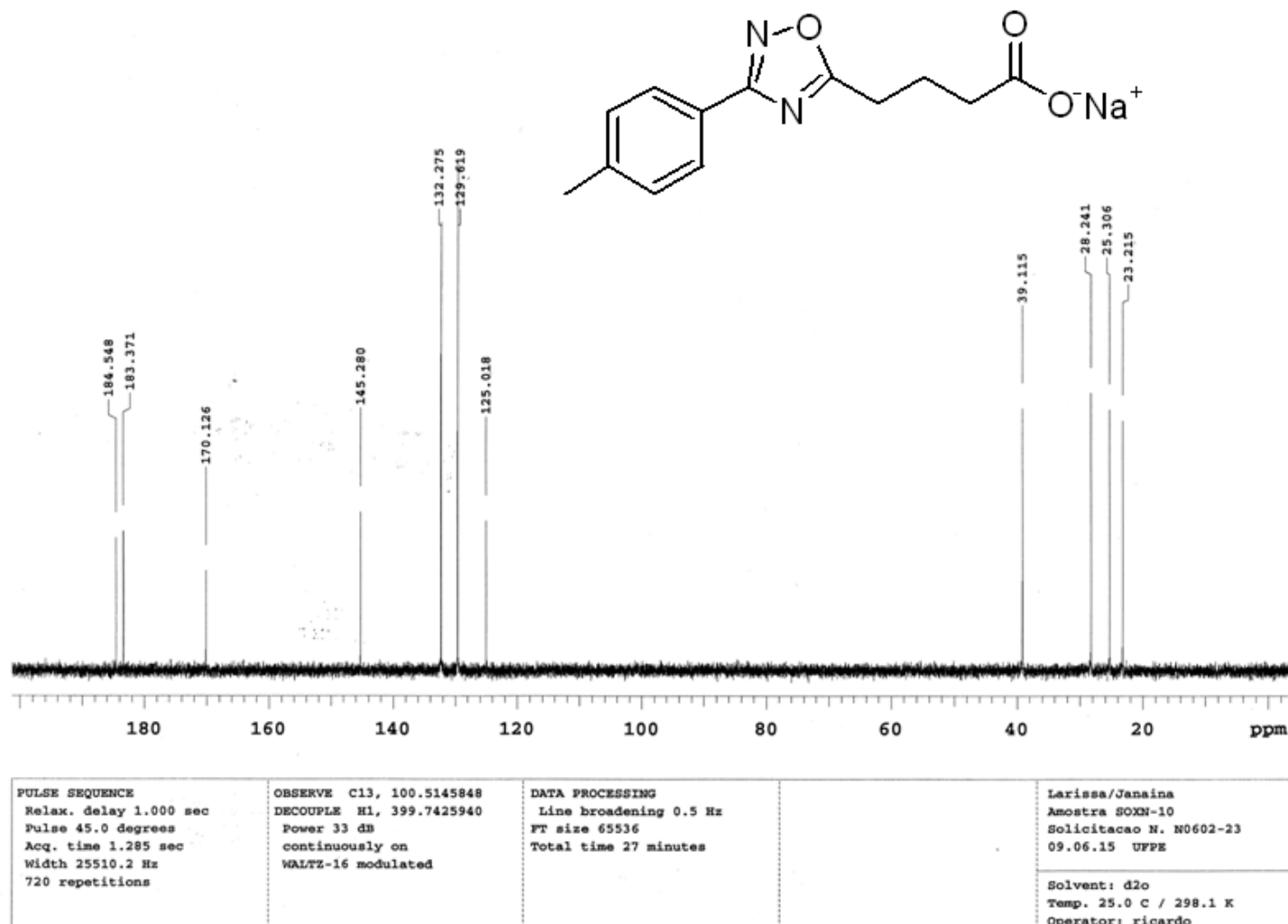
ANEXO G: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2e**



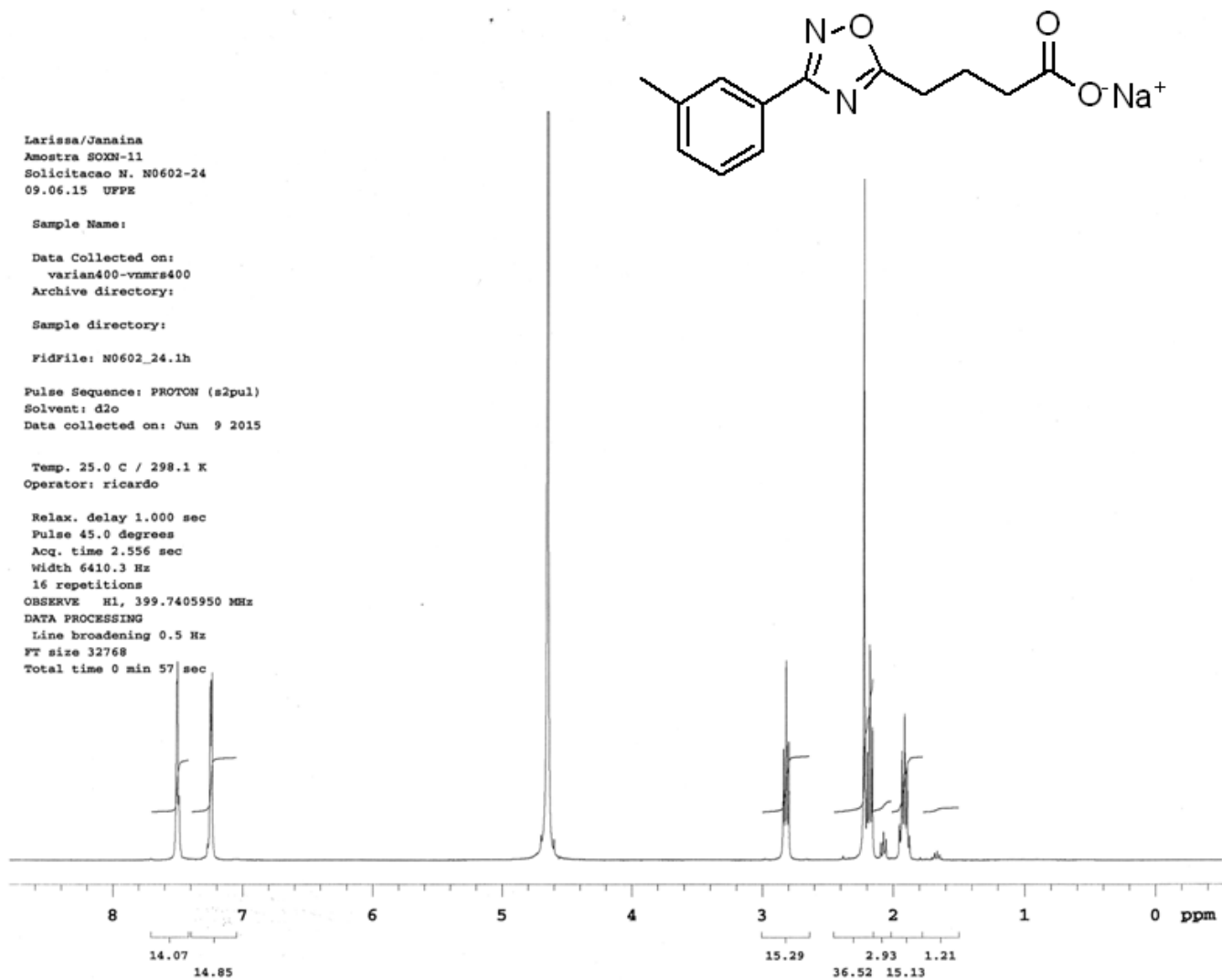
ANEXO H: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) do 4-(3-(4-nitrofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2e**



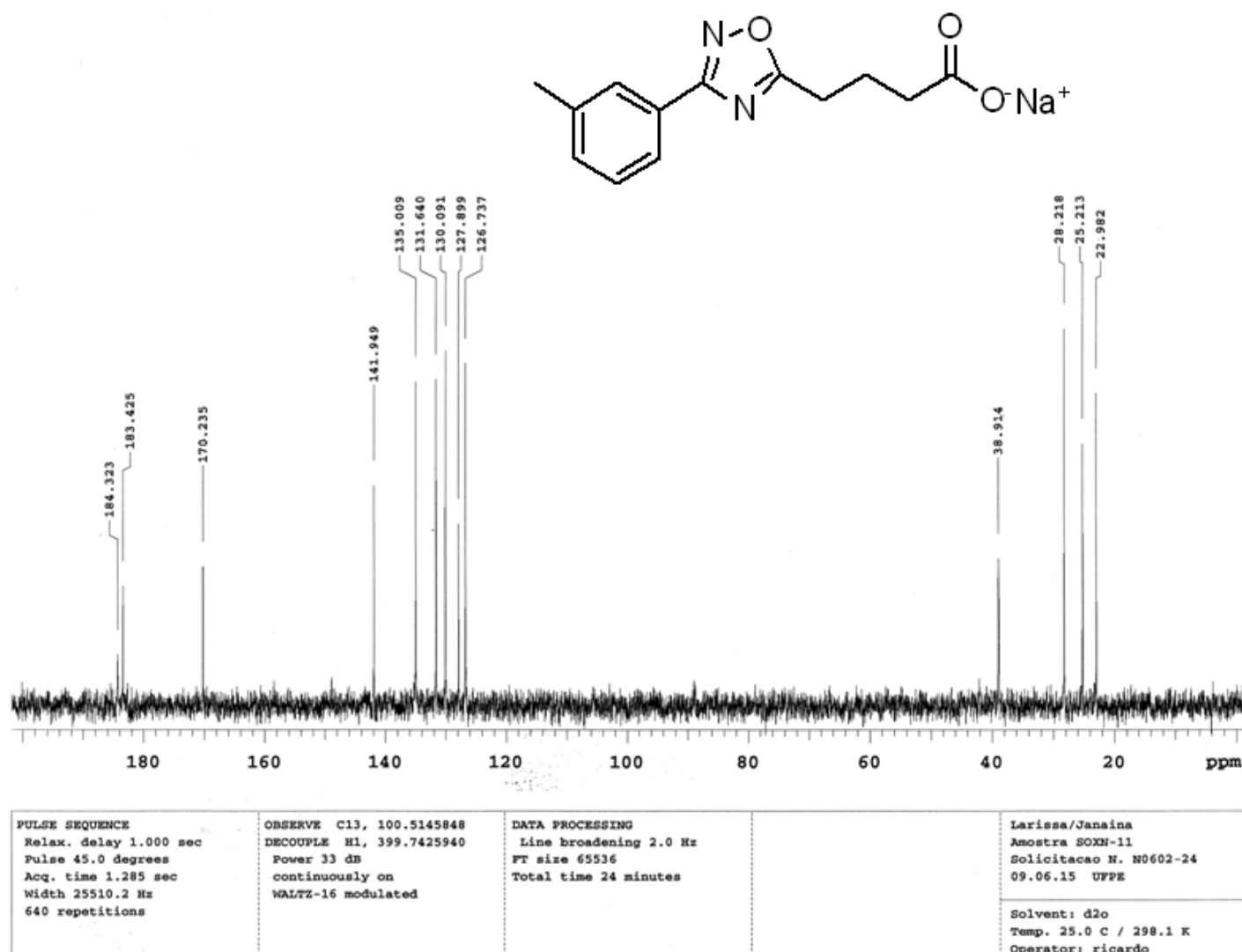
ANEXO I: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2f**



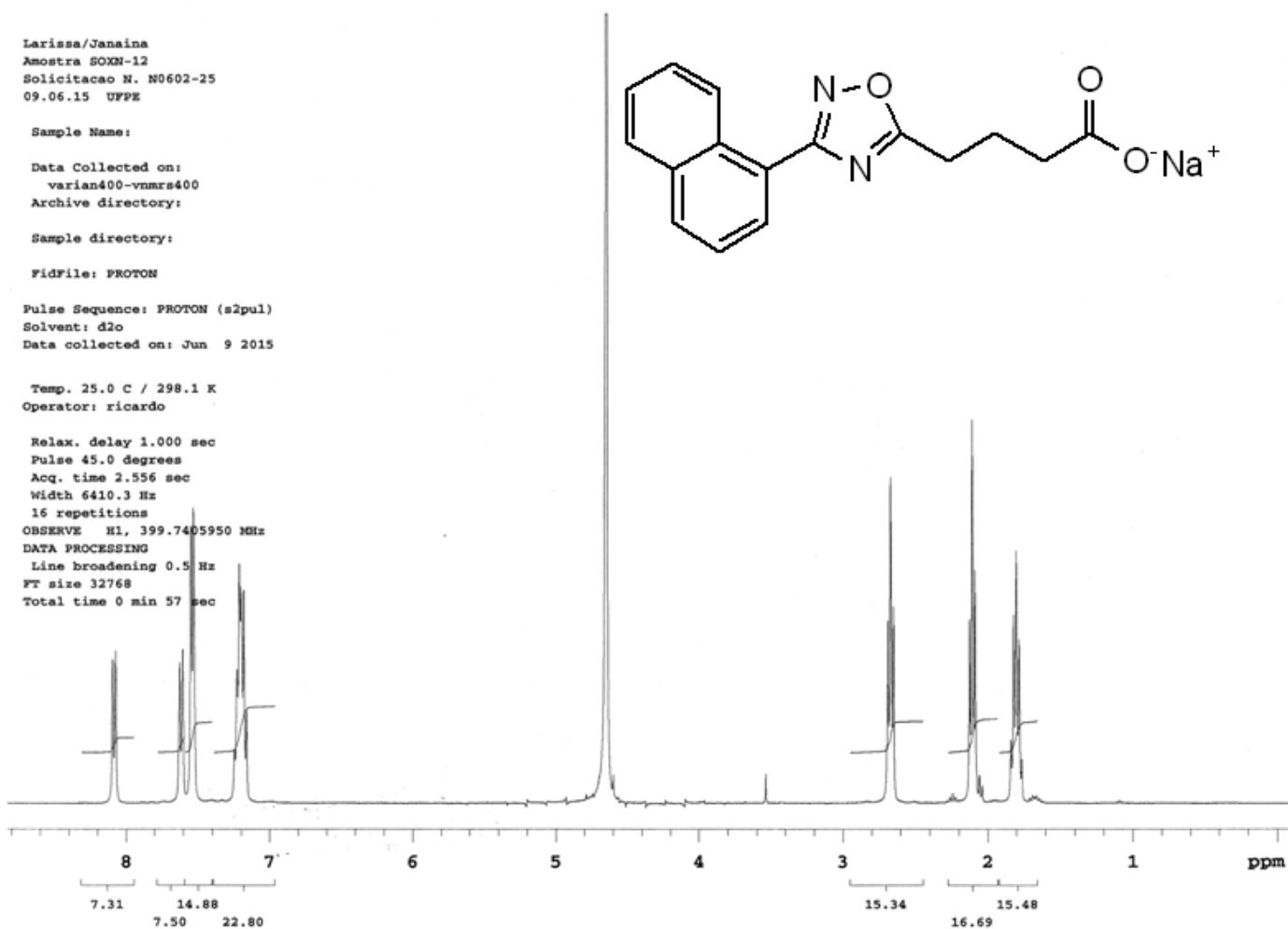
ANEXO J: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) do 4-(3-(4-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2f



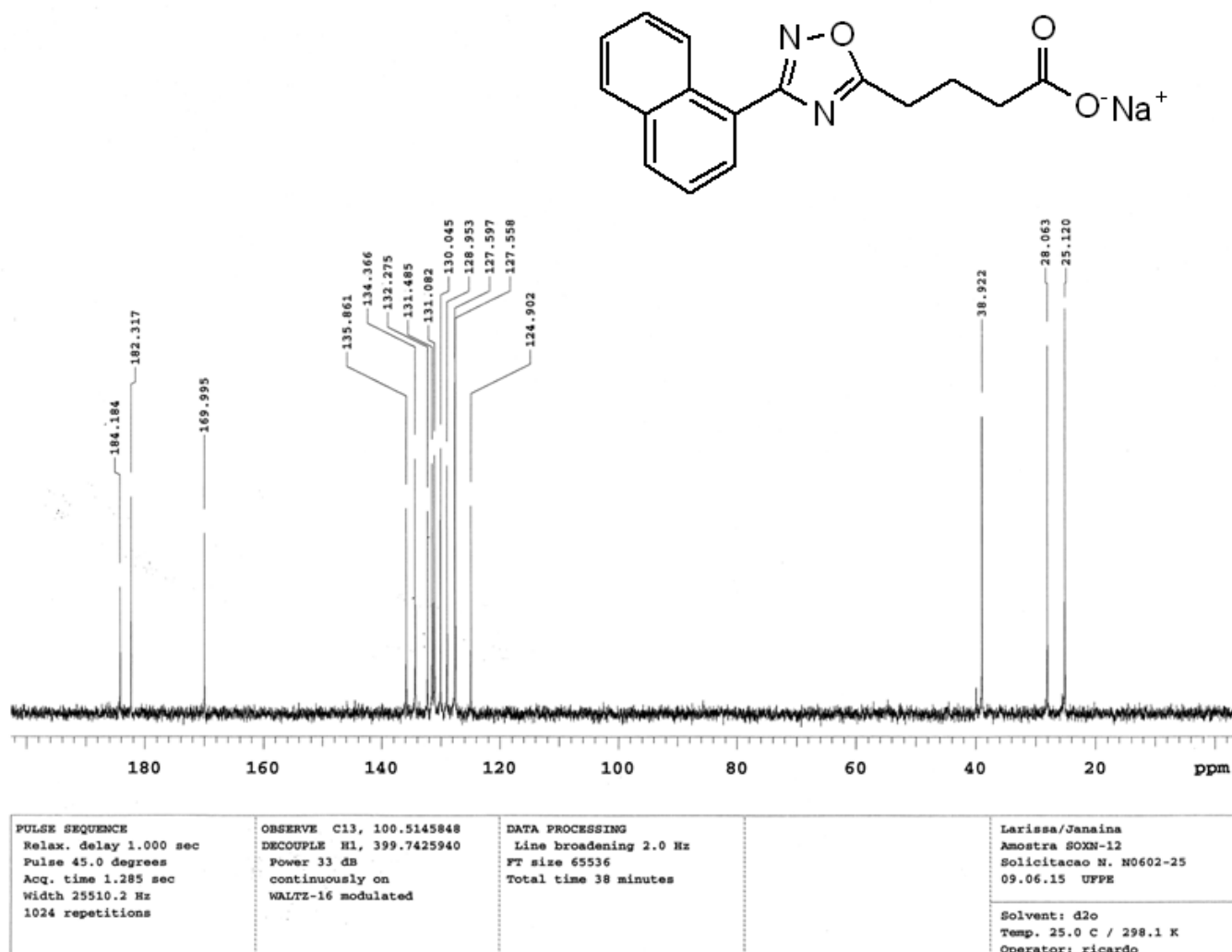
ANEXO K: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2g**



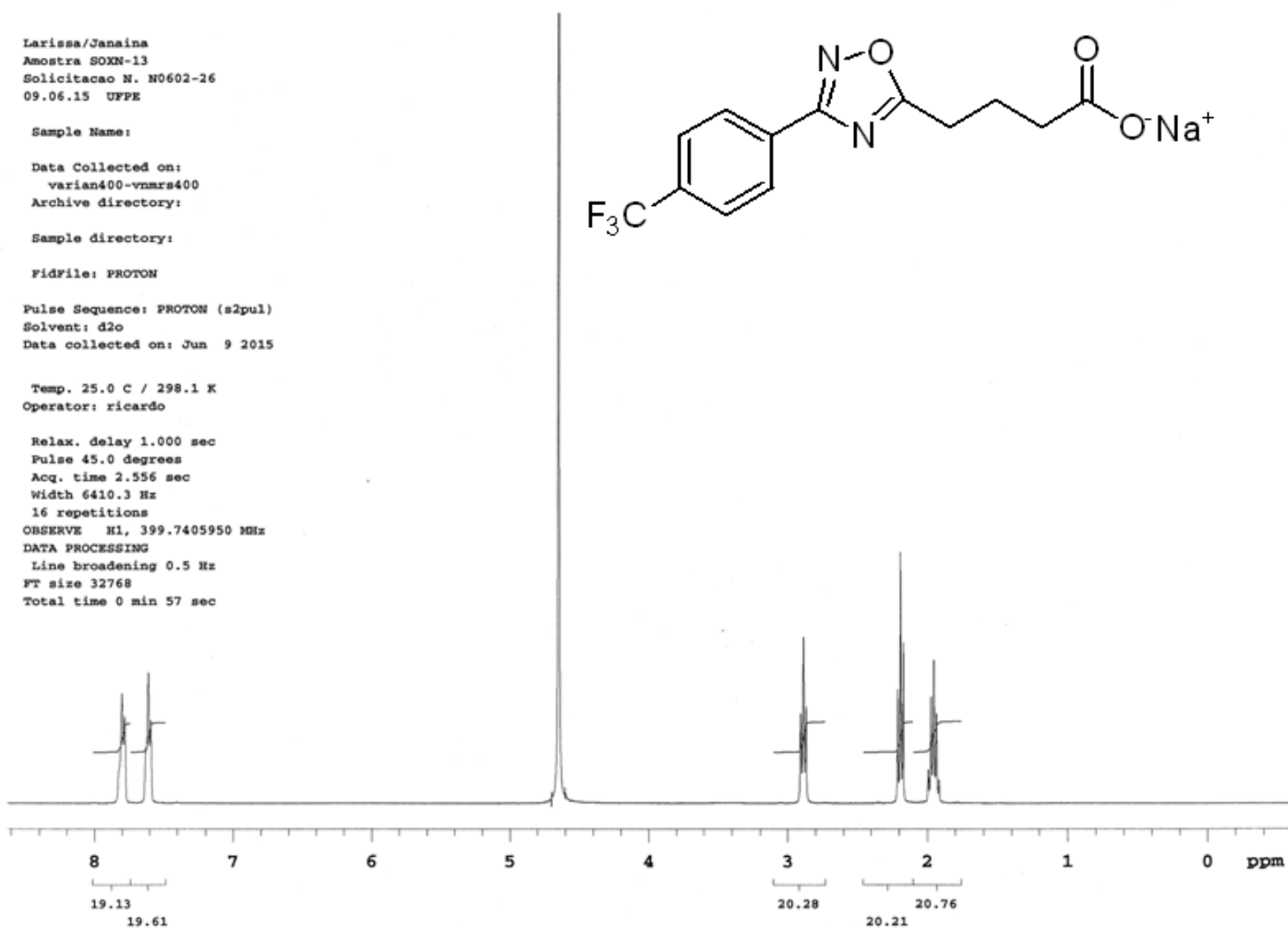
ANEXO L: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2g**



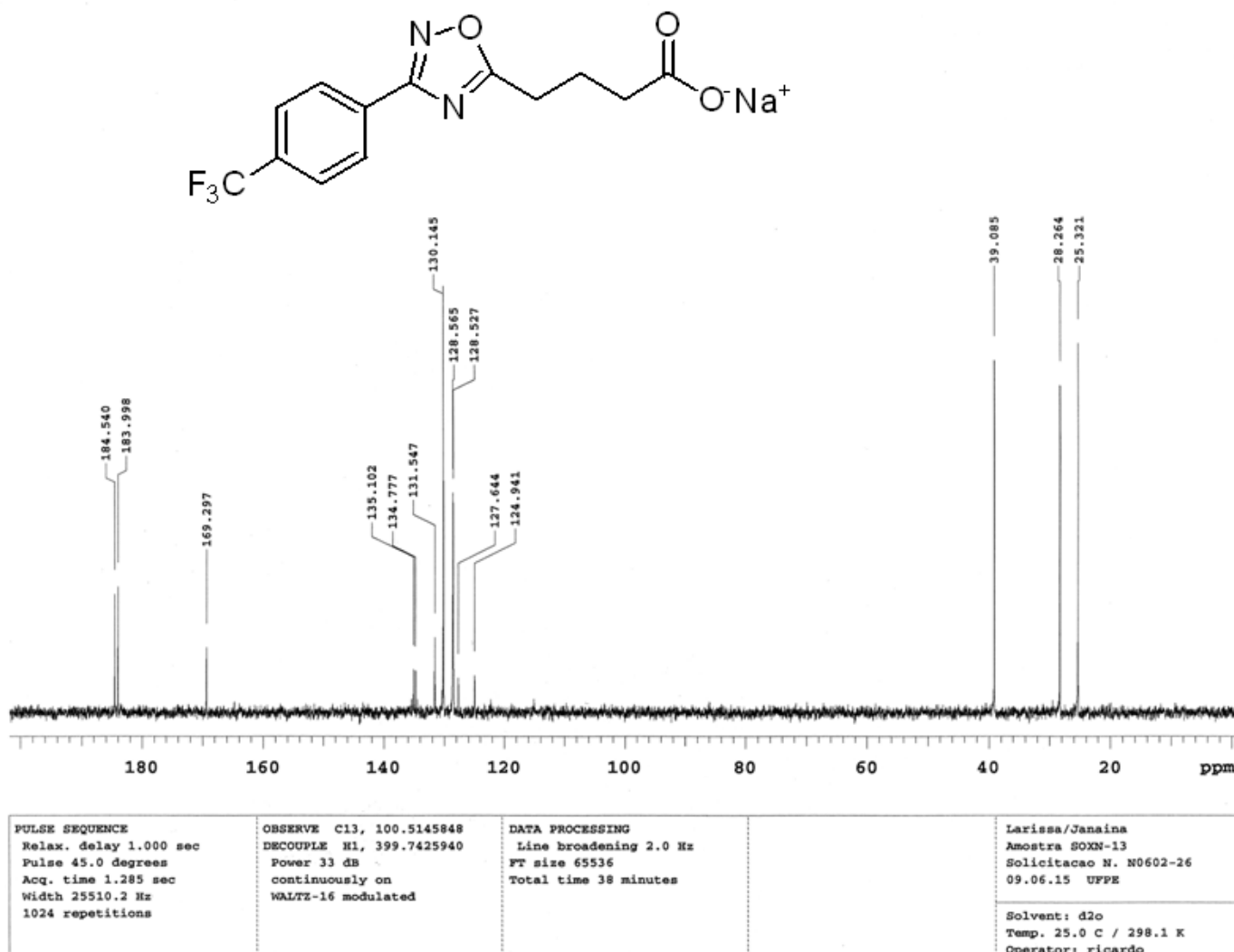
ANEXO M: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2h**



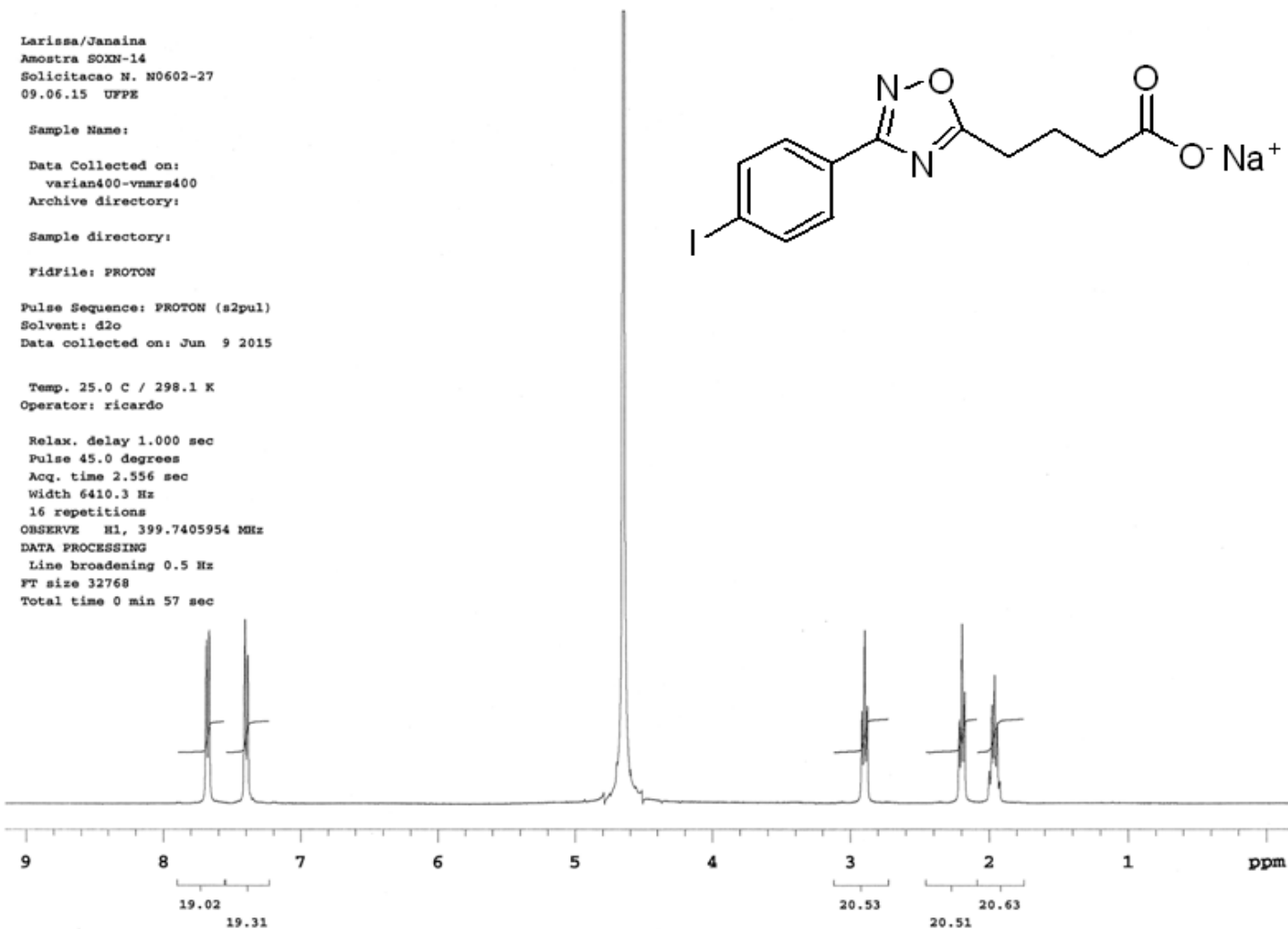
ANEXO N: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) do 4-(3-(naftalen-1-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2h**



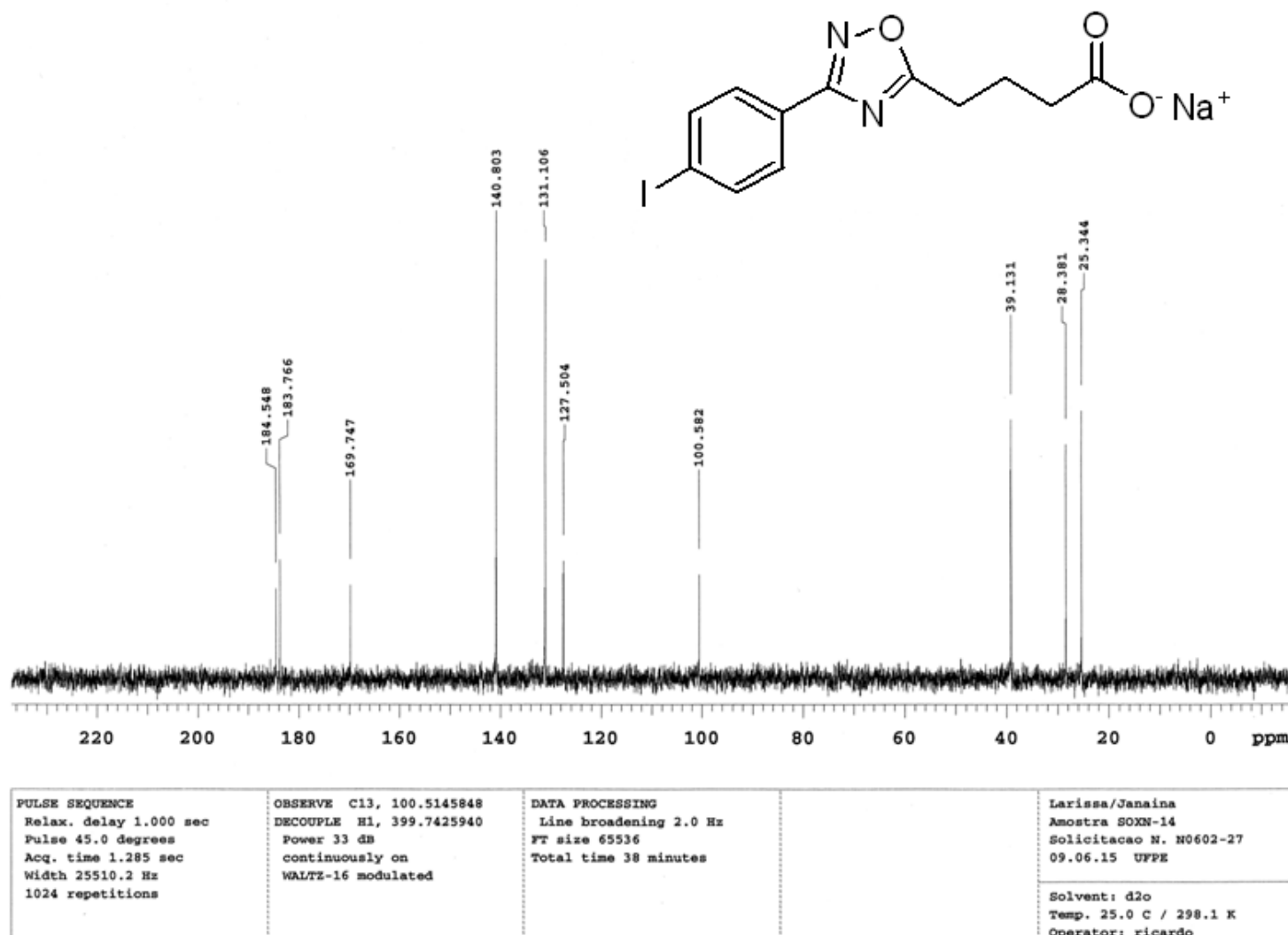
ANEXO O: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2i**



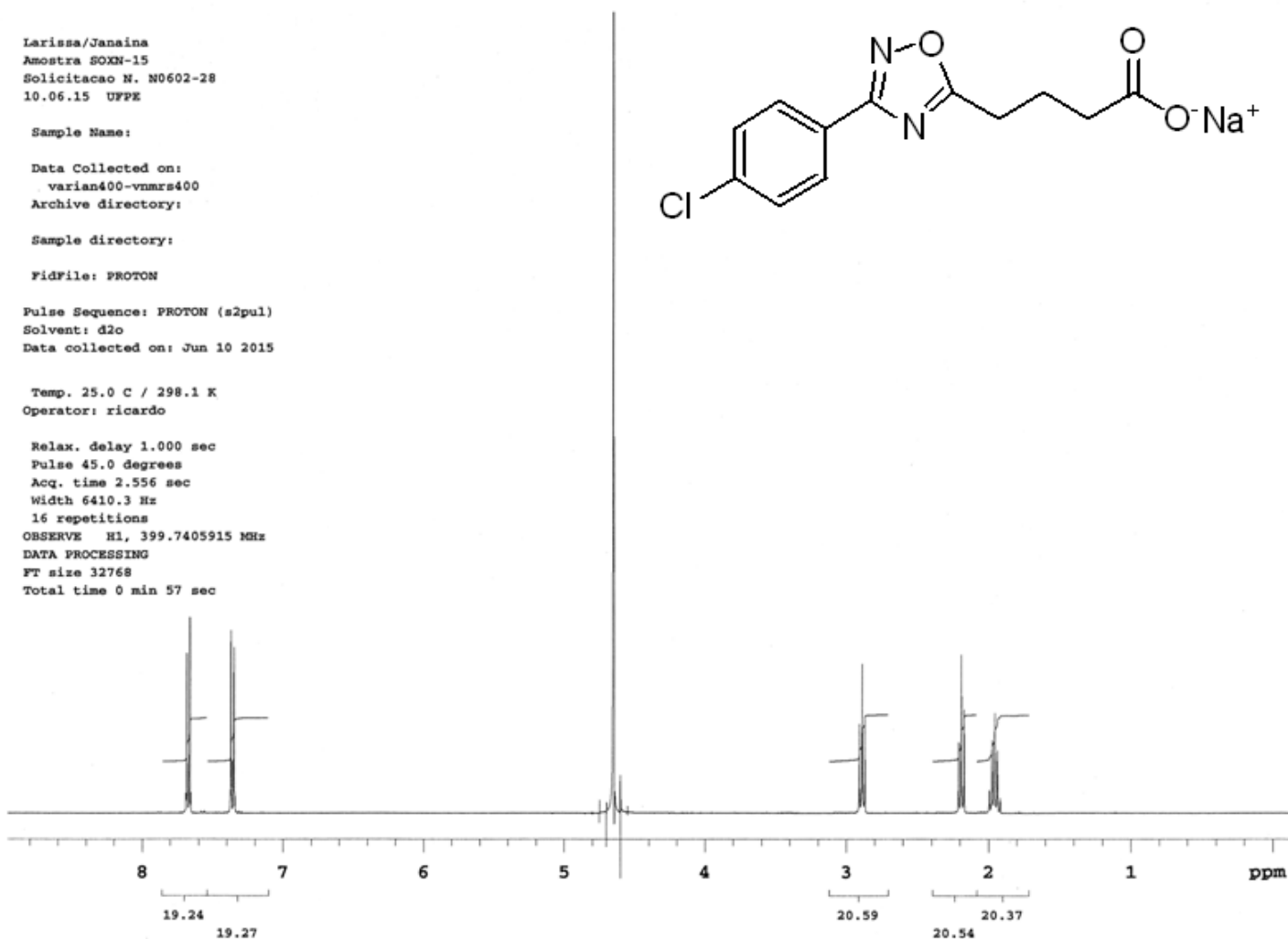
ANEXO P: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-(trifluorometil)fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2i**



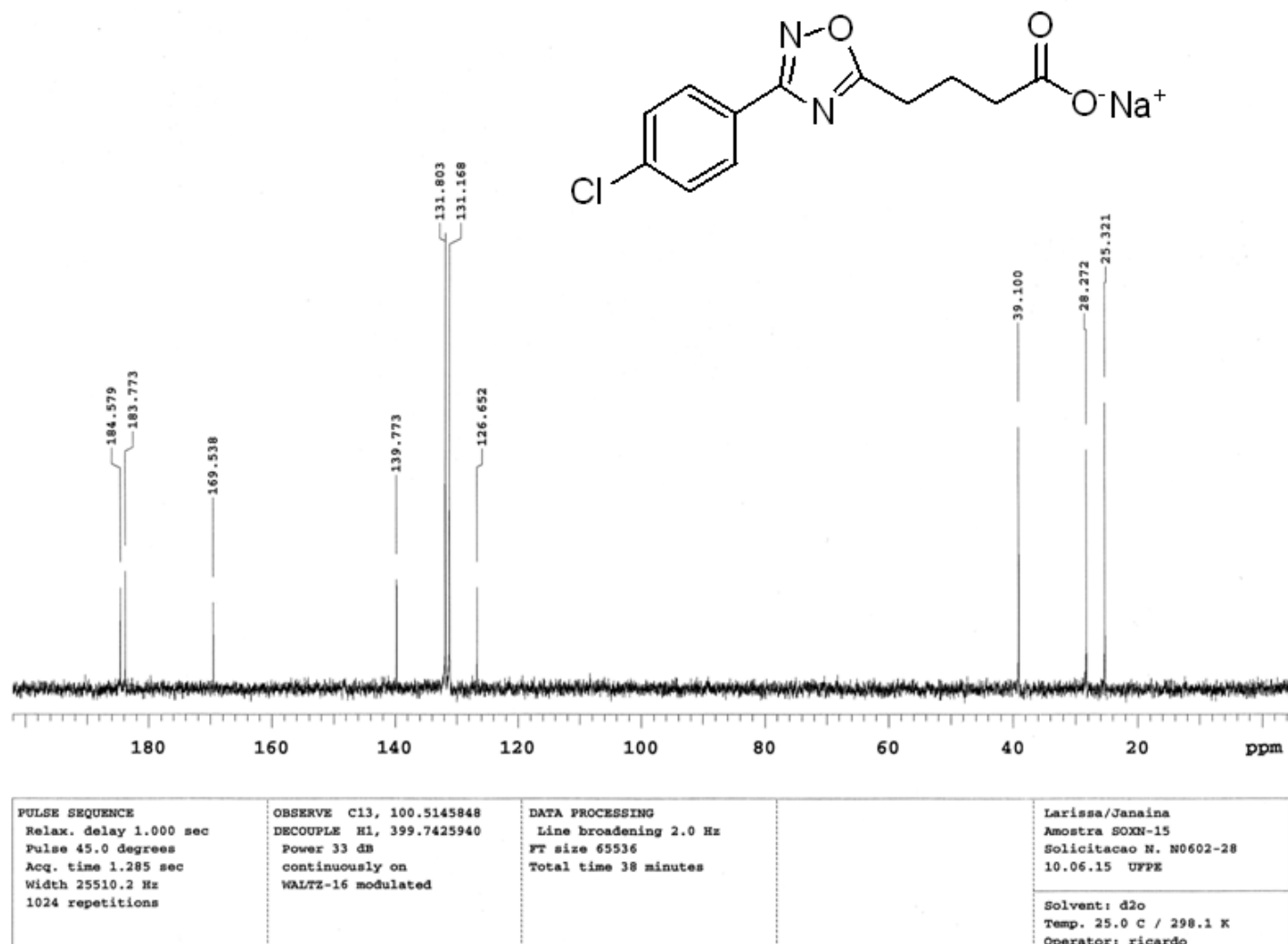
ANEXO Q: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2j**



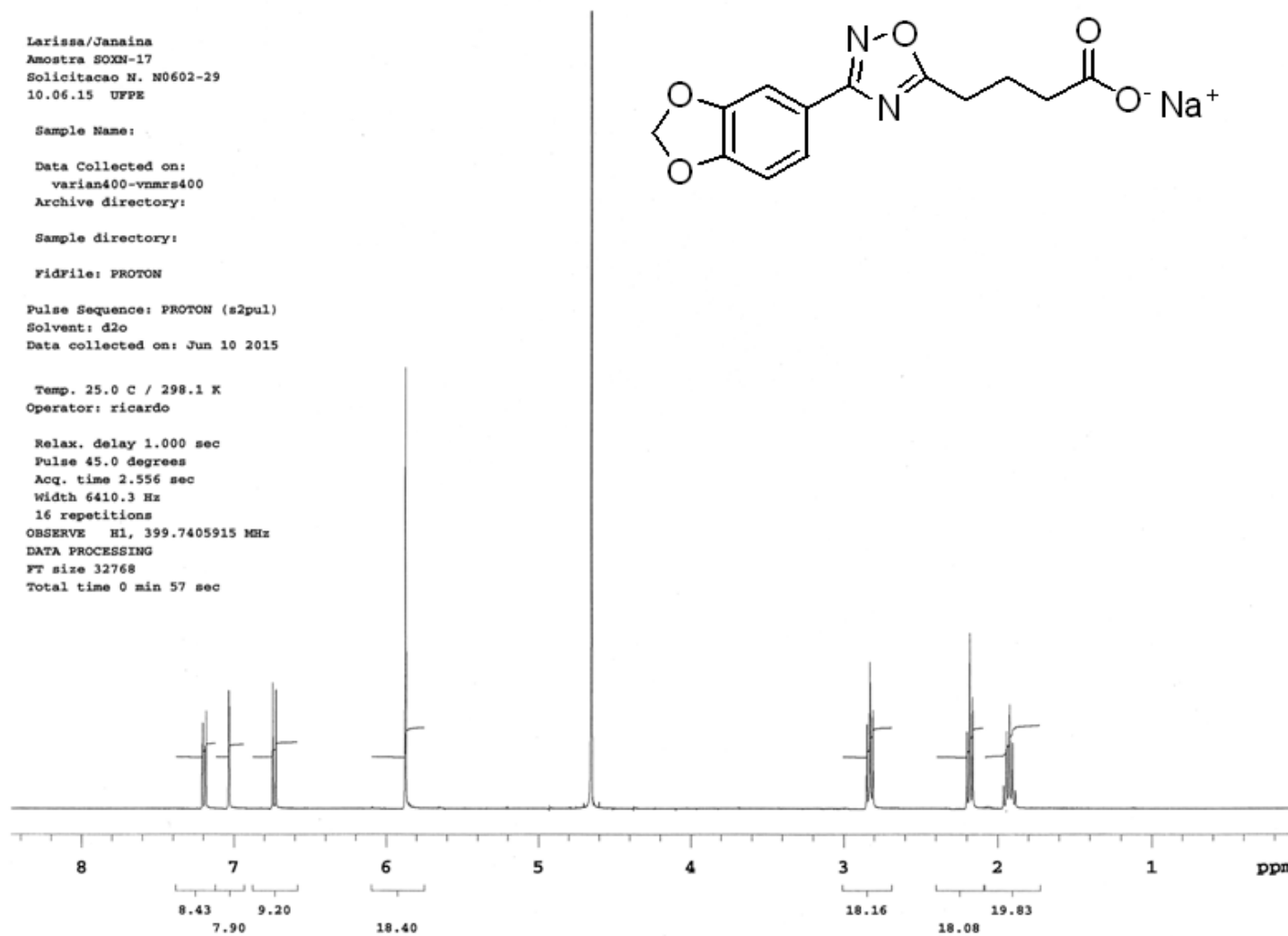
ANEXO R: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) do 4-(3-(4-iodofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio 2j



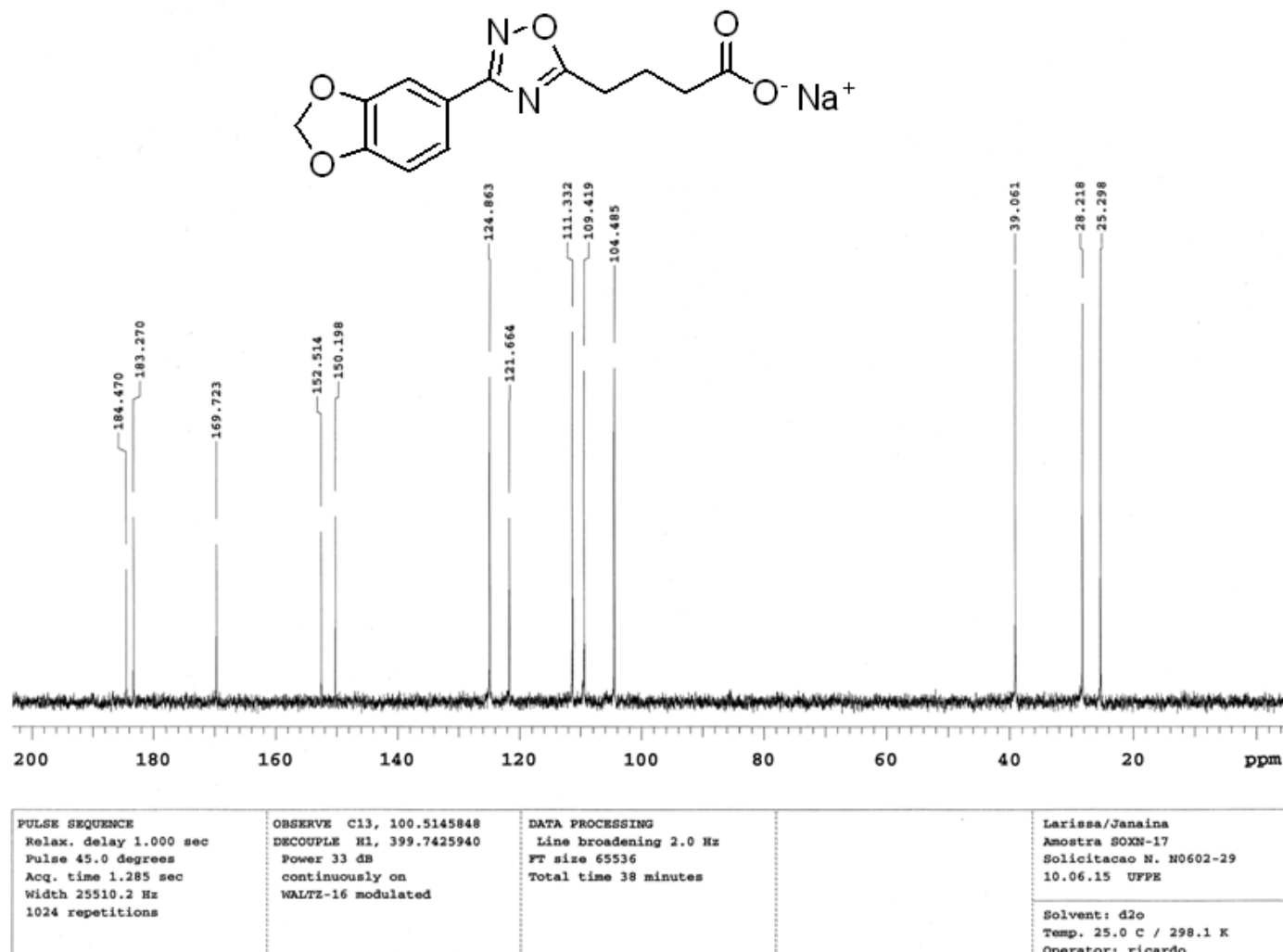
ANEXO S: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2k**



ANEXO T: Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz, D₂O) do 4-(3-(4-clorofenil)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **2k**



ANEXO U: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,2,4-oxadiazol-5-il)butanoato de sódio **21**



ANEXO V: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, D_2O) do 4-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)butanoato de sódio **2I**