

Ana Catarina Silva Monteiro

Colesterol Oxidase, Hormonas Sexuais e Suscetibilidade à Tuberculose: Um estudo exploratório

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica,
realizada sob orientação científica do Doutor Nuno Miguel da Silva Empadinhas
e co-orientação da Doutora Maria Manuel Cruz Silva,
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagem da capa:

Ilustração produzida pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infeciosas (NIAID) por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e exibindo um grupo de células de *Mycobacterium tuberculosis* (cor laranja). Cortesia da Biblioteca de Imagens de Saúde Pública do Centro para o Controlo e Prevenção de Doenças (CDC PHIL).

Cover image:

Illustration by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) obtained by scanning electron microscopy (SEM) and showing a group of *Mycobacterium tuberculosis* cells (orange). Courtesy of Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Image Library (CDC PHIL).

Agradecimentos

Os meus agradecimentos:

Ao Doutor Nuno Empadinhas por me ter aceite no grupo Micobacteriologia Molecular do CNC (projeto UID/NEU/04539/2013) e pela disponibilidade em orientar este trabalho, pelos valiosos esclarecimentos, opiniões e sugestões e pela partilha de conhecimentos relevantes à elaboração do trabalho.

À Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva por também me orientar neste trabalho e assumir a responsabilidade pela tese na FFUC, pela disponibilidade nos esclarecimentos e partilha de conhecimentos.

À Ana Maranha pela paciência e constante disponibilidade em me ensinar e por todo o tempo dispensado com valiosas indicações e ajudas na elaboração de todo o trabalho.

À Susana Alarico e à Mafalda Costa por se mostrarem também sempre disponíveis em ensinar-me e pelos momentos de companheirismo.

À Cristina, minha companheira de mestrado e de laboratório por me aturar estes 6 anos (desde licenciatura), pelos favores todos que me prestou e os bolinhos deliciosos para alegrar os momentos maus.

À Rita, à Daniela, ao Diogo e à Adele pelo companheirismo e espírito de entreajuda que foram criados todos os dias no laboratório.

Aos meus pais pelo apoio absoluto e incentivo constante que me deram sempre, pois sem eles nada era possível. A pessoa que sou hoje a eles lhe devo.

A todos os meus amigos que fizeram parte desta etapa da minha vida e por me encorajarem e levantarem o meu astral nos momentos mais desanimados, aproveitando ao máximo o último ano como estudante.

Ao meu namorado, Pedro Farias, por todo o amor, carinho e compreensão prestados ao longo deste trabalho, um suporte incondicional sempre a dar-me coragem para nunca desistir dos meus sonhos.

A todos vós, o meu sincero muito obrigada!

Índice

Resumo	7
Abstract	9
Lista de Abreviaturas	10
Capítulo 1 – Introdução	11
1.1 Micobactérias	12
1.1.1 Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)	13
1.1.1.1 <i>Mycobacterium marinum</i>	14
1.1.2 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC)	15
1.1.2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
1.2 Tuberculose	15
1.2.1 Tuberculose e Fatores de Risco	18
1.3 Suscetibilidade Sexual	19
1.4 Hormonas Esteróides	20
1.5 Metabolismo do Colesterol por <i>M. tuberculosis</i>	26
1.6 Colesterol Oxidase (ChoD)	27
1.7 Colesterol Desidrogenase ou Desidrogenase 3 β -Hidroxiesteróide (3 β -HSD)	29
1.8 Objetivo	31
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	32
2.1 Condições de Crescimento Bacteriano e Extração do DNA	33
2.2 Análise Bioinformática	33

2.3	Amplificação, Clonagem e Expressão dos Genes	33
2.3.1	Amplificação por PCR	33
2.3.2	Clonagem e Transformação das Células Competentes <i>E. coli</i> BL21 Star	35
2.3.3	Condições de Crescimento e Expressão das Proteínas Recombinantes	36
2.4	Purificação das Proteínas Recombinantes	36
2.5	Remoção da Cauda de Histidinas	37
2.6	Análise da Atividade Enzimática por Cromatografia de Camada Fina	38
2.7	Caraterização de Atividades Enzimáticas	38
2.7.1	Estudo dos Parâmetros para as Condições Ótimas da Colesterol Desidrogenase	39
2.7.2	Estudos de Inibição da Colesterol Desidrogenase por Compostos Esteróides	40
2.7.3	Cálculo das Constantes Cinéticas	40
Capítulo 3 – Resultados		42
3.1	Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes	43
3.2	Teste de Especificidade de Substrato por TLC	47
3.3	Influência da Cauda de Histidinas na Atividade da Colesterol Desidrogenase 3 β -HSD (<i>Rv1106c</i>)	49
3.4	Condições Ótimas de Atividade da Colesterol Desidrogenase 3 β -HSD (<i>Rv1106c</i>)	51
3.4.1	Perfis de Temperatura e pH	51
3.4.2	Efeito da Concentração de Colesterol	53
3.4.3	Efeito da Concentração do Cofator NAD	54
3.4.4	Efeito de Iões Mono e Divalentes	54
3.4.5	Inibição por Isopropanol, Triton X-100 e DMSO	56
3.4.6	Inibição por Colestenona e NADH	58

3.5	Inibição da Colesterol Desidrogenase 3 β -HSD (<i>Rv1106c</i>) por Compostos Esteróides	60
3.6	Cálculo das Constantes Cinéticas	64
Capítulo 4 – Discussão		66
Capítulo 5 – Conclusão		74
Bibliografia		77
Anexo I (Protocolos e Soluções)		85

Resumo

A Tuberculose (TB) infecta cerca de um terço da população mundial e é responsável por mais de 1,5 milhões de mortes por ano. O seu agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é facilmente disseminado quando pessoas infetadas tosem e libertam gotículas transportando bacilos que são inalados por pessoas não infetadas. Os obstáculos ao controle da TB manifestam-se na dificuldade do tratamento de pacientes em países em desenvolvimento, na sinergia com VIH e doenças crónicas como a diabetes e na emergência de resistências a diversos antibióticos em uso há décadas.

A incidência de TB é em média 2-3 vezes mais elevada em homens do que em mulheres (Neyrolles & Quintana-Murci, 2009). Os fatores socioeconómicos e culturais podem criar barreiras no acesso a cuidados de saúde, particularmente nos países em desenvolvimento, levando a um menor número de diagnósticos nas mulheres. No entanto, alguns mecanismos biológicos podem ser responsáveis por uma parte significativa dessa diferença entre sexos.

O papel do género foi investigado em algumas doenças infecciosas e não infecciosas, mas há ainda pouca informação sobre a influência biológica do género na TB. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel de hormonas sexuais, estrogénios e seus análogos, na inibição da enzima colesterol oxidase de *M. tuberculosis* uma enzima considerada crucial para sua patogénese (Klink et al., 2013). Dos 250 genes anotados em Mtb como envolvidos no metabolismo de lípidos e ácidos gordos (Wipperman et al., 2014) foram selecionados para este trabalho dois genes que codificam proteínas anotadas como sendo responsáveis pela oxidação de colesterol: colesterol oxidase/ChoD (*Rv3409c*) e colesterol desidrogenase/3 β -HSD (*Rv1106c*).

A função do gene *Rv3409c* está possivelmente mal anotada, não tendo sido detetada atividade de colesterol oxidase, sendo que o seu substrato fisiológico permanece um mistério. Estudos anteriores concluíram que 3 β -HSD é a única enzima de Mtb que oxida colesterol. Entre vários compostos esteróides testados como possíveis substratos de 3 β -HSD apenas colesterol, 16 α -hidroxipregnenolona, pregnenolona e DHEA (desidroepiandrosterona) foram oxidados, mas com eficiência decrescente e apenas finasterida e colestanoetriol inibiam ligeiramente a atividade nas condições testadas, e nenhuma das hormonas sexuais testadas inibiu a atividade de 3 β -HSD.

Este estudo desvenda novos dados sobre uma enzima essencial ao metabolismo de colesterol em Mtb, o que poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias de intervenção terapêutica,

colocando-nos mais próximos de desvendar novas pistas que possam ajudar a compreender a distribuição desequilibrada de TB entre os géneros masculino e feminino.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, colesterol oxidase, colesterol desidrogenase, esteróides

Abstract

Tuberculosis (TB) infects about one third of the world population and is responsible for more than 1.5 million deaths per year. The etiologic agent, *Mycobacterium tuberculosis*, is easily spread when infected people cough and release droplets carrying bacilli that are inhaled by uninfected people. Some of the major obstacles for TB control reside in the difficulty of treating patients in developing countries, in the synergy with HIV and chronic diseases such as diabetes and in the emergence of resistance to various dated antibiotics in use.

The incidence of TB is on average 2-3 times as high in men than in women (Neyrolles & Quintana-Murci, 2009). Socio-economic and cultural factors can create barriers to access to health care, particularly in developing countries, leading to fewer diagnoses in women. However, some biological mechanisms may also be responsible for a significant part of this gender bias.

The gender role was investigated in some infectious and non-infectious diseases. However, there is a lack of information on the biological impact of gender in TB. Thus, the aim of this work is to understand the role of sex hormones, especially estrogen and its analogues in the inhibition of the cholesterol oxidase from *M. tuberculosis*, an enzyme considered crucial for this organism's pathogenesis (Klink et al., 2013). Of the 250 genes annotated in Mtb genome as putatively involved in the metabolism of fatty acids and lipids (Wipperman et al., 2014) two genes annotated as coding for enzymes capable of oxidizing cholesterol, cholesterol oxidase/ChoD (*Rv3409c*) and dehydrogenase cholesterol/3 β -HSD (*Rv1106c*), were selected for this work.

The *Rv3409c* gene function is probably incorrectly assigned as cholesterol oxidase as we and others were not able to confirm this activity *in vitro*, which renders its physiological substrate still a mystery. Previous studies concluded that 3 β -HSD Mtb is the only enzyme that this bacterium uses to oxidize cholesterol. We tested various steroid analogs as possible substrates of this enzyme and found that it can use cholesterol, 16 α -hydroxypregnenolone, and pregnenolone and trace DHEA (dehydroepiandrosterone), with decreasing preference. Among the steroids tested as possible 3 β -HSD inhibitors only finasteride and colestanoetriol slightly inhibited enzyme activity, and none of the other sex steroid hormones inhibited enzyme activity.

This study reveals new data on an enzyme essential to Mtb cholesterol metabolism which could lead to the development of new future intervention strategies. Putting us closer to uncover clues that may help understand the unbalanced distribution of TB cases among males and females.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, cholesterol oxidase, cholesterol dehydrogenase, steroids

Lista de Abreviaturas

ChoD – Colesterol Oxidase

DHEA – Desidroepiandrosterona

FPLC – Cromatografia Rápida de Proteína Líquida

GMC – Oxidorredutase Glicose/Metanol/Colina

MNT – Micobactérias Não-Tuberculosas

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

MTC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia

RGM – Micobactérias de Crescimento Rápido

SDS-PAGE – Sulfato de Dodecil de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

SGM – Micobactérias de Crescimento Lento

TB – Tuberculose

TLC – Cromatografia de Camada Fina

VAO – Oxidase do Álcool Vanílico

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

3 β -HSD – Colesterol Desidrogenase / Desidrogenase 3 β -Hidroxiesteróide

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1 Micobactérias

Embora a tuberculose (TB) seja uma das doenças mais antigas que a humanidade conhece, o seu agente etiológico só foi identificado no final do século XIX com a descoberta do bacilo da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A classificação sistemática das micobactérias começou em 1896, quando Lehmann e Neumann propuseram a criação do género *Mycobacterium* incluído na família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e pertencente à classe *Actinobacteria* (Shinnick & Good, 1994). Com a acessibilidade a técnicas de biologia molecular nos últimos anos, a micobacteriologia clássica assistiu a uma “explosão” no número de novas espécies descritas com mais de 170 espécies presentemente incluídas no género *Mycobacterium* (<http://www.bacterio.net/>) (Tortoli, 2012). O género inclui bactérias muito diversas desde *M. leprae*, um organismo patogénico obrigatoriamente intracelular causador da doença conhecida como lepra, e por exemplo *M. hassiacum*, um organismo ambiental termotolerante cuja temperatura ótima de crescimento é 50°C e muito raramente isolado de humanos (<http://jb.asm.org/content/194/24/7010.full>).

As micobactérias apresentam forma de bastonete e são bactérias aeróbias, não móveis, não formam esporos e têm uma parede celular característica rica em lípidos hidrofóbicos. Esta parede é extremamente impermeável e crucial para a sobrevivência das micobactérias nos mais diversos ambientes, incluindo o interior do macrófago do hospedeiro infetado com Mtb, tornando-as também resistentes a diversos agentes agressores, incluindo antibióticos (Rastogi et al., 2001). Embora sendo resistentes à deteção de rotina por coloração de Gram, estas bactérias são ácido-álcool resistentes e podem ser identificadas pela retenção do corante fucsina fenicada mesmo na presença de uma solução de álcool-ácido (Rastogi et al., 2001).

Tradicionalmente, as micobactérias são divididas em dois grupos com base no tempo requerido por cada espécie para formar colónias visíveis em meio sólido: as micobactérias de crescimento lento (SGM para “slowly-growing mycobacteria”) necessitam de 7 ou mais dias de incubação para as suas colónias serem visualizadas a olho nú, enquanto as micobactérias de crescimento rápido (RGM, “rapidly-growing mycobacteria”) formam colónias visíveis em menos de 7 dias. A patogenicidade das micobactérias é, geralmente, associada ao grupo SGM, enquanto o grupo RGM inclui maioritariamente micobactérias saprófitas ambientais (Primm et al., 2004; Shinnick & Good, 1994), havendo exceções em ambos os grupos.

As micobactérias que causam tuberculose, humana ou animal, são organismos geneticamente muito próximos que são incluídas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). As restantes são denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT) e são frequentemente saprófitas ambientais e membros inerentes das comunidades microbianas do solo e da água, podendo no entanto causar infeções oportunistas em humanos e outros animais (Ingen et al., 2012).

1.1.1 Micobactérias Não Tuberculosas (MNT)

As micobactérias não tuberculosas (MNT) são espécies ambientais patogénicas oportunistas que compartilham o seu habitat natural com seres humanos e animais, encontrando-se no solo, águas naturais e sistemas de distribuição de água (Falkinham, 2009, 2010, 2015; Mcgrath et al., 2010). Estas micobactérias ambientais são oligotróficas (capazes de crescer em locais com baixa concentração de nutrientes), têm uma alta tolerância a temperaturas e pHs extremos, e até mesmo a baixas concentrações de oxigénio. São capazes de formar biofilmes e de se adaptar a condições adversas, características que contribuem para a sua elevada resistência a compostos químicos desinfetantes e antibióticos. Devido à sua presença no ambiente humano, as atividades humanas, como a desinfeção e a poluição das águas, têm tido impactos diretos sobre a sua ecologia e na sua epidemiologia (Falkinham, 2010, 2015).

Devido a um aumento na incidência e prevalência de infeções por MNT nos últimos anos na população humana, estas bactérias têm vindo a ganhar notoriedade. A maioria dos casos são reportados em países com baixas taxas de incidência de TB, mas estima-se que em países com altas taxas de incidência de TB a ocorrência de infeções por MNT possa estar a ser subestimada pelo facto de a pesquisa laboratorial estar otimizada para membros do complexo MTBC (Prevots & Marras, 2016; Werf et al., 2014). Para além da diversa manifestação pulmonar, a infeção por MNT pode ocorrer na pele e tecidos moles, pode causar linfadenite e doenças gastrointestinais (Mcgrath et al., 2010; Nunes-Costa et al., 2016). Os pacientes internados em hospitais são alvos frequentes de infeção hospitalar, especialmente aqueles que são submetidos a cirurgias ou tratamentos envolvendo cateteres, tais como tratamentos de diálise (Phillips & Reyn, 2001), sendo que o maior grupo de risco para infeções MNT são pessoas VIH positivas.

Apesar de diferentes espécies de MNT diferirem no seu potencial patogénico e, salvo algumas exceções, estas bactérias serem geralmente caracterizadas por uma patogenicidade moderada, a ocorrência de infeções por MNT está a aumentar, tanto em indivíduos imunodeprimidos como

em indivíduos saudáveis. O diagnóstico deste tipo de infecções é geralmente dificultado pelo desconhecimento do organismo causador (Tortoli, 2014).

I.I.I.I *Mycobacterium marinum*

Em 1926, Aronson isolou e descreveu uma micobactéria responsável pela morte de peixes de água salgada num aquário na Filadélfia, a qual foi designada *Mycobacterium marinum* (Gluckman, 1995; Slany et al., 2012). *M. marinum* é um agente patogénico capaz de causar uma doença semelhante à tuberculose em organismos ectotérmicos, nomeadamente em peixes. É também um agente patogénico oportunista em humanos, capaz de infetar os tecidos moles das extremidades devido ao contacto com a água contaminada (Dolenc-Voljc & Zolnir-Dove, 2010).

O *M. marinum* é um organismo fotocromogénico, produzindo uma cor amarela característica quando é exposto à luz, a sua temperatura de crescimento ótima é de 25-35°C, crescendo com dificuldade a 37°C, e o seu tempo de geração é aproximadamente 4/5 horas (Tobin & Ramakrishnan, 2008). Devido ao seu baixo grau de patogenicidade é considerado um organismo de nível de biossegurança 2 (BLS2) (escala de 1 a 4).

O *M. marinum* é comumente utilizado como organismo modelo para o estudo de *M. tuberculosis* porque, à exceção dos organismos pertencentes ao MTBC, é o organismo geneticamente mais próximo de *Mtb*, tendo ainda um hospedeiro natural e um modo de infeção semelhante ao de *Mtb*. Esta relação genética estreita entre *M. tuberculosis* e *M. marinum* foi confirmada por comparação dos seus genomas, onde partilham 3000 genes ortólogos cujas proteínas correspondentes têm uma identidade de aminoácidos muito elevada, próxima de 85% (Stinear et al., 2008). Uma vez que *Mtb* é um organismo com um tempo de geração fastidiosamente longo (cerca 24h) e necessita de medidas acrescidas de segurança para ser manipulado em condições de biosegurança superiores (BSL3) (Smith, 2003), a baixa perigosidade e baixo tempo de geração de *M. marinum* facilita a sua manipulação em ambiente laboratorial, tornando-o muito atrativo como organismo modelo para estudos de tuberculose.

1.1.2 Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto por 10 membros que compartilham 99% de semelhança a nível genético, mas que diferem grandemente na sua distribuição geográfica e tropismo para o hospedeiro. As estirpes que causam tuberculose em animais incluem *M. bovis*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis*, *M. mungi* e *M. suricattae* (Tortoli, 2014). As estirpes mais frequentemente associadas a infecção humana são *M. africanum*, *M. canetti* e *M. tuberculosis*, sendo este último o mais relevante (Clarke et al., 2010).

1.1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Apesar de afetar a humanidade possivelmente desde sempre, a causa da tuberculose foi até há bem pouco tempo desconhecida. No século XIX, a tuberculose era uma das mais comuns causas de mortalidade na Europa e, no entanto, a doença continuava a ser um mistério sem cura (Smith, 2003). As primeiras pistas da sua natureza infecciosa surgem em 1865 quando o médico francês Jean-Antoine Villemin consegue infectar coelhos com tuberculose (Daniel, 2006). Todavia, o bacilo *M. tuberculosis* apenas foi descoberto e isolado pela primeira vez pelo Dr. Robert Kock em 1882 (Murray et al., 2015), quando a etiologia da tuberculose e a sua natureza infecciosa foram definitivamente demonstradas.

1.2 Tuberculose

Estima-se que *M. tuberculosis* infecte cerca de um terço da população mundial e seja responsável por mais de 1,5 milhões de mortes por ano (OMS, 2015). Apesar de existir antibioterapia disponível, esta doença continua a ser uma das maiores ameaças de saúde global.

A tuberculose é mais prevalente na África e em países asiáticos (em desenvolvimento) o que se torna um grande obstáculo ao seu tratamento e prevenção. O tratamento da TB constitui um enorme desafio terapêutico, dado que para além da capacidade inata que *M. tuberculosis* tem para sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro, designadamente pela presença de uma parede espessa e impermeável única, é também capaz de resistir à maioria dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente. Como resultado as opções quimioterapêuticas existentes para o tratamento de TB são severamente limitadas. A rápida evolução de Mtb torna-o cada vez

mais resistente aos medicamentos disponíveis para a TB, o que faz com que terapias inovadoras sejam urgentemente necessárias (Dye, 2009; Nguyen, 2016).

A TB é disseminada quando pessoas infetadas tosem ou espirram aerossolizando gotículas que transportam estes bacilos (Glickman & Jacobs, 2001). As gotículas infetadas são inaladas passando pelas barreiras das vias aéreas superiores e chegando aos alvéolos pulmonares onde Mtb é fagocitado pelos macrófagos alveolares (Kaufmann & McMichael, 2005; Korb et al., 2016). Nesta fase apenas alguns indivíduos saudáveis infetados desenvolvem tuberculose ativa. Nos restantes, a bactéria pode ser eliminada por mecanismos de imunidade inata (O'Garra et al., 2013). Noutros casos, é apenas circunscrita, não sendo eliminada pelo sistema imunitário e entrando numa fase latente que, em cerca de 10% dos indivíduos será reativada mais tarde, por exemplo, se o sistema imune do hospedeiro ficar comprometido (Chisholm & Tanaka, 2016). Assim que este sistema de contenção do bacilo falha, a bactéria consegue replicar-se no interior do macrófago. Durante este processo, os macrófagos alveolares secretam citocinas e quimiocinas, induzindo uma resposta inflamatória local e a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local da infeção (Russell, 2007). A apresentação de antígenos de Mtb por células dendríticas a linfócitos T nos nódulos linfáticos induz a migração dos linfócitos para o local da infeção, provocando a formação de um agregado compacto de células imunes típico da TB denominado granuloma.

O *Mycobacterium tuberculosis* tem, assim, a capacidade de sobreviver não só no interior do ambiente hostil do macrófago, mas também nos granulomas que apresentam níveis baixos de oxigénio, pH e nutrientes. Consequentemente, é capaz de inibir a acidificação vacuolar e bloquear a fusão de blocos fagolisossomais, criando um abrigo protegido onde pode permanecer e replicar e até ficar num estado assintomático durante meses ou até mesmo anos (Fortune & Rubin, 2007; Galagan, 2014). O granuloma consiste no recrutamento de macrófagos ativados por linfócitos T através da produção de interferão (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), tendo estas citocinas como função conter os bacilos no interior destas estruturas (Kaufmann & McMichael, 2005). Nestas estruturas histopatológicas encontram-se vários tipos de macrófagos diferenciados em células epitelioides ou fundidos para formar células gigantes multinucleadas, e encontram-se também macrófagos com acumulação de corpos lipídicos que são chamados “macrófagos espumosos” (Korb et al., 2016). Devido à sua composição lipídica, estes macrófagos espumosos ficam com uma estrutura que deveria ajudar na contenção do bacilo, contribuindo para a sua sobrevivência e disseminação. Consequentemente, promove a infeção, visto que o Mtb tem a

capacidade de utilizar estes compostos lipídicos, nomeadamente o colesterol, como fonte de carbono (Korb et al., 2016; Davis & Ramakrishnan, 2009). Quando o sistema imune do hospedeiro é de alguma forma prejudicado e o granuloma não é mais capaz de conter o bacilo dá-se a sua liquefação, levando à formação de uma cavidade no pulmão (Russell, 2007). Nesta fase, o bacilo pode atingir números muito elevados e o risco de contágio é muito grande. Este processo pode resultar não só na aerossolização de bactérias e infeção de outros indivíduos, como na libertação de bactérias viáveis para a corrente sanguínea, originando focos de infeção noutras órgãos e novos ciclos de fagocitose por outros macrófagos (Korb et al., 2016; Kaufmann & McMichael, 2005; Russell, 2007) (Figura 1).

A reativação da infeção latente por Mtb ocorre frequentemente em pessoas aparentemente saudáveis, mas é muito frequente em pessoas imunodeprimidas por fatores como, serem portadoras do vírus VIH, má nutrição, envelhecimento ou até mesmo gravidez. A TB pode tornar-se uma doença crónica e debilitante, apresentando sintomas como tosse com secreção, febre e perda de peso (Glickman & Jacobs, 2001).

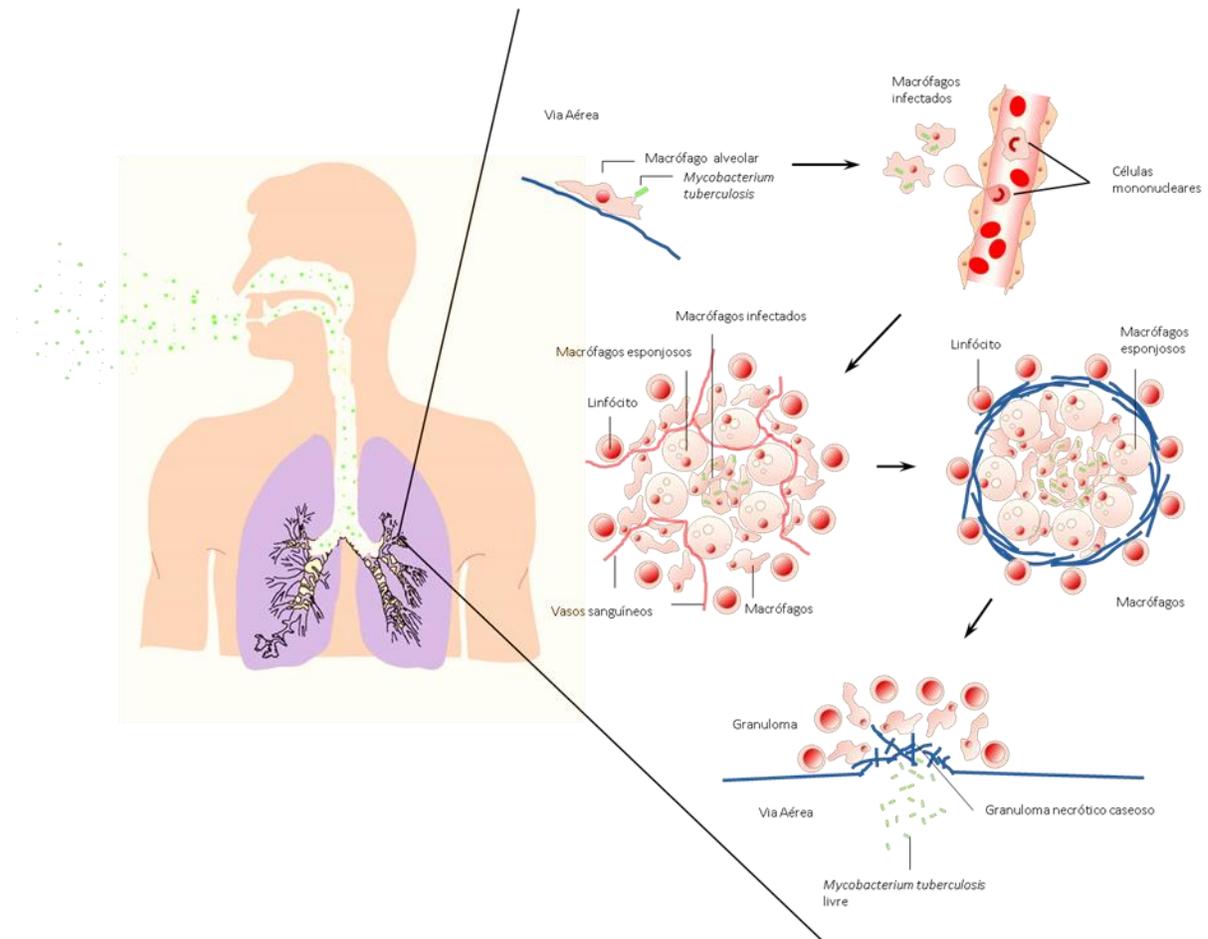


Figura I - Ciclo de infecção por *M. tuberculosis*. Os macrófagos alveolares fagocitam as bactérias inaladas. Após a fagocitose, são recrutadas para a zona de infecção células do sistema imune inato e adaptativo, dando origem à formação de um granuloma. Os bacilos podem ser contidos no interior destas estruturas por longos períodos de tempo. Contudo, quando o sistema imune enfraquece, os bacilos podem reiniciar a replicação e um granuloma necrótico caseoso forma-se, permitindo a libertação de *M. tuberculosis* para as vias aéreas. Adaptado (Russell, 2007).

1.2.1 Tuberculose e Fatores de Risco

A existência de certas co-morbilidades ou fatores ambientais faz com que suscetibilidade para a infecção por tuberculose aumente significativamente. O fator de risco mais significativo para ocorrência de tuberculose é co-infecção com o vírus VIH que importa um risco de cerca 40 vezes superior à restante população para o desenvolvimento de TB e um risco 100 vezes superior de reativação de doença latente (Ai et al., 2016). Outros fatores de risco incluem doentes

transplantados sujeitos a terapia imunossupressora (risco 10-20 vezes superior), doentes com problemas renais crónicos submetidos a diálise (7-50 vezes), má nutrição ou peso anormalmente baixo (12 vezes) (Dheda et al., 2015). Um dos fatores de risco atuais mais preocupantes é a ocorrência de diabetes que aumenta o risco de incidência de TB em 2 a 8 vezes (Ai et al., 2016). Outros fatores de risco comuns incluem consumo de álcool (>40 g/dia) (Lonnroth et al., 2009) e tabagismo que aumentam cerca de 2 vezes a suscetibilidade para a TB. A pobreza e os ambientes sobrelotados também são considerados um fator de risco para ocorrência de TB. A existência de certos polimorfismos no genoma do hospedeiro é um dos fatores diferenciadores conhecidos para as distintas suscetibilidades de indivíduos a infeção. Recentemente, o sexo foi considerado como um fator de risco importante para TB, dado que os dados epidemiológicos reportam uma ocorrência até 2-3 vezes superior em homens adultos em relação às mulheres (Neyrolles & Quintana-Murci, 2009).

1.3 Suscetibilidade Sexual

As doenças infecciosas raramente afetam de igual modo homens e mulheres e a tuberculose não é exceção. A incidência de TB pulmonar reportada é em média duas vezes mais elevada em homens do que em mulheres, sendo esta diferença verificada apenas em indivíduos adultos (Bini et al., 2014). É necessário referir que os padrões de vigilância da OMS apenas se aplicam à TB considerada contagiosa, a TB pulmonar. As taxas de incidência em relação ao sexo na TB extrapulmonar e nas infeções pulmonares por MNT não são completamente claras, dado que não são doenças de notificação obrigatória em todos os países, logo os dados epidemiológicos existentes são escassos (Yang et al., 2004).

Uma vez que os fatores socioeconómicos e culturais criam barreiras no acesso a cuidados de saúde, existe um sério risco de o número de casos de mulheres com TB ser largamente subestimado em países em desenvolvimento. Muitas vezes as mulheres, pelo seu papel de prestadoras de cuidados em casa, estão restritas a um limitado espaço geográfico não tendo tempo, capacidade económica ou facilidade de acesso aos cuidados de saúde. Um outro fator que pode dificultar o diagnóstico de TB em mulheres prende-se com o facto de poderem existir diferenças no tipo de apresentação clínica da doença entre homens e mulheres, (ex: duração do período de tosse), complicando a capacidade de um médico reconhecer sintomas chave. Para além disso, a interação com outros fatores de risco, tais como tabagismo, consumo de álcool e

diferenças nutricionais, podem ter um impacto no padrão sociocultural influenciado pelo gênero (Thorson & Diwan, 2001; Neyrolles & Quintana-Murci, 2009; Nhamoyebonde & Leslie, 2014).

Apesar dos fatores acima considerados, a diferença de incidência de TB pulmonar entre homens e mulheres parece ser genuína e a existência de fatores biológicos que levem a uma disparidade na suscetibilidade à infecção entre os sexos tem sido sugerida. Estes fatores biológicos seriam de origem metabólica e influenciados pelo sexo, porque a diferença é notada apenas em indivíduos após a adolescência o que envolveria a participação das hormonas sexuais na regulação da atividade do sistema imunitário (Thorson & Diwan, 2001). Por exemplo, a testosterona, o androgénio masculino circulante em maior concentração, e a progesterona, a hormona responsável pela manutenção da gravidez, têm funções imunossupressoras e ambas diminuem a ativação dos macrófagos, podendo ter um efeito deletério na suscetibilidade a TB (Bini et al., 2014). Por outro lado, concentrações fisiológicas de estrogénios são consideradas pro-inflamatórias ativando o sistema imunitário (Bini et al., 2014). As células do sistema imunitário inato, macrófagos e linfócitos têm recetores para androgénios, estrogénios e progesterona, estando estas hormonas presentes na participação do desenvolvimento e da função dos macrófagos e dos linfócitos, bem como na instalação e progressão de diversas doenças infecciosas (Bini et al., 2014).

1.4 Hormonas Esteróides

Os esteróides são um grande grupo de compostos lipossolúveis, possuindo uma estrutura química denominada ciclopentano per-hidrofenantreno, ou seja, um sistema tetracíclico per-hidrofenantrenico, sendo os anéis ciclo-hexano comumente denominados A, B e C, ligados a um anel D ciclopentano (Figura 2) (Miller & Auchus, 2011).

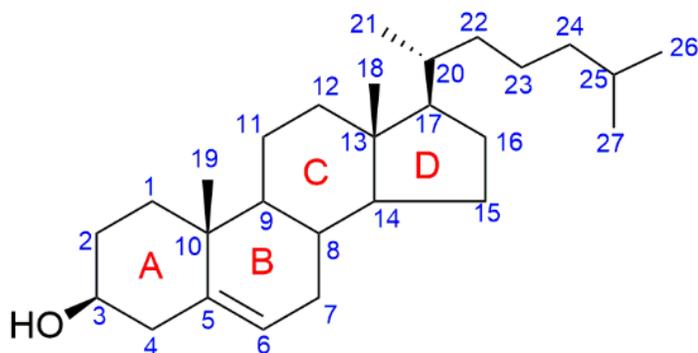


Figura 2 - Estrutura do colesterol, que ilustra a estrutura ciclopentano per-hidrofenantreno comum a todos os esteróides. Os átomos de carbono estão numerados e os anéis indicados com letras.

O colesterol (colest-5-en-3 β -ol) é um álcool policíclico de cadeia longa, um componente importante de lípidos nas membranas celulares na maioria dos vertebrados e o principal esterol sintetizado pelos animais. É o precursor chave na biossíntese de ácidos biliares, vitamina D e hormonas esteróides (Faletrov et al., 2013). Os esteróides partilham o mesmo esqueleto de quatro anéis hidrocarbonados (C1 a C17) diferindo apenas na presença de grupos funcionais na estrutura tetracíclica e nas cadeias laterais a ele ligadas (Miller & Auchus, 2011).

As hormonas esteróides são indispensáveis para a vida dos mamíferos, sintetizadas a partir do colesterol através de vias biossintéticas complexas, sendo inicializadas por enzimas especializadas em tecidos específicos encontrados na mitocôndria ou retículo endoplasmático, podendo ser produzidos no córtex adrenal, testículos, ovários e na placenta. Posteriormente, são libertadas para a corrente sanguínea de modo a desempenharem a sua função tanto em tecidos periféricos como no sistema nervoso central. (Miller, 2013). É bem reconhecido que as gónadas produzem esteróides sexuais, enquanto as glândulas supra-renais ou córtex adrenal produzem glucocorticóides e mineralocorticóides (Figura 3) (Luu-The, 2013).

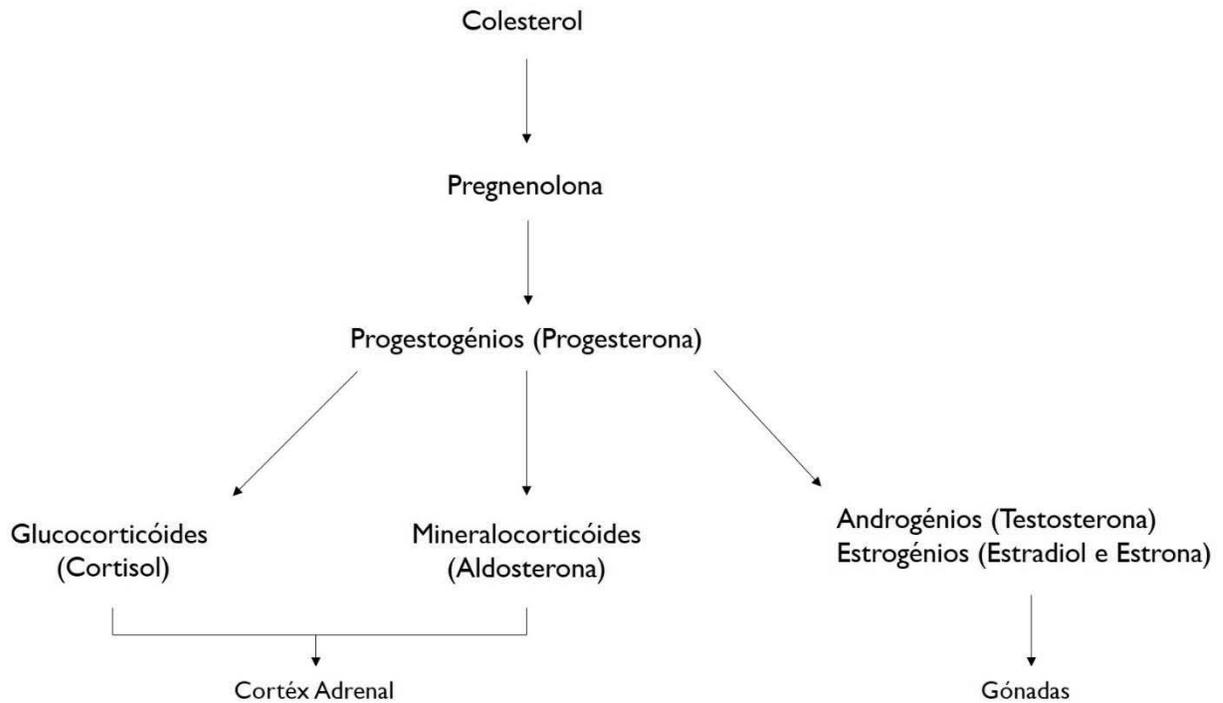


Figura 3 – Representação do colesterol como precursor da biossíntese das hormonas esteróides.

A esteroidogénese, representada na Figura 4, é o processo em que o colesterol é convertido em hormonas esteróides biologicamente ativas e o primeiro passo desta via é a conversão do colesterol em pregnenolona (3β -hidroxipreg-5-en-20-ona) (Miller & Auchus, 2011). A pregnenolona serve como o principal precursor para todas as hormonas esteróides (progestogénios ou progestinas, mineralocorticóides, glucocorticóides, androgénios e estrogénios), é biologicamente ativa e atua como um neuroesteróide sendo produzida no cérebro tendo assim efeitos diretos nos recetores principais do sistema nervoso central (Meieran et al., 2004).

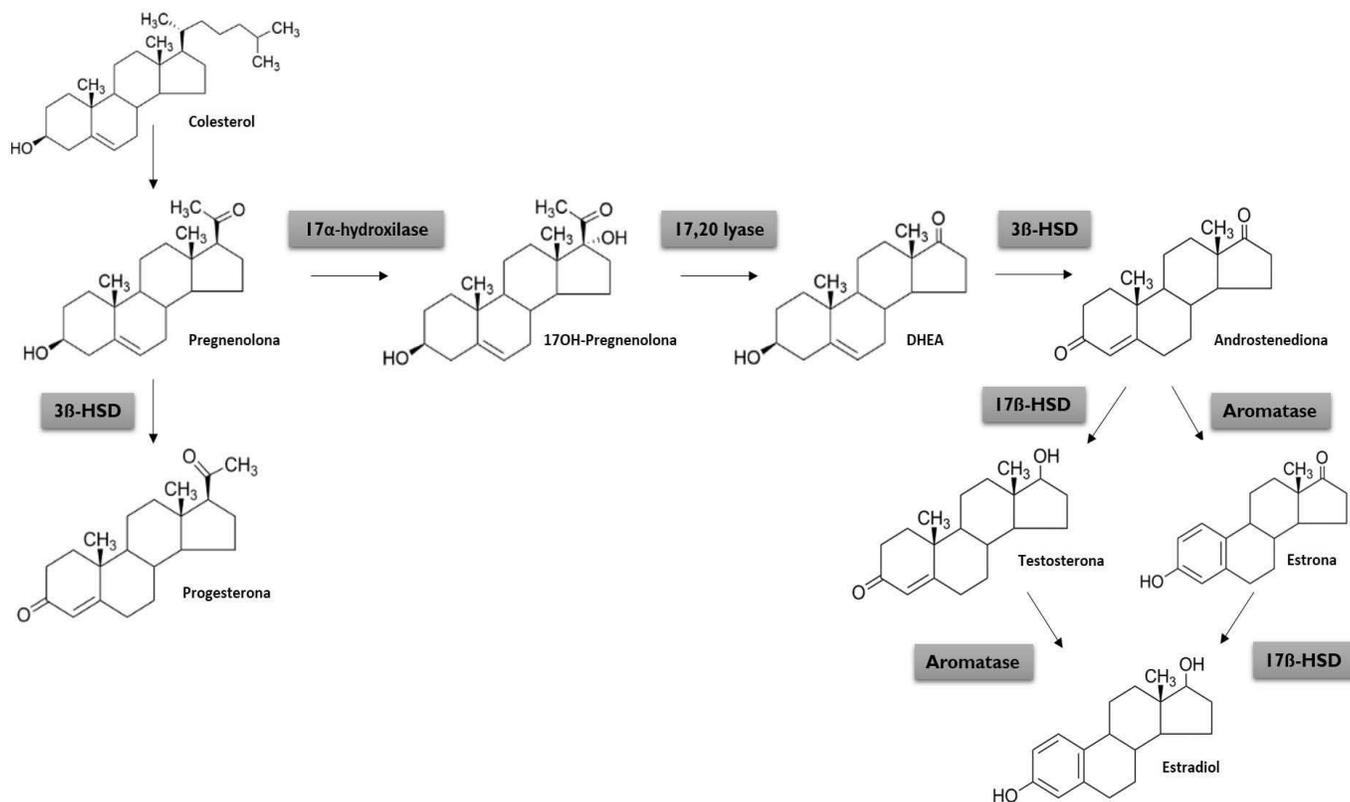
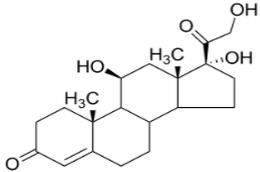
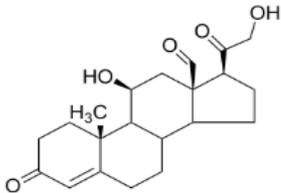
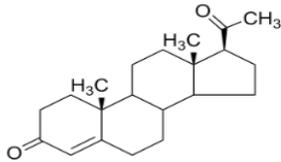
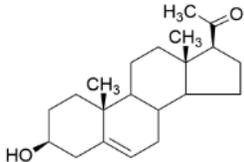
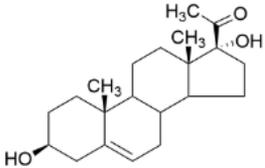
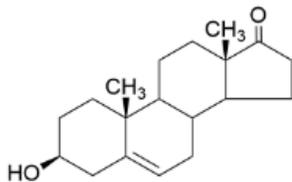


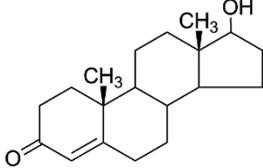
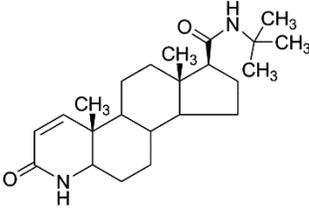
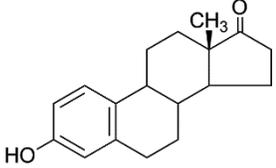
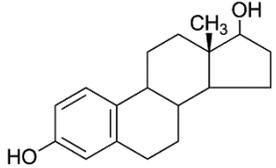
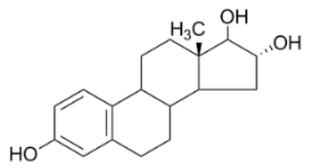
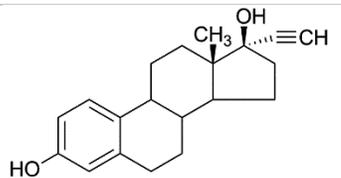
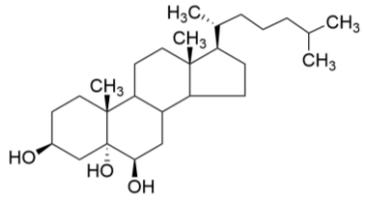
Figura 4 - Biossíntese de hormônios sexuais esteróides e enzimas envolvidas. Adaptado (Taraborrelli, 2015).

A enzima Desidrogenase 3β-Hidroxiesteróide (3β-HSD) de *Mtb* partilha 29% de identidade de sequência de aminoácidos com o tipo I e II da 3β-HSD humana e estas enzimas catalisam as mesmas reações (Thomas et al., 2011).

Para além das hormônios esteróides representadas na Figura 4, existem ainda outras hormônios provenientes da mesma via biossintética, bem como uma grande diversidade de hormônios e anti-hormônios de origem sintética, usadas no tratamento de patologias relacionadas com esta classe de moléculas. A tabela I mostra alguns exemplos de compostos esteróides e suas funções biológicas.

Tabela I – Compostos Esteróides

	Compostos Esteróides	Estrutura	Tecido de Síntese	Função
Glucocorticóides	Cortisol (11 β ,17 α ,21-tri-hidroxi-pregn-4-en-3,20-diona)		Córtex Adrenal	Imunossupressão
Mineralocorticóides	Aldosterona (11 β ,21-di-hidroxi-3,20-dioxopregn-4-en-18-al)		Córtex Adrenal	Regulação da pressão arterial
Progestogénios ou Progestinas	Progesterona (pregn-4-en-3,20-diona)		Ovários / Placenta	Hormona sexual feminina. Regula as mudanças cíclicas no endométrio do útero
	Pregnenolona (3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona)		Tecidos esteroidogénicos	Precursor de hormonas
	17 α -hidroxipregnenolona (17 α -hidroxipregn-5-en-20-ona)		Ovários	Precursor da DHEA
Androgénios	Desidroepiandrosterona (DHEA) (3 β -hidroxiandrost-5-en-17-ona)		Córtex adrenal, ovários e testículos	Intermediário metabólico na biossíntese de esteróides sexuais androgénios e estrogénios

Androgénios	<p>Testosterona (17β-hidroxiandrost-4-en-3-ona)</p> 	Testículos	Hormona sexual masculina
	<p>Finasterida (N-(2-metil-2-propil)-3-oxo-4-aza-5α-androst-1-en-17β-carboxamida)</p> 	4-azaesteróide sintético análogo da testosterona	Inibidor da enzima 5α-redutase. Tratamento da hiperplasia benigna da próstata.
Estrogénios	<p>Estrona (3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona)</p> 	Ovários	Hormonas sexuais femininas.
	<p>Estradiol (estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol)</p> 		
	<p>Estriol (estra-1,3,5(10)-trien 3,16α,17β-triol)</p> 	Placenta	Hormona sexual feminina. Manutenção da gravidez e desenvolvimento fetal
	<p>Etinilestradiol (17α-etinil-estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol)</p> 	Hormona sintética	Contraceptivo oral
Oxisterol	<p>Coletanotriol (colestano-3β-5α-6β-triol)</p> 	Oxisterol	Produzido <i>in vivo</i> por oxidação química e/ou enzimática do colesterol. Citotóxico.

As hormonas esteróides são indispensáveis para a vida dos animais vertebrados, desempenhando variadas funções desde coordenar o processo de maturação sexual e de reprodução, a regular o normal funcionamento do aparelho reprodutor. Têm ainda funções mais

abrangentes atuando no desenvolvimento e manutenção de muitos tecidos nos mamíferos, como o tecido muscular, ossos, fígado, rins e cérebro. Para além disso, podem até influenciar a função cardiovascular e processos inflamatórios, tendo vários efeitos no sistema imune (Reading et al., 2003) regulando a atividade das células imunitárias incluindo linfócitos, macrófagos, granulócitos e mastócitos, e assim, provocar implicações fisiológicas e patológicas. As hormonas sexuais esteróides também têm um efeito direto sobre o metabolismo bacteriano, crescimento e a expressão de fatores de virulência (García-Gómez et al., 2013).

1.5 Metabolismo do Colesterol por *M. tuberculosis*

A utilização de colesterol como fonte de carbono em bactérias está pouco descrita e pouco estudada, apenas algumas espécies de bactérias como *Comamonas testosteroni*, algumas espécies de *Pseudomonas* e algumas espécies de Actinomicetos (ex: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordonia*) (Merino et al., 2012; Wipperman et al., 2014) o conseguem fazer. Nos últimos anos, a importância do metabolismo do colesterol para as micobactérias tem vindo a ser estudada em detalhe.

O metabolismo de organismos patogénicos intracelulares e dos seus hospedeiros são mutuamente influenciados, e no caso particular de *Mtb*, que reside num ambiente com acesso limitado a nutrientes, os compostos lipídicos da célula hospedeira são preferencialmente utilizados pela bactéria, tornando-se os mediadores da interação bactéria-hospedeiro, e funcionando simultaneamente como fonte metabólica para a bactéria e como modelador do sistema imunitário do hospedeiro (Lovewell et al., 2016).

A importância do metabolismo do colesterol para *Mtb* é uma descoberta recente e, ao contrário do bem estudado metabolismo do colesterol em mamíferos, o metabolismo do colesterol em micobactérias é ainda algo misterioso. Ao contrário dos eucariotas, as bactérias não sintetizam colesterol e não contêm colesterol na sua membrana plasmática (Ouellet et al., 2011). Durante muito tempo, o tipo de compostos lipídicos que *Mtb* seria capaz de metabolizar levantou muitas dúvidas até que em 2007 foi identificado um sistema dedicado ao transporte e degradação de colesterol (Geize et al., 2007). Posteriormente, foi descoberto que o metabolismo de colesterol é essencial para a sobrevivência de *Mtb* durante a infeção (Pandey & Sassetti, 2008). Após a infeção, o *Mtb* altera a fisiologia das células do hospedeiro, nomeadamente o ambiente intracelular do macrófago, causando a desregulação da biossíntese lipídica. Uma das consequências

desta desregulação é a acumulação de células com corpos lipídicos no granuloma, tornando-o um local permissivo à persistência de Mtb. Apresenta, ainda uma maior abundância de lípidos e moléculas de colesterol comparado com o tecido pulmonar não infectado, sendo esta composição muito conveniente para Mtb, pois tem a capacidade de utilizar esteróides, como o colesterol, como fonte de carbono (Brzostek et al., 2009; Wipperman et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos na importação de colesterol e subsequente degradação ainda não são totalmente conhecidos. Estudos recentes indicam que os compostos acetil coA, propionil coA e piruvato são os principais intermediários metabólicos gerados da degradação de colesterol. Estes vão alimentar o metabolismo central e ser utilizados para a síntese de compostos associados à virulência e essenciais para a parede celular de Mtb (Bah et al., 2016; Griffin et al., 2012; Lovewell et al., 2016).

O primeiro passo na degradação de colesterol envolve a conversão de colesterol a colestenoa (colest-4-en-3-ona) através de uma reação com dois passos: oxidação e isomerização. Na natureza, duas enzimas têm a capacidade de oxidar colesterol: colesterol oxidase e colesterol desidrogenase (Brzostek et al., 2007; Cole et al., 1998). No genoma de *M. tuberculosis* existe um gene anotado como codificando para uma colesterol oxidase (*Rv3409c*, ChoD) e um gene anotado como uma colesterol desidrogenase (*Rv1106c*, 3 β -HSD).

1.6 Colesterol Oxidase (ChoD)

A colesterol oxidase (ChoD) é uma enzima que foi isolada e caracterizada bioquimicamente a partir de uma série de microrganismos, sendo também identificada em micobactérias (Brzostek et al., 2007). Relatos na literatura indicam que algumas estirpes dos gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia* produzem uma forma intracelular desta enzima ou formas ligadas à membrana, enquanto que algumas estirpes dos gêneros *Arthrobacter*, *Schizopyllum*, *Streptoverticillium*, *Brevibacterium* e *Streptomyces* produzem a enzima na forma extracelular (Bednarska et al., 2014; Vrieling, 2010). As bactérias não-patogênicas usam a ChoD para degradar colesterol, ao passo que as bactérias patogênicas utilizam o colesterol para infectar os macrófagos do hospedeiro, o que reflete a sua capacidade para alterar a estrutura física da membrana lipídica (Bednarska et al., 2014).

As colesterol oxidases são flavoenzimas dependentes do cofator Dinucleótido-Flavina-Adenina (FAD). Existem dois tipos desta enzima: as do Tipo I contêm o cofactor FAD não covalentemente

ligado à proteína e pertencem à família de oxidoredutase glicose/metanol/colina (GMC); e as do Tipo II contêm o cofator FAD ligado covalentemente à proteína e pertencem à família das oxidases do álcool vanílico (VAO) (Vrieling & Ghisla, 2009). Embora estes dois tipos de colesterol oxidases catalisem a mesma reação, as suas estruturas e sequências de aminoácidos são completamente diferentes, não apresentando homologia significativa (Vrieling, 2010; Doukyu, 2009). As enzimas do Tipo I foram identificadas principalmente em actinomicetes como *Streptomyces* spp., *Rhodococcus* spp. e *Brevibacterium sterolicum*. Por outro lado, as enzimas do Tipo II foram encontradas não só em vários actinomicetes mas também em beta e gama proteobactérias como *Burkholderia cepacia* e *Chromobacterium* sp. (Vrieling & Ghisla, 2009).

Estas enzimas bacterianas catalisam a oxidação e a isomerização de colesterol a colestenoa, que corresponde ao primeiro passo para a degradação do colesterol, representado na Figura 5. Inicialmente, na reação denominada redutiva, o grupo 3 β -hidroxilo do sistema de anéis do esteróide é oxidado para a cetona correspondente, sendo esta conversão realizada com a ajuda do cofator FAD. Posteriormente, a enzima catalisa a isomerização da dupla ligação no sistema de anel do esteróide oxidado a partir da posição 5-6 para a posição 4-5, dando assim origem ao produto final, o esteróide colestenoa. No passo final, na reação de oxidação, o cofator FAD fica mais reduzido reagindo com o oxigénio, sendo reoxigenado enquanto o O₂ é reduzido a peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Kreit & Sampson, 2009; Doukyu, 2009; Vrieling, 2010).

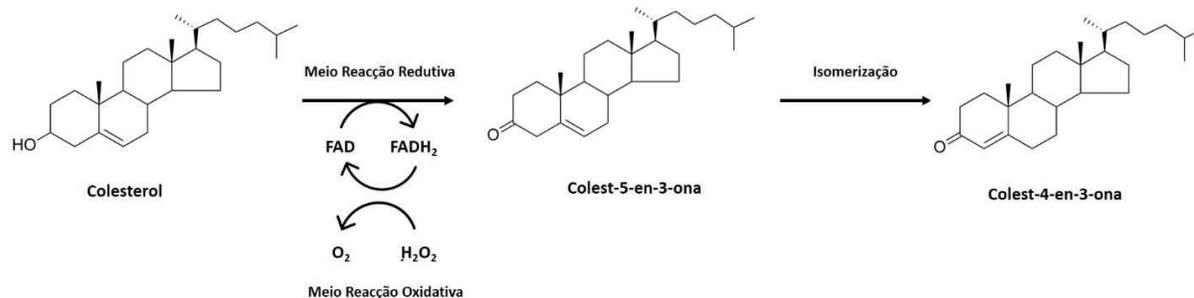


Figura 5 - Reação catalisada pela enzima colesterol oxidase (ChoD), onde se mostra o substrato colesterol, o produto colestenoa (colest-4-en-3-ona) e o intermediário colest-5-en-3-ona formado depois da oxidação e antes da isomerização. O cofator FAD permanece ligado à enzima e é reoxigenado na reação oxidativa por oxigénio para formar peróxido de hidrogénio. Adaptado (Vrieling, 2010).

Estudos indicam que a colesterol oxidase contribui para a ação patogénica da bactéria *Mtb*, infectando e multiplicando-se dentro dos macrófagos, tendo acesso a uma potencialmente rica fonte de carbono como colesterol (Kreit & Sampson, 2009). Como esta enzima é capaz de acumular e degradar o colesterol usando-o como uma fonte de carbono e energia, esta utilização de colesterol é essencial à sobrevivência da bactéria nos macrófagos (Klink et al., 2013).

A capacidade de oxidação do colesterol tem sido descrita em micobactérias e a informação obtida através da análise bioinformática e anotação automática funcional é muito limitada, podendo suspeitar-se que a função de colesterol oxidase atribuída à proteína correspondente ChoD é duvidosa (Klink et al., 2013). Existem inclusivamente estudos que sugerem que as enzimas codificadas pelo gene *Rv3409c* em *Mtb* e ortólogo em *M. smegmatis* não oxidam colesterol, e não são necessários para o metabolismo de colesterol em micobactérias (Wipperman et al., 2014; Gao & Sampson, 2014). Contudo, foi proposto que este gene seja essencial à infeção de macrófagos e que pode estar alternativamente envolvido na síntese de um glicopeptidolípido hiper-ramnosilado, mas permanece por desvendar a natureza do substrato utilizado por esta enzima (Gao & Sampson, 2014).

1.7 Colesterol Desidrogenase ou Desidrogenase 3 β -Hidroxiesteróide (3 β -HSD)

A enzima 3 β -HSD (*Rv1106c*) está anotada como uma colesterol desidrogenase em *Mtb*, dado que apresenta 74% de identidade com uma enzima equivalente de uma estirpe de *Nocardia* (Kishi et al., 2000; Yang et al., 2007). Esta enzima utiliza NAD como cofator e não FAD e catalisa o primeiro passo da via de degradação do colesterol representado na Figura 6. Difere da reação do colesterol oxidase típica, pois o oxigénio não está envolvido na reação da 3 β -HSD. No entanto, 3 β -HSD também pode oxidar e isomerizar outros substratos como a pregnenolona e desidroepiandrosterona (DHEA) (Reading et al., 2003; Thomas et al., 2011; Yang et al., 2007).

Estas enzimas desempenham um papel fundamental na síntese de hormonas esteróides sexuais (Reading et al., 2003).

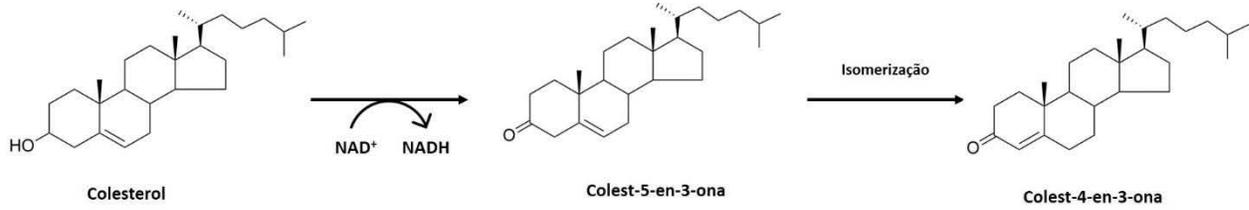


Figura 6 - Reação catalisada pela enzima colesterol desidrogenase, onde está representado o substrato colesterol, o produto colest-4-en-3-ona e o intermediário colest-5-en-3-ona formado depois da oxidação e antes da isomerização. O cofator NAD^+ permanece ligado à enzima. Adaptado (Vrieling, 2010).

1.8 Objetivo

Existe uma diferença reportada na incidência de TB entre homens e mulheres, sendo cerca de 2-3 vezes mais elevada nos homens. Visto que esta diferença se manifesta primordialmente após a adolescência pensa-se que esteja relacionada com mecanismos de proteção relacionados com hormonas sexuais. As hormonas sexuais são compostos esteróides sintetizadas a partir de colesterol, o esteróide mais importante produzido por todos os animais incluindo os humanos. Apesar de *Mtb* não ser capaz de produzir colesterol, a obtenção de colesterol das células do seu hospedeiro e subsequente metabolização a compostos anabólicos é de extrema importância para a sua persistência intracelular durante infeção. A semelhança química entre todos compostos esteróides leva a considerar que as hormonas sexuais podem ter influência nos mecanismos de patogénese de *Mtb*, especialmente estrogénios, as principais hormonas sexuais femininas. Os seus análogos poderão ter efeitos inibidores da patogénese.

O primeiro passo na degradação aeróbia do colesterol consiste na sua conversão a colesteno e existem duas enzimas capazes de realizar esta transformação essencial ao seu metabolismo: colesterol oxidase (ChoD) e colesterol desidrogenase ou desidrogenase 3 β -hidroxiesteróide (3 β -HSD). O objetivo deste trabalho foi testar o papel de vários esteróides como possíveis substratos ou inibidores destas duas enzimas (codificadas pelos genes *Rv3409c* e *Rv1106c* em *M. tuberculosis* H37Rv, respectivamente) anotadas como estando envolvidas no metabolismo do colesterol e consideradas essenciais para a sobrevivência de *Mtb* durante infeção de macrófagos e para a utilização de colesterol como fonte de carbono.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições de Crescimento Bacteriano e Extração do DNA

Mycobacterium marinum DMS 44344 foi obtido da Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Alemanha) e cultivado em placas com meio sólido de *Mycobacterium* (Anexo I, Secção I) durante 4 dias a 35°C. O DNA genómico deste organismo foi extraído através do Kit DNAid Mycobacteria (Smart, Helix), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2 Análise Bioinformática

As sequências de aminoácidos e dos genes anotados como envolvidos na oxidação do colesterol foram obtidos através da base de dados Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>). A sequência de aminoácidos da enzima *Rv3409c* foi utilizada como modelo para análise da homologia estrutural na base de dados SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

2.3 Amplificação, Clonagem e Expressão dos Genes

2.3.1 Amplificação por PCR

O gene *Rv3409c* (ChoD) que contém 1737 pb foi amplificado a partir do DNA genómico de *M. tuberculosis* (estirpe clínica 98016 cordialmente cedida pela Dra. Margarida Correia Neves, ICVS, Universidade do Minho) utilizando o *primer forward* 5' – AATTGAGTCATATGAAGCCGGATTACGAC – 3' e o *primer reverse* 5' – TATAAGCTTGCCCGCGTTGCTG – 3', onde foram adicionados locais de restrição para as enzimas *NdeI* e *HindIII* (sublinhado), respetivamente. O codão de terminação foi removido do *primer reverse*, permitindo a tradução de uma cauda de seis histidinas no terminal carboxílico (C-terminal) da enzima, sendo esta cauda codificada pelo plasmídeo de expressão pET30a (Novagen). A amplificação por PCR foi realizada com Supreme DNA polimerase Taq (NZYtech), de acordo com as instruções do fabricante com as seguintes condições: fase de pré-incubação a 95°C durante 2 minutos, em seguida foram realizados 35 ciclos com uma etapa de desnaturação a 95°C durante 45 s, uma etapa de *annealing* a 60°C durante 10 min e uma etapa de extensão a 72°C durante 2 min. Por fim, foi efetuada uma etapa de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O gene *MMAR_4359* (homólogo do gene *Rv1106c* de *M. tuberculosis* H37Rv) contendo 1095 pb foi amplificado a partir do DNA cromossômico de *M. marinum*, utilizando o *primer forward* 5' – TATATACATATGCTTCGGCCCATGGGTGATGC - 3' e o *primer reverse* 5' – TATAAGCTTCCGGCCCGGCTTTGAC - 3', onde foram adicionados locais de restrição para as enzimas *NdeI* e *HindIII* (sublinhado), respetivamente. O codão *stop* foi removido do *primer reverse*, permitindo a tradução de uma cauda de seis histidinas no terminal carboxílico da enzima, sendo esta cauda codificada pelo plasmídeo de expressão pET30a. A amplificação por PCR foi realizada com a utilização da Supreme DNA polimerase Taq (NZYtech), de acordo com as instruções do fabricante nas seguintes condições: fase de pré-incubação a 95°C durante 2 minutos, em seguida foram realizados 35 ciclos com uma etapa de desnaturação a 95°C durante 45 s, uma etapa de *annealing* a 54°C durante 45 s e uma etapa de extensão a 72°C durante 65 s. Por fim, foi efetuada uma etapa de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Para o gene *Rv1106c*, que contém 1113 pb, foram utilizadas duas estratégias de amplificação e clonagem, partindo do DNA cromossômico de *M. tuberculosis* (estirpe *clinica 98016*). Utilizando o *primer forward* 5' - ATATATCTACATATGCTTCGCCGCATGGGTGATGCA – 3' e o *primer reverse* 5' – TATAAGCTTCCGGCTTGACTGTGGCGGC – 3', onde foram adicionados locais de restrição para as enzimas *NdeI* e *HindIII* (sublinhado), respetivamente. O codão *stop* foi removido do *primer reverse*, permitindo a tradução de uma cauda de seis histidinas no terminal carboxílico da enzima, sendo esta cauda codificada pelo plasmídeo de expressão pET30a. A amplificação por PCR foi realizada com Supreme DNA polimerase Taq (NZYtech), e as condições utilizadas foram as mesmas que na amplificação do gene *MMAR_4359*. A segunda estratégia envolveu a utilização do *primer forward* 5' – ATAGAAGACTCCATGCTTCGCCGCATGGGTG - 3' e do *primer reverse* 5' – TATAAGCTTCTACGGCTTGACTGTGGCGGC - 3', onde foram adicionados locais de restrição para as enzimas *BbsI* e *HindIII* (sublinhado), respetivamente. O local de restrição do *primer forward* foi desenhado de maneira a gerar uma extremidade coesiva compatível com a de *NcoI* após digestão com *BbsI*, permitindo assim clonar o fragmento amplificado no plasmídeo de expressão pETM-11 (cordialmente cedido pelo Dr. Pedro Pereira, I3S) com uma cauda de seis histidinas no N-terminal. A amplificação por PCR foi realizada com a utilização da DNA polimerase KOD (Novagen), de acordo com as instruções do fabricante com as seguintes condições: fase de pré-incubação a 95°C durante 2 min, em seguida foram realizados 35 ciclos com uma etapa de desnaturação a 95°C durante 20 s, uma etapa de *annealing* a 62°C durante 20

s e uma etapa de extensão a 70°C durante 20 s. Por fim, foi efetuada uma etapa de extensão final a 70°C durante 2 min.

Todos os produtos da PCR foram corridos e visualizados num gel de agarose 1% (Anexo I, Secção 2) e em seguida purificados através da utilização do Kit GelPure (NZYtech), de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.2 Clonagem e Transformação das Células Competentes *E. coli* BL21 Star

Os genes *Rv3409c* (ChoD), *MMAR_4359* e o gene *Rv1106c* (3 β -HSD) amplificados e os vetores de clonagem/expressão pET30a (Novagen) foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (Takara) durante 1 hora e 30 minutos a 37°C. O gene *Rv1106c* amplificado utilizando a segunda estratégia de clonagem e o vetor de clonagem/expressão pETM-II foram digeridos com as enzimas de restrição *BbsI* e *HindIII* (NEB) e *NcoI* e *HindIII* (Takara), respetivamente, durante 1 h e 30 min a 37°C. Em seguida, os fragmentos digeridos foram visualizados num gel de agarose 1% e purificados como descrito acima. Os vetores linearizados foram desfosforilados com fosfatase alcalina intestinal de vitelo (NEB) e purificados com o Kit GelPure (NZYtech). Os fragmentos correspondentes foram ligados com T4 DNA Express LinkTM ligase (Invitrogen) durante 20 min à temperatura ambiente.

Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21 Star (Anexo I, Secção 3) pela adição de 10 μ L de mistura da ligação em 100 μ L de células competentes, seguindo-se incubação em gelo durante 20 min e um choque térmico a 42°C num banho de água pré-aquecida durante 45 s. Foram adicionados 500 μ L de meio LB (Anexo I, Secção 4) às células, tendo estas sido incubadas 1 h a 37°C. Finalmente, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB com agar contendo canamicina (30 μ g/mL) e incubadas a 37°C durante cerca de 16 h.

As colónias resistentes selecionadas foram incubadas durante a noite em 7 mL de meio LB com canamicina (30 μ g/mL) numa incubadora com agitador a 130 rpm e a 37°C. A extração do plasmídeo foi feita através da utilização do Kit ZR Plasmid MiniprepTM-Classic (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, para confirmar os clones positivos, os plasmídeos pET30a que continham os genes *Rv3409c* e *MMAR_4359* foram digeridos com as

enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* (Takara) e o plasmídeo pETM-I I que continha o gene *Rv1106c* foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* (Takara). Todos os plasmídeos foram visualizados num gel de agarose 1%.

2.3.3 Condições de Crescimento e Expressão das Proteínas Recombinantes

E. coli BL21 Star com os plasmídeos recombinante foram crescidas durante 18 h em meio LB (100 mL) com canamicina (30 µg/mL), numa incubadora com agitador a 130 rpm e a 37°C. Para *E. coli* BL21 Star com o plasmídeo recombinante pETM I I com o gene *Rv1106c* e as que continham pET30a com o gene *Rv3409c* inocularam-se células frescas do crescimento anterior e iniciou-se um novo crescimento em meio LB (1 L) com canamicina (30 µg/mL), numa incubadora de água com agitação a 130 rpm e a 37°C até à fase exponencial de crescimento ($D.O_{610nm} = 0,8$ a 1).

Para os restantes genes procedeu-se ao crescimento das células bacterianas hospedeiras em meio TB (1 L) (Anexo I, Secção 5) contendo canamicina (30 µg/mL), numa incubadora com agitador a 130 rpm e a 37°C até à fase exponencial de crescimento ($D.O_{610nm} = 0,8$ a 1).

Para todos os crescimentos a temperatura foi reduzida para 20°C e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG com uma concentração final de 0,5 mM. As células foram recolhidas 18 horas após a indução através de centrifugação (9000 rpm, 7 minutos, 4°C), suspensas em tampão A (Anexo I, Secção 6) seguido da adição de 5 mM de $MgCl_2$ e 2 µg/µL de DNase I e por fim foram lisadas com um sonicador, sendo posteriormente centrifugadas (15000 rpm, 25 minutos, 4°C) para remover os detritos celulares.

2.4 Purificação das Proteínas Recombinantes

As proteínas recombinantes foram purificadas através de um sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC) recorrendo a uma coluna com uma resina carregada com níquel (HisTrap™ 5 mL, GE Healthcare) e equilibrada com o tampão A. Os extratos de proteína (Secção 2.3.3.) foram filtrados através de um filtro de celulose de 0,45 µm sendo posteriormente injetados na coluna. Quando esta estabilizou fez-se a eluição das proteínas usando o tampão de eluição (tampão B) (Anexo I, Secção 7). As proteínas recombinantes *Rv3409c* (ChoD) e *MMAR_4359*

foram eluídas com 200 mM de imidazol e proteína 3 β -HSD recombinante *Rv1106c* foi eluída com 350 mM de imidazol. Recolheram-se frações de 2 mL e o peso molecular e a pureza das proteínas eluídas foram determinadas por SDS-PAGE (Anexo I, Secção 8). Seguidamente, juntaram-se as frações mais puras que foram diluídas 2 vezes com 50 mM de tampão Bis-Tris Propano (BTP) a pH 8,5 sendo concentradas por ultrafiltração em centricons com Cut-off 30 KDa (Amicon) e equilibradas com o mesmo tampão contendo 200 mM de NaCl a pH 8,5. Para quantificar a concentração das proteínas usou-se o ensaio de Bradford (BioRad) e confirmou-se o tamanho das bandas das proteínas recombinantes por SDS-PAGE.

2.5 Remoção da Cauda de Histidinas

A remoção da cauda de seis histidinas do N-terminal da proteína 3 β -HSD (expressa utilizando o plasmídeo pETM-11) (20 μ g proteína por 300 μ L de reação) foi realizada através de uma digestão com a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*) (5 μ g/300 μ L), em 50 mM Tris pH 8,0, 0,5 mM EDTA e 1 mM DTT, com incubação à temperatura ambiente e a 4°C durante toda a noite. A mistura foi diluída cinco vezes com 50 mM Bis-Tris Propano (BTP) a pH 8,5 e injetada numa coluna com uma resina carregada com níquel (HisTrap™ 5 mL, GE Healthcare) e equilibrada com o tampão A. A proteína já sem a cauda de histidinas saiu na fracção não ligada onde se recolheram alíquotas de 2 mL, efetuando posteriormente a eluição da coluna usando o tampão B para remover outras proteínas ligadas à coluna (incluindo a protease TEV, que possui ela própria uma cauda de histidinas). Seguidamente, juntaram-se as frações mais puras e estas foram concentradas em 50 mM Bis-Tris Propano (BTP) a pH 8,5 por ultrafiltração em centricons com Cut-off 30 KDa (Amicon) e equilibradas com o mesmo tampão contendo 200 mM de NaCl a pH 8,5. Por fim, confirmou-se o tamanho da banda da proteína já sem a cauda de histidinas por SDS-PAGE.

2.6 Análise da Atividade Enzimática por Cromatografia de Camada Fina

Para testar a atividade enzimática e a especificidade pelo substrato das enzimas recombinantes ChoD, MMAR_4359 e 3 β -HSD efetuaram-se reações com o substrato colesterol (750 μ M) e para as proteínas ChoD (*Rv3409c*) e 3 β -HSD (*Rv1106c*) testaram-se ainda os substratos glucose e maltose (5 mM), pregnenolona e DHEA (750 μ M), bem como outros cofatores como o FAD e Riboflavina (3 mM). Para a proteína 3 β -HSD e o substrato colesterol realizaram-se também reações com enzima pura com e sem cauda de histidinas (750 μ M de colesterol). As reações foram incubadas a 30°C durante 1 hora em 50 mM BTP a pH 9,0, 3% de Triton X-100, 1,5 mM de NAD e 15 mM de MgCl₂ para um volume total de 100 μ L, contendo 1 μ g de enzima pura. Para todas as reações foram feitos controlos negativos sem enzima.

Recorreu-se a uma cromatografia de camada fina (TLC) para a visualização da síntese de produto, através da aplicação na placa de cada reação e dos seus respetivos controlos negativos bem como de padrões, quando disponíveis. As placas foram eluídas utilizando o solvente composto por hexano/acetato de etilo (40:10 v/v) para os lípidos e o solvente composto por Clorofórmio/Metanol/Ácido Acético/H₂O (30:50:8:4 v/v) para os açúcares. Por fim, os substratos e os produtos foram visualizados por pulverização da placa com uma solução de lípidos totais (Ácido Fosfomolibdico) (Sigma-Aldrich) ou pulverização da placa com uma solução de ácido-sulfúrico- α -naftol (Anexo I, Secção 9) para revelação de açúcares, seguida de incubação a 160°C e 100°C, respetivamente, durante 5 a 10 min (Jacin & Mishkin, 1965).

2.7 Caraterização de Atividades Enzimáticas

A atividade da enzima 3 β -HSD (*Rv1106c*) foi detetada espectrofotometricamente. Em placas de microtitulação de 96 cavidades e a formação de NADH foi seguida e medida em tempo real durante 10 minutos a um comprimento de onda de 340 nm (Yang et al., 2007). As reações foram realizadas em 50 mM BTP a pH 9,0, 3% de Triton X-100, 1,5 mM de NAD e 15 mM de MgCl₂ para um volume total de 100 μ L. As reações foram iniciadas após a adição de 1 μ g de enzima pura e incubadas a 30°C. Para todas as reações foram feitos controlos negativos sem enzima.

2.7.1 Estudo dos Parâmetros para as Condições Ótimas da Colesterol Desidrogenase

Inicialmente testou-se a atividade da enzima com e sem a cauda de histidinas e a enzima com cauda foi escolhida para ensaios posteriores. Testou-se a concentração ótima de substrato (colesterol) desde 100 μM até 900 μM em misturas com 50 mM BTP a pH 9,0, 3% Triton X-100, 1,5 mM NAD e 15 mM MgCl_2 . Foram efectuados testes de concentração ótima do cofator, testando concentrações de NAD^+ entre 1,5 mM e 10 mM em misturas com 50 mM BTP a pH 9,0, 400 μM colesterol, 3% Triton X-100 e 15 mM MgCl_2 .

Testou-se o efeito da presença/ausência de catiões e salinidade. Os catiões testados foram MgCl_2 e CaCl_2 , apresentando cada um deles concentrações entre 1 mM e 10 mM em misturas com 50 mM BTP a pH 9,0, 400 μM colesterol, 2% Triton X-100 e 3 mM NAD. Os sais testados foram NaCl e KCl com concentração 150 mM, em misturas com 50 mM BTP a pH 9,0, 400 μM colesterol, 2% Triton X-100 e 3 mM NAD. Como controlo do possível efeito ativador de catião e sal, testou-se a ausência nas reações e o efeito do agente quelante EDTA. Devido ao efeito ativador de MgCl_2 testaram-se várias concentrações na tentativa de encontrar a concentração ótima entre 1 mM e 30 mM.

Devido ao facto de o colesterol e os compostos esteróides se encontrarem numa solução de etanol e DMSO, respetivamente, os efeitos destes solventes na atividade enzimática foram testados. Foi também testado o efeito do detergente necessário para a solubilização do colesterol. O efeito do produto colesteno e subproduto NADH na atividade enzimática foram também testados. O efeito de isopropanol foi testado através da adição sucessiva de isopropanol até um volume máximo de 5% (v/v) da reação a 50 mM BTP a pH 9,0, 400 μM colesterol, 2% Triton X-100 e 3 mM NAD. O efeito do detergente foi testado por adição sucessiva de Triton X-100 até 6% (v/v) concentração final, em misturas de reações com 50 mM BTP a pH 9,0, 1000 μM colesterol e 7,5 mM NAD. O efeito do DMSO foi testado por adição sucessiva até um volume máximo de 3 μL a misturas de reação com 50 mM BTP a pH 9,0, 1500 μM colesterol, 2% Triton X-100, 5 mM NAD e 15 mM MgCl_2 . Por fim, o efeito do NADH e da colesteno foram testados por adição destes produtos em concentrações entre 0 mM e 1000 mM e entre 0 mM e 600 mM, respetivamente, em misturas de reação com 50 mM BTP a pH 9,0, 750 μM colesterol, 3% Triton X-100, 7 mM NAD e 15 mM MgCl_2 .

Foram realizados perfis de temperaturas e pH, onde o perfil de temperatura foi determinado a 27°C, 30°C e 35°C em misturas de reação com 50 mM BTP a pH 9,0, 1500 µM colesterol, 2% Triton X-100, 5 mM NAD e 15 mM MgCl₂, e o perfil de pH foi determinado com uma concentração final em soluções tampão 50 mM BTP (7,5 a 9,5) e 50 mM CAPSO (9,5 a 10) com 1500 µM colesterol, 2% Triton X-100, 5 mM NAD e 15 mM MgCl₂.

2.7.2 Estudos de Inibição da Colesterol Desidrogenase por Compostos Esteróides

Os compostos esteróides testados como potenciais inibidores da actividade da enzima 3β-HSD foram: pregnenolona, 16α-hidroxipregnenolona, DHEA, finasterida, etinilestradiol, estradiol, estriol, colestanoetriol e estrona. Todos os esteróides foram previamente testados como possíveis substratos enzimáticos através do método espectrofotométrico acima descrito.

Para os testes de inibição da enzima utilizou-se como controlo positivo a mistura de reação 50 mM BTP a pH 9,0, 750 µM colesterol, 3% Triton X-100, 1,5 mM NAD e 15 mM MgCl₂ e 1 µg de enzima. Para as misturas de reação com os compostos esteróides testaram-se várias concentrações 300 µM, 500 µM, 600 µM e 750 µM em misturas de reações com 50 mM BTP a pH 9,0, 750 µM colesterol, 3% Triton X-100, 1,5 mM NAD e 15 mM MgCl₂.

2.7.3 Cálculo das Constantes Cinéticas

Uma vez determinadas as concentrações ótimas para o funcionamento da enzima, as reações para determinar as constantes cinéticas para os diversos substratos foram realizadas variando as concentrações de substrato entre 100 e 900 µM e mantendo fixas as concentrações do cofator a 0,35, 0,5, 1, 1,5 e 3 mM, sequencialmente. A formação de NADH foi seguida como acima descrito. As constantes cinéticas foram determinadas utilizando o software Graphpad, através da utilização da equação de Michaelis-Menten (1), equação de determinação da constante catalítica K_{cat} (2) e a equação Michaelis-Menten adaptada a um complexo ternário (3), onde A são os diversos substratos (colesterol, pregnenolona e 16α-hidroxipregnenolona) e B o cofator NAD.

Equação 1 – Michaelis-Menten.

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[A]}{K_{MA} + [A]}$$

Equação 2 – Constante catalítica K_{cat} .

$$v = \frac{K_{cat}[E_t][A]}{K_M + A}$$

Equação 3 – Michaelis-Menten adaptada a um complexo ternário (Yang et al., 2007).

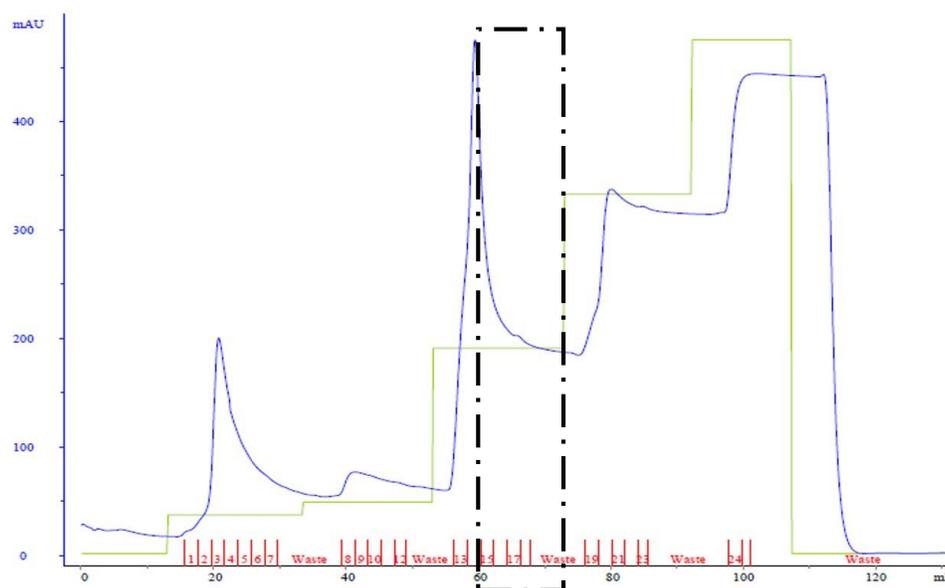
$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[A][B]}{k_D K_{MA} + K_{MA}[B] + K_{MB}[A] + [A][B]}$$

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS

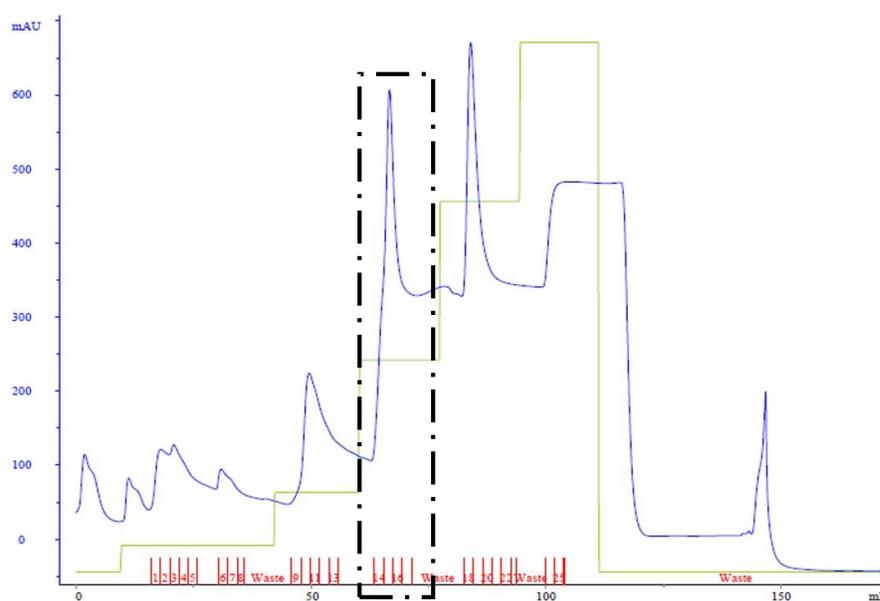
3.1 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes

As proteínas recombinantes ChoD, MMAR_4359 e 3 β -HSD com pesos moleculares calculados de 65,93 kDa, 42,86 kDa e 43,65 kDa, respectivamente, foram purificadas até à homogeneidade num único passo cromatográfico, utilizando uma coluna com uma resina de afinidade carregada com níquel (HisTrap™ 5 mL, GE Healthcare) (Figura 7).

(A)



(B)



(C)

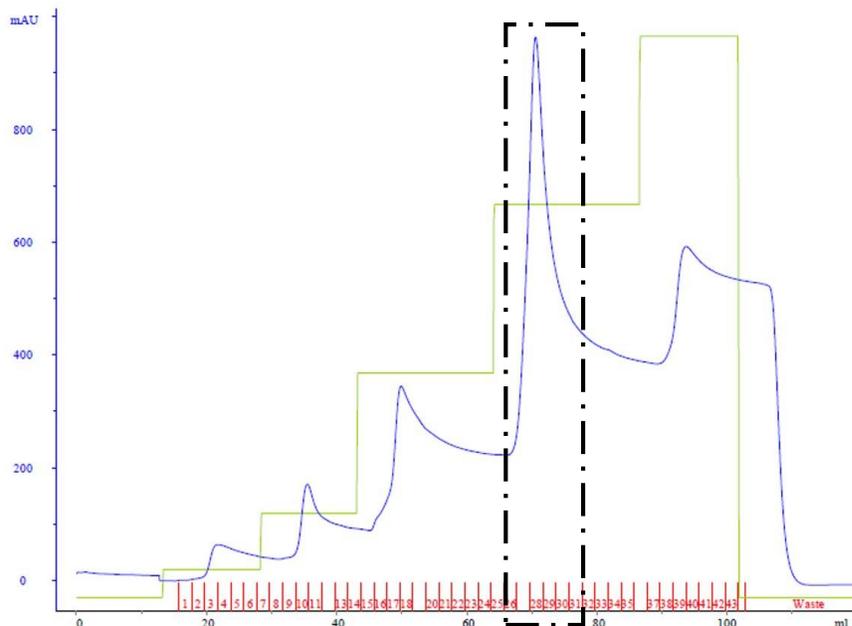


Figura 7 - Cromatogramas de FPLC obtidos durante as purificações das proteínas recombinantes, utilizando uma coluna HisTrap™ 5 mL. Linha Azul – Absorvância UV; Linha Verde – Concentração do imidazol no tampão de eluição (25 mM, 75 mM, 200 mM, 350 mM e 500 mM); Linha vermelha – Frações recolhidas **(A)**: Eluição representada na área tracejada da proteína ChoD com 200 mM de imidazol **(B)**: Eluição representada na área tracejada da proteína MMAR_4359 com 200 mM de imidazol **(C)**: Eluição representada na área tracejada da proteína 3β-HSD com 350 mM de imidazol.

As frações mais puras recolhidas (13, 14 e 15) com a proteína ChoD, (14, 15 e 16) com a proteína MMAR_4359 e (27, 28, 29 e 30) com a proteína 3β-HSD, correspondentes ao passo de eluição com 200 mM e 350 mM de imidazol (zonas tracejadas dos cromatogramas anteriores), foram concentradas por ultrafiltração em centricons com Cut-off 30 KDa (Amicon). Após a concentração das frações selecionadas com base no cromatograma da Figura 7, procedeu-se a uma eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE) de forma a verificar o grau de pureza das proteínas recombinantes (Figura 8).

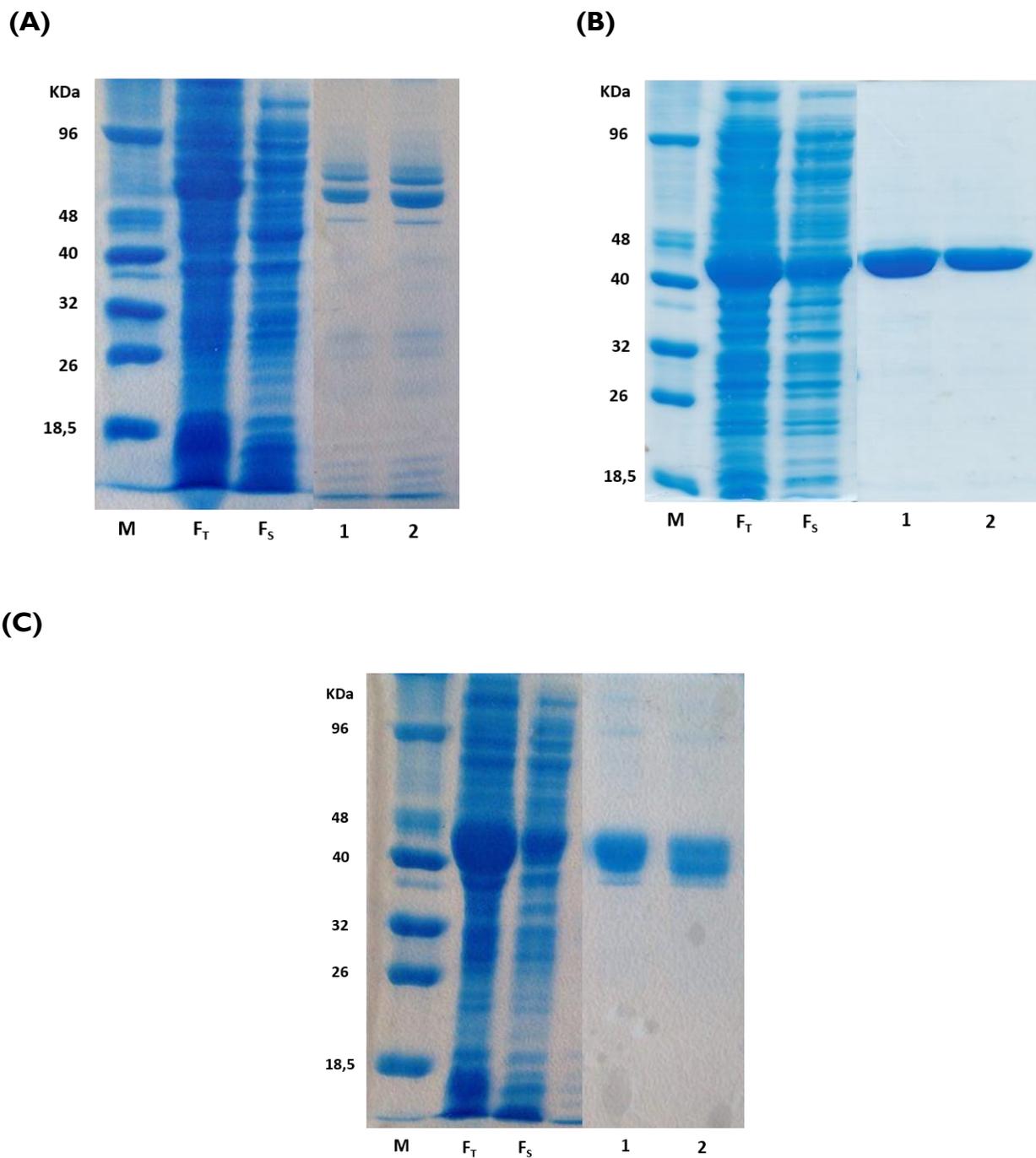


Figura 8 - SDS-PAGE das frações puras das proteínas recombinantes após concentração. M – Marcador de peso molecular; F_T – Extrato celular total de *E. coli* após sonicação; F_S – Fração solúvel do extrato celular. **(A)**: Linhas 1-2 – 4 µg e 6 µg da proteína ChOD purificada e concentrada **(B)**: Linhas 1-2 – 4 µg e 6 µg da proteína MMAR_4359 purificada e concentrada **(C)**: Linhas 1-2 – 4 µg e 6 µg da proteína 3β-HSD purificada e concentrada.

Uma alíquota da proteína recombinante 3 β -HSD com cauda de histidinas e local de corte específico para a protease TEV foi digerida com TEV, resultando na remoção da cauda de histidinas, sendo novamente purificada através de uma coluna com uma resina carregada com níquel (HisTrap™ 5 mL, GE Healthcare) (Figura 9).

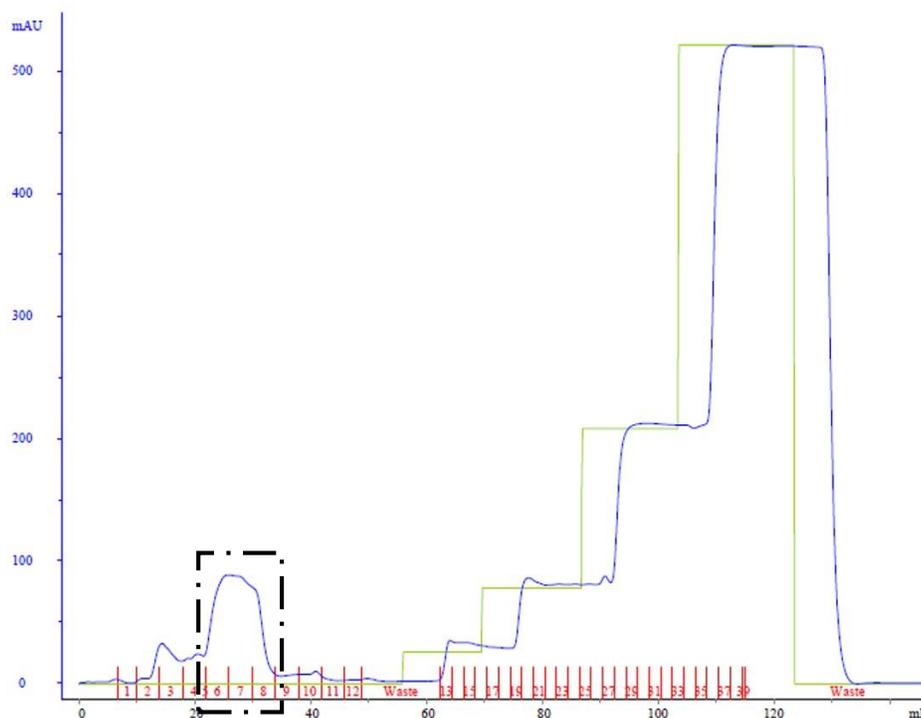


Figura 9 - Cromatograma de FPLC obtido durante a purificação da proteína 3 β -HSD, após a remoção da cauda de histidinas, utilizando uma coluna HisTrap™ 5 mL. A área tracejada representa a saída da proteína 3 β -HSD já sem cauda de histidinas. Linha Azul – Absorvância UV; Linha Verde – Concentração de imidazol no tampão de eluição (25 mM, 75 mM, 200 mM, 350 mM e 500 mM); Linha Vermelha – Frações recolhidas.

Posteriormente, as frações mais puras recolhidas (6, 7 e 8) correspondentes à zona do não ligado da coluna (zona tracejada do cromatograma da figura 9), foram concentradas por ultrafiltração em centricons com Cut-off 30 kDa (Amicon). Após a concentração destas frações, procedeu-se a uma eletroforese em gel (SDS-PAGE) de forma a verificar o grau de pureza da proteína recombinante sem a cauda de histidinas (Figura 10).

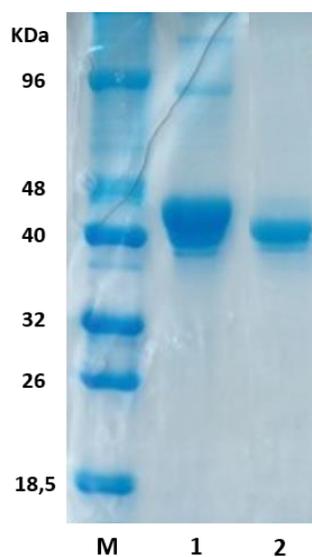


Figura 10 - SDS-PAGE das frações puras da proteína 3 β -HSD com e sem cauda de histidinas, após concentração. M – Marcador de peso molecular; Linha 1 – Proteína 3 β -HSD pura com cauda de histidinas; Linha 2 – Proteína 3 β -HSD sem cauda de histidinas.

3.2 Teste de Especificidade de Substrato por TLC

Entre as combinações de substratos e cofatores com as enzimas ChoD, MMAR_4359 e 3 β -HSD (secção 2.6 dos Materiais e Métodos) apenas esta última foi capaz de oxidar o colesterol usando NAD como cofator (Figura 11), formando a colestenoona como produto.

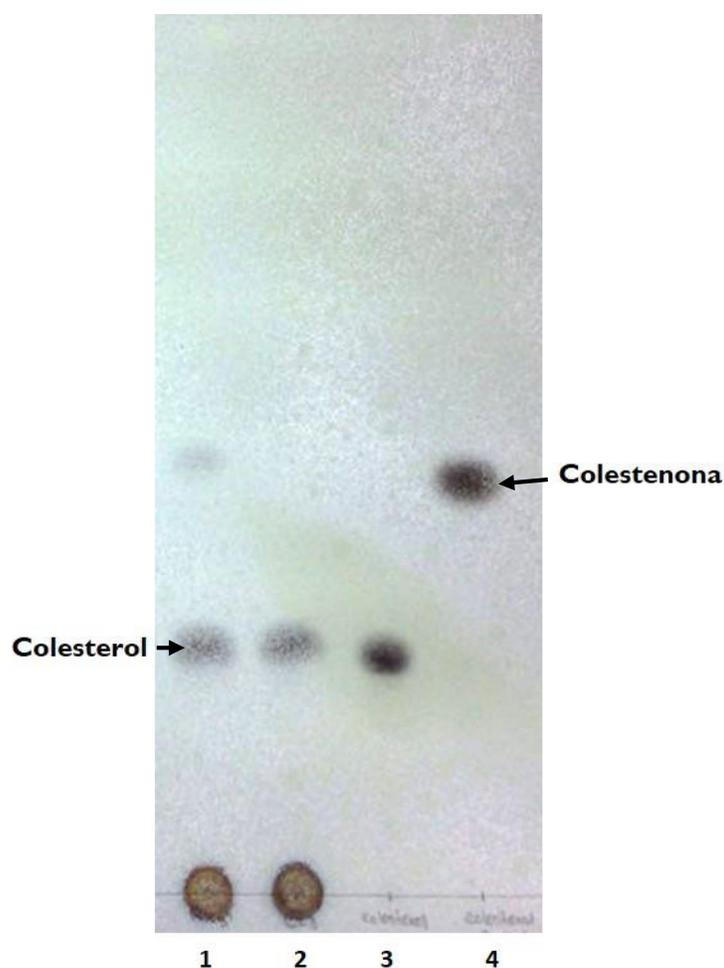


Figura 11 - Análise por TLC da reação com a colesterol desidrogenase 3β -HSD (*Rv1106c*) nas condições descritas na secção 2.6 dos Materiais e Métodos. Linha 1 – Reação enzimática. Linha 2 – Reação controlo sem enzima. Linha 3 – Padrão de colesterol. Linha 4 – Padrão de colesthenona.

As análises bioinformáticas à enzima ChoD revelaram a melhor homologia estrutural (17,22% de identidade e 83% de cobertura) com uma piranose-2-oxidase (PDB ID: 4MOG). No entanto, as reações com a proteína ChoD usando o cofator FAD e os açúcares glucose e maltose não revelaram atividade (Figura 12).



Figura 12 - Análise por TLC da reação da putativa colesterol oxidase ChoD (*Rv3409c*) nas condições descritas na secção 2.6 dos Materiais e Métodos. Linhas 1 e 3 – Reação enzimática. Linhas 2 e 4 – Reação controlo sem enzima. Linha 5 – Padrão de glucose. Linha 6 – Padrão de maltose.

3.3 Influência da Cauda de Histidinas na Atividade da Colesterol Desidrogenase 3β -HSD (*Rv1106c*)

Após a remoção da cauda de histidinas da proteína 3β -HSD avaliou-se por TLC se esta também apresentava, nas mesmas condições, atividade de oxidação do colesterol a colestenoa (Figura 13).

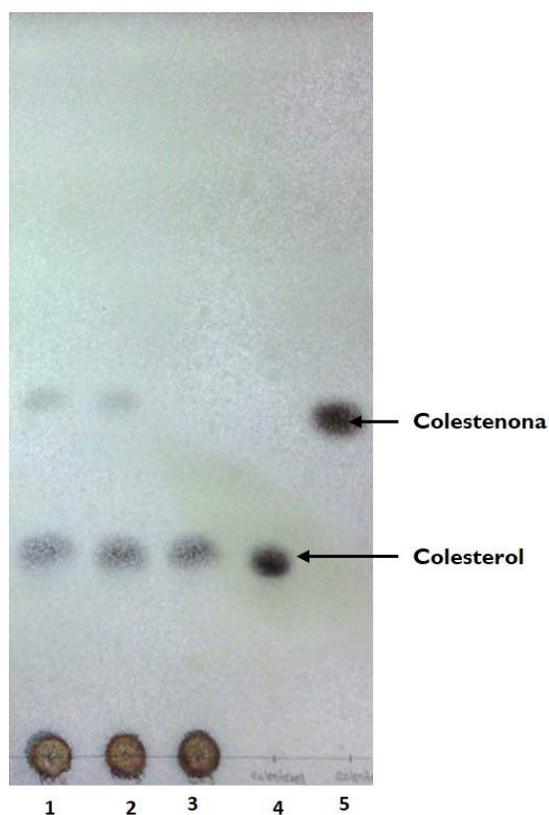


Figura 13 - Análise por TLC da reação da colesterol desidrogenase 3β -HSD (*Rvl106c*), com e sem cauda de histidinas, nas mesmas condições descritas na secção 2.6 dos Materiais e Métodos. Linha 1 – Reação com enzima apresentando a cauda de histidinas. Linha 2 – Reação com enzima que não apresenta a cauda de histidinas. Linha 3 – Reação controlo sem enzima. Linha 4 – Padrão de colesterol. 5 – Padrão de colesthenona.

Para testar o efeito da presença/ausência da cauda de histidinas na atividade da enzima, realizou-se um ensaio espectrofotométrico, descrito na secção 2.6 dos Materiais e Métodos. Uma vez que a atividade específica das duas formas da enzima não apresentava diferenças significativas, sendo até a atividade da enzima com cauda ligeiramente superior (Figura 14), foi esta a forma da enzima escolhida para os estudos posteriores.

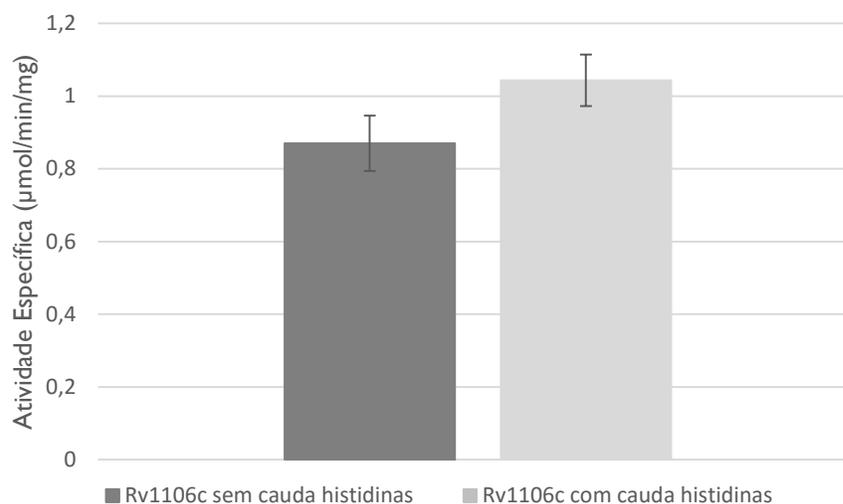


Figura 14 - Comparação da atividade específica da enzima 3β-HSD com cauda de histidinas e sem cauda de histidinas.

3.4 Condições Ótimas de Atividade da Colesterol Desidrogenase 3β-HSD (*Rv1106c*)

3.4.1 Perfis de Temperatura e pH

Para a determinação das condições ótimas para a atividade da enzima 3β-HSD, as primeiras condições a serem testadas foram a temperatura e o pH.

A enzima 3β-HSD revelou atividade máxima a 27°C e progressivamente foi perdendo a sua atividade com o aumento da temperatura (Figura 15). Não foi possível testar temperaturas abaixo dos 27°C por dificuldades técnicas. Para estudos posteriores todos os ensaios enzimáticos foram realizados a 30°C.

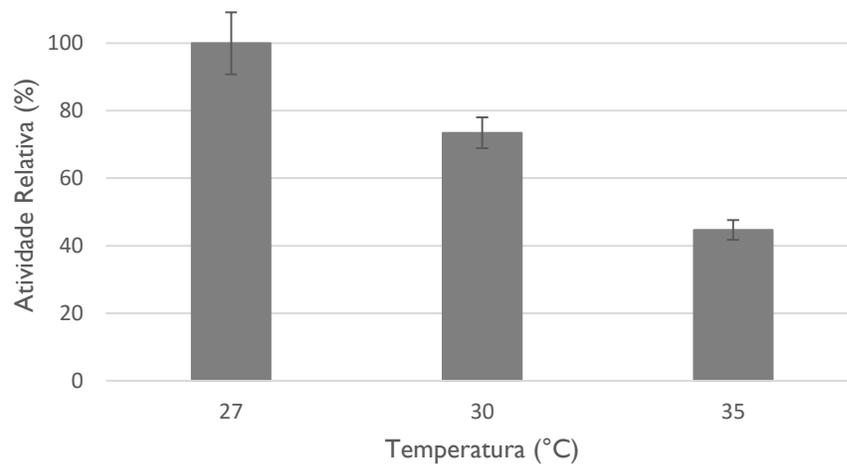


Figura I5 - Perfil de temperatura para a atividade da 3 β -HSD (*Rv1106c*).

O pH ótimo para a atividade da enzima 3 β -HSD foi 9,5 em tampão BTP (Figura I6). No entanto, houve uma ligeira queda na atividade medida quando se fez a transição de tampão BTP para o tampão CAPSO em pH 9,5. Para a realização dos ensaios o tampão selecionado foi o BTP a pH 9,0.

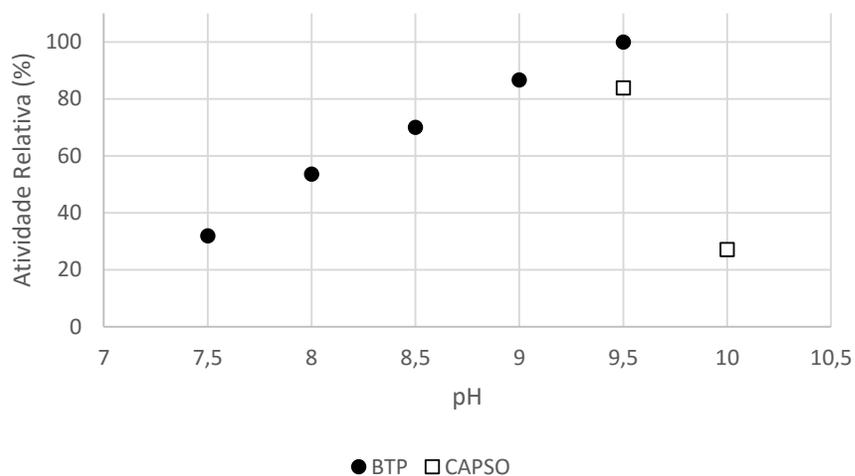


Figura I6 - Perfil de pH para a atividade da 3 β -HSD.

3.4.2 Efeito da Concentração de Colesterol

Para avaliação das condições ótimas para a atividade da enzima 3 β -HSD, foi testada a concentração de colesterol. Esta condição foi difícil de otimizar devido à interferência do próprio substrato no ensaio de detecção espectrofotométrica causada pela cor opaca da solução, gerada pela difícil solubilização do colesterol a determinadas concentrações. Por essa razão, as concentrações acima de 900 μ M não puderam ser testadas, mesmo na presença do agente solubilizante Triton X-100.

A enzima apresentou atividade numa gama de concentrações de colesterol 100 μ M a 1500 μ M, no entanto, pelas razões acima referidas, o seu comportamento apenas pode ser qualitativamente avaliado por TLC acima de 900 μ M. Na presença de 1,5 mM de NAD a concentração ótima de colesterol para máxima atividade da enzima foi de 700 μ M (Figura 17).

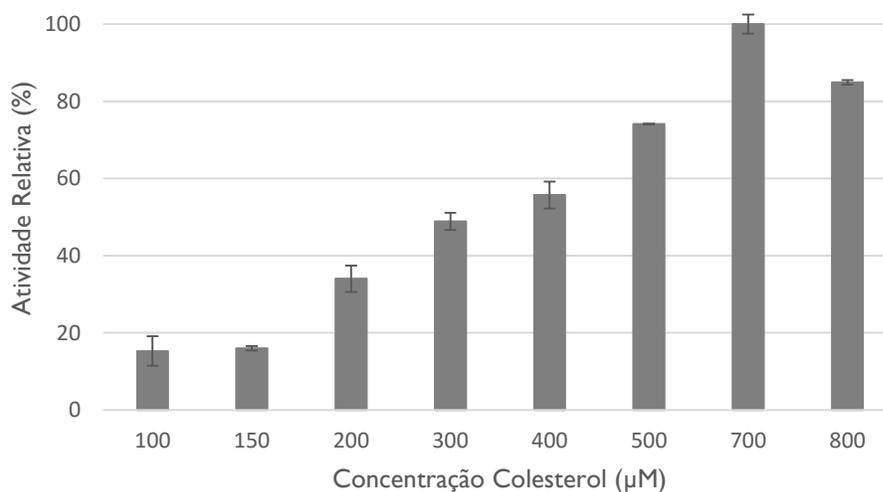


Figura 17 - Atividade da enzima 3 β -HSD determinada com várias concentrações de colesterol e 1,5 mM de NAD.

3.4.3 Efeito da Concentração do Cofator NAD

A atividade da enzima 3 β -HSD é dependente do cofator NAD. Com uma concentração de 700 μ M de colesterol obteve-se atividade enzimática máxima, na presença de 1,5 mM de NAD. Acima desta concentração de NAD houve um decréscimo na atividade da enzima (Figura 18) mais acentuado tanto nas concentrações de colesterol mais baixas como nas mais altas testadas. Na presença de 300 μ M de colesterol e 5 mM de NAD a enzima retém apenas 29% da sua atividade (Figura 18) e na presença de 900 μ M de colesterol e 5 mM de NAD a enzima retém 24% de atividade. Esta perda não é tão acentuada à concentração ótima de colesterol (700 μ M) e 5 mM de NAD uma vez que a enzima retém 62% de atividade (Figura 18).

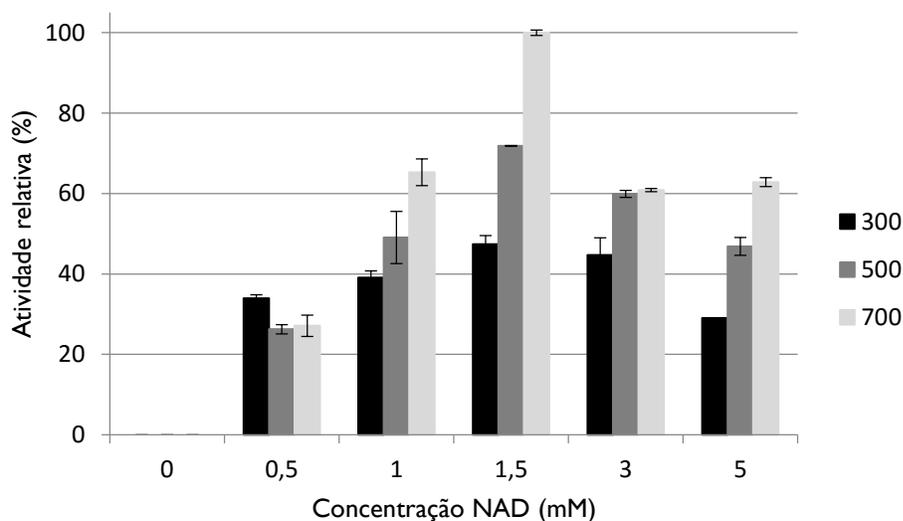


Figura 18 - Atividade da enzima 3 β -HSD avaliada com várias concentrações de NAD na presença de 300, 500 e 700 μ M de colesterol.

3.4.4 Efeito de Iões Mono e Divalentes

Para verificar o efeito de iões monovalentes na atividade enzimática, foram testados os sais NaCl e KCl (Figura 19) verificando-se que a enzima apresenta uma atividade relativa comparável na presença de NaCl como de KCl, com atividade específica de $2,34 \pm 0,08$ e $2,36 \pm 0,47$ μ mol/min/mg, respetivamente.

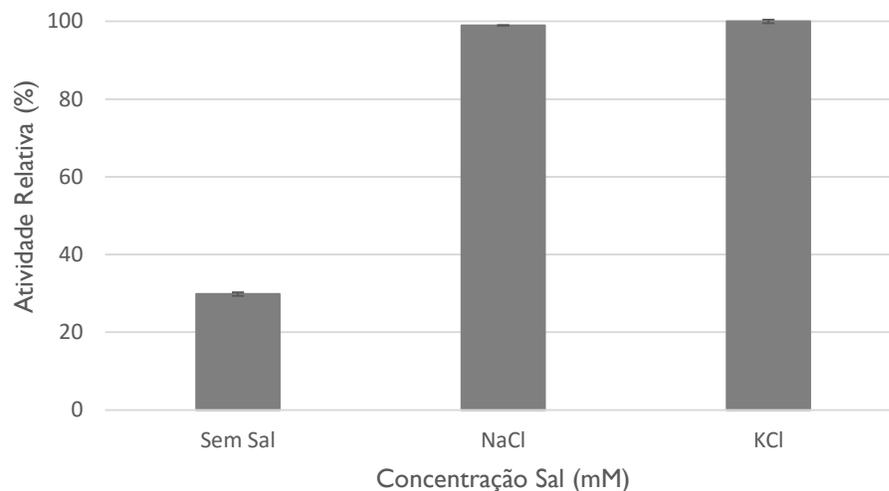


Figura 19 - Atividade da enzima 3 β -HSD medida na ausência de sal e na presença de 150 mM de NaCl e KCl.

Tal como os íons monovalentes, testamos também o efeito de cátions divalentes MgCl₂ e CaCl₂ a várias concentrações, cujo efeito na atividade da enzima está representado na Figura 20.

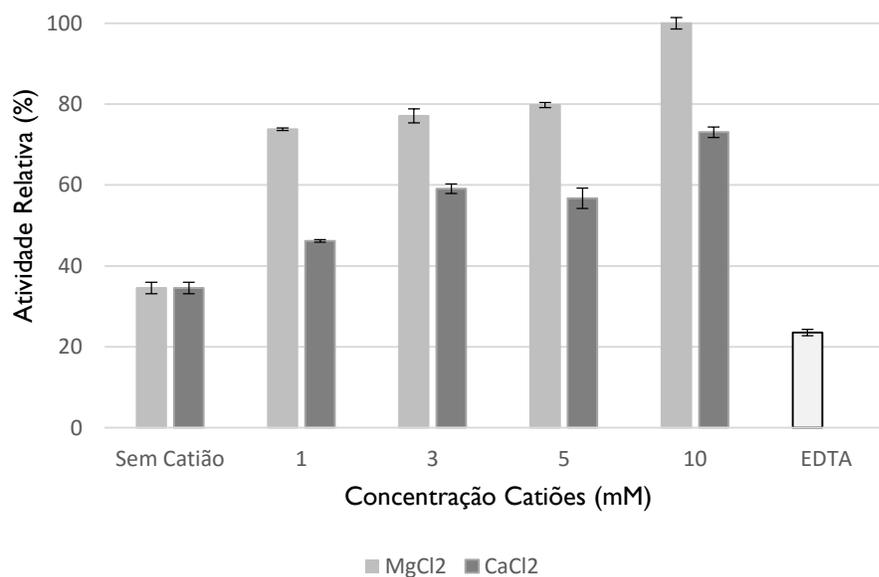


Figura 20 - Atividade da enzima 3 β -HSD quantificada na presença de várias concentrações dos cátions CaCl₂ e MgCl₂ e do agente quelante EDTA.

Apesar de a enzima não ser estritamente dependente de catiões para a sua atividade, tal como revelado pela deteção de atividade na presença de EDTA, verificou-se que a enzima apresenta atividade superior na presença de $MgCl_2$. Assim, testaram-se várias concentrações de modo a perceber qual a concentração com mais efeito no estímulo da atividade enzimática (Figura 21). Podemos verificar que na presença de 15 mM de $MgCl_2$ a enzima apresenta actividade específica mais elevada de $3,06 \pm 1,99 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

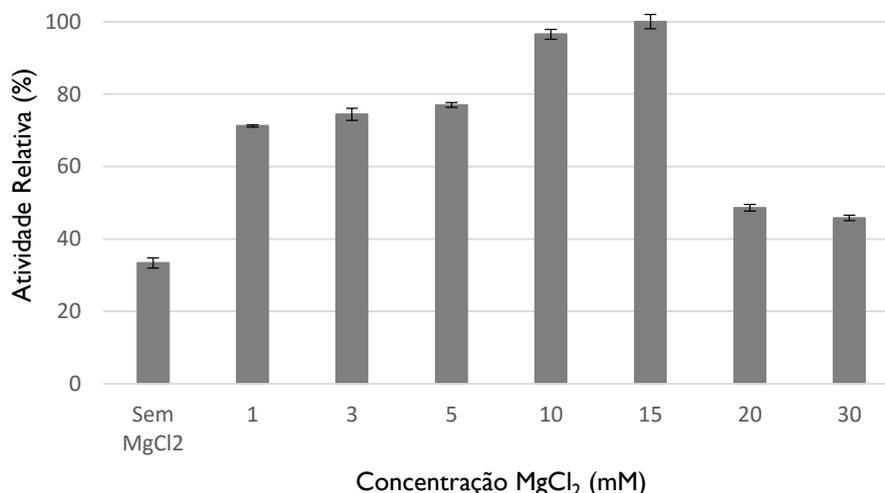


Figura 21 - Atividade da enzima 3β -HSD quantificada na presença de várias concentrações de $MgCl_2$.

3.4.5 Inibição por Isopropanol, Triton X-100 e DMSO

Dado que o colesterol e os compostos esteróides são insolúveis em água, foi necessário solubilizar estes compostos em detergentes ou solventes orgânicos. Uma vez que a utilização de detergentes ou solventes orgânicos frequentemente inibem a atividade de muitas enzimas, testaram-se as quantidades máximas de detergentes e solventes orgânicos que se poderiam utilizar nas reações para evitar a inibição da enzima, ou seja, a tolerância da enzima a concentrações crescentes de ambos.

O isopropanol foi utilizado para solubilizar o colesterol e para este solvente orgânico a enzima começa a ser inibida quando este é adicionado acima de 2% do volume da reação, sendo que acima de 5% do volume de reação apenas retém cerca de 62% da atividade máxima (Figura 22). Devido a estes resultados o isopropanol foi utilizado abaixo de 3% no volume total da reação.

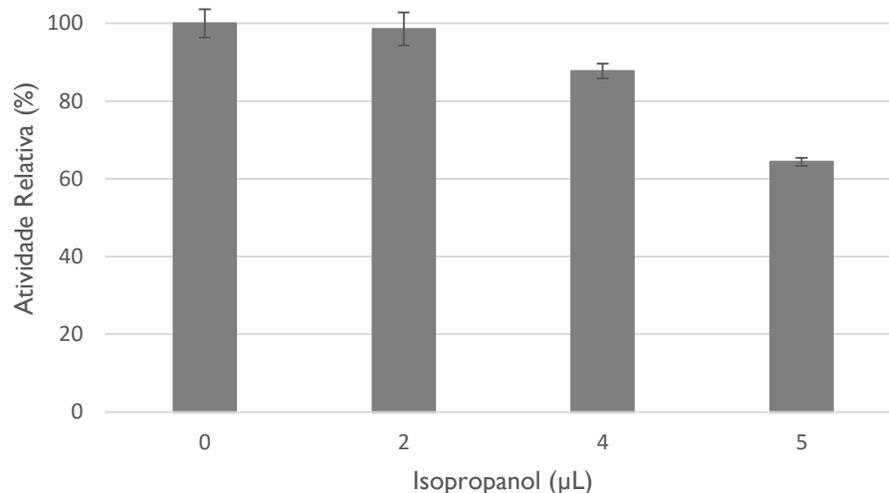


Figura 22 - Inibição da atividade da enzima 3β-HSD determinada após adição de isopropanol à reação.

O Triton-X100 foi o detergente usado para solubilização do colesterol e a atividade da enzima foi testada na presença de várias concentrações de triton em solução. Podemos verificar com base na Figura 23, que idealmente o colesterol deve ser solubilizado com 3% de triton, até esta concentração de detergente há uma melhoria de atividade, possivelmente porque com o aumento da quantidade de triton em solução dá-se um aumento de solubilidade de colesterol e logo uma maior disponibilidade de colesterol para a enzima. No entanto acima desta concentração há um decréscimo na atividade enzimática. Em todas as reações foi utilizado 3% do volume de triton.

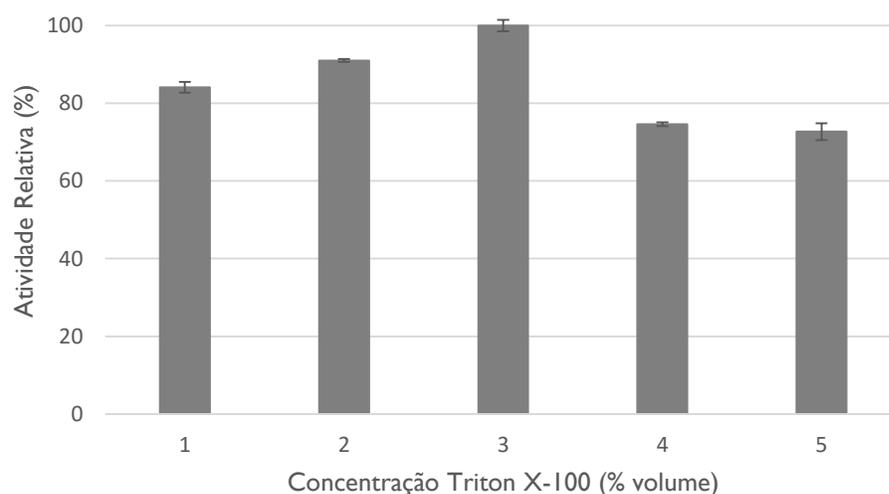


Figura 23 – Efeito da concentração de Triton-X100 na atividade da enzima 3β-HSD com 1000 μM colesterol e 7,5 mM NAD.

O DMSO foi o detergente usado na solubilização dos compostos esteróides. A atividade da enzima foi testada adicionando com quantidades crescentes de DMSO na solução da reação. Podemos verificar com base na Figura 24 que o uso de DMSO para ajudar na solubilização dos esteróides favoreceu a atividade da enzima até 1,5% e acima deste volume começa a haver uma ligeira inibição da enzima, perdendo parte da sua atividade. Isto deve-se ao facto de em algumas enzimas os efeitos dos solventes podem resultar em alterações importantes na estrutura quaternária da macromolécula, na flexibilidade de domínios dinâmicos e na acessibilidade do substrato aos locais de ligação de substratos (Wiggers et al., 2007), assim o DMSO adicionado altera as propriedades da enzima favorecendo a atividade enzimática.

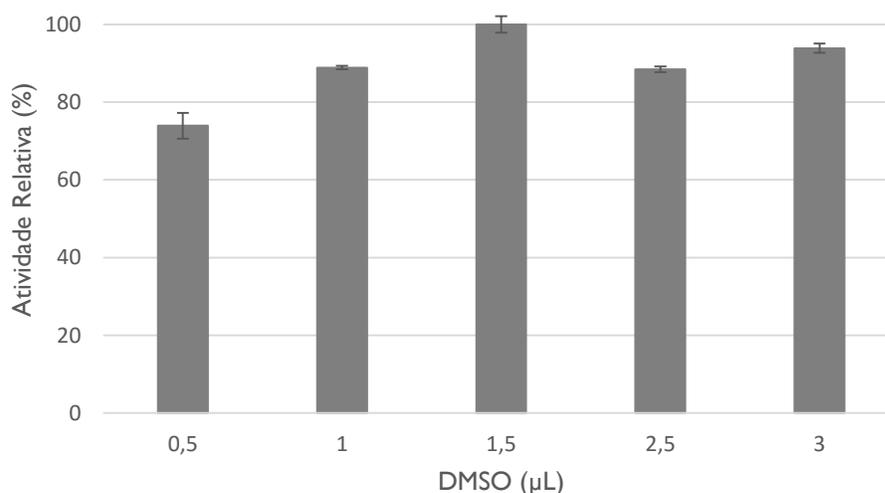


Figura 24 - Atividade da enzima 3 β -HSD determinada após adição de DMSO à reação.

3.4.6 Inibição por Colestenona e NADH

As enzimas podem ser inibidas pelos seus produtos. Os produtos formados da reação de oxidação do colesterol pela enzima 3 β -HSD são a colestenoa e NADH e assim, testou-se a sua capacidade de inibição da enzima, representados nas figuras 25 e 26, respetivamente.

A enzima apresenta alguma inibição por colestenoa. A adição de 600 μ M de colestenoa à reação levam a uma perda de 20% de atividade (Figura 25). No entanto, as reações para caracterização desta enzima foram monitorizadas durante 10 minutos, o que mesmo nas condições ótimas de atividade a formação de produto não será suficiente para afetar a atividade.

A presença de NADH na reação tem efeito inibidor na atividade enzimática, mesmo a baixas concentrações a enzima perde cerca de 20% da sua atividade (Figura 26).

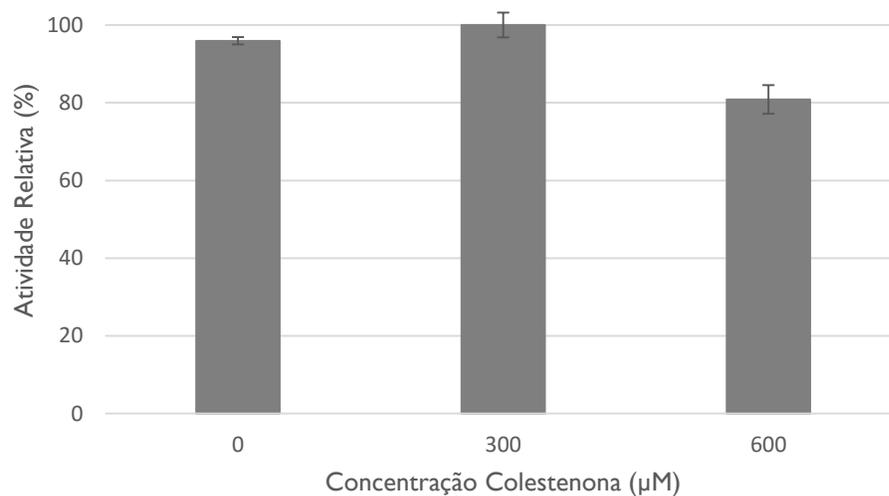


Figura 25 - Inibição da atividade da enzima 3β -HSD por colestenoa.

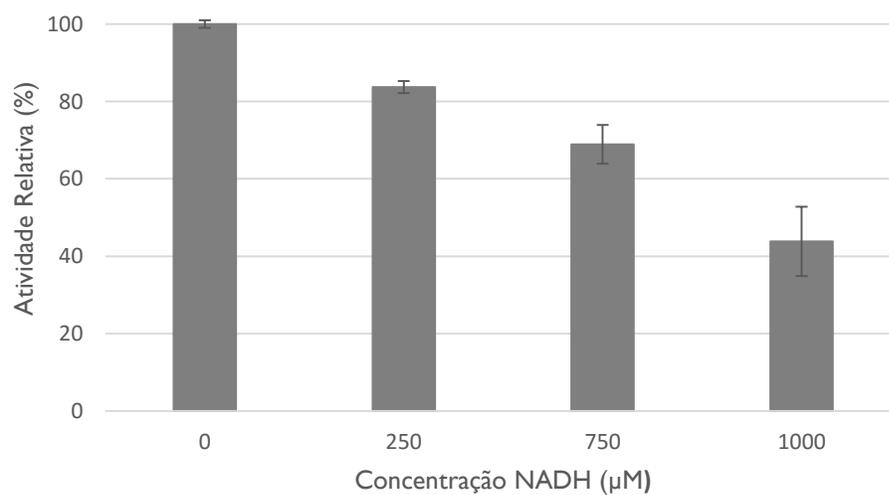


Figura 26 - Inibição da atividade da enzima 3β -HSD por NADH.

3.5 Inibição da Colesterol Desidrogenase 3β -HSD (*Rv1106c*) por Compostos Esteróides

De todos os esteróides testados, apenas três são utilizados pela enzima como substratos, sendo eles a pregnenolona, a 16α -hidroxipregnenolona e a DHEA (Figura 27). Comparativamente com o colesterol, estes substratos são processados com menor eficiência, especialmente DHEA, apresentando apenas 15% de atividade máxima obtida com colesterol.

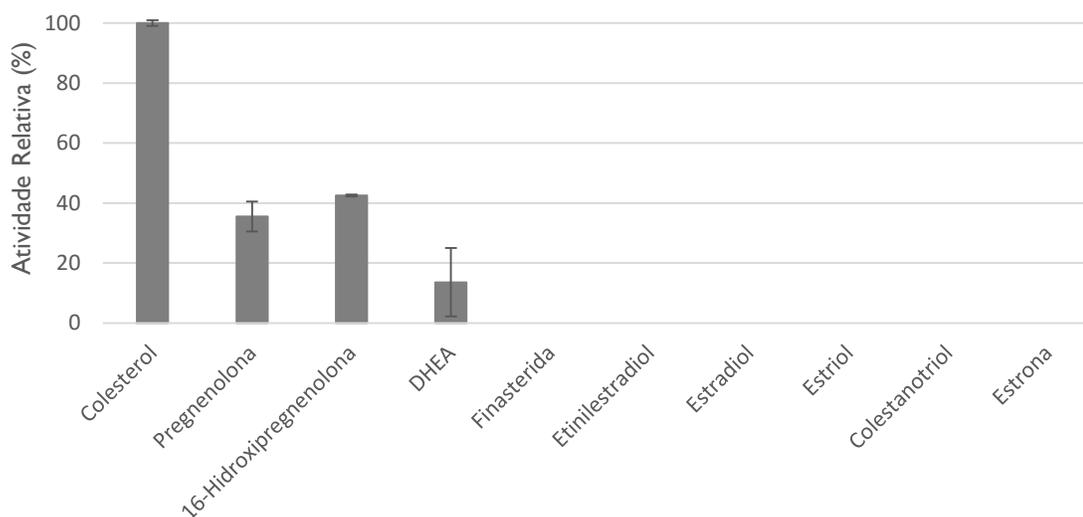


Figura 27 - Esteróides testados como possíveis substratos da enzima 3β -HSD em misturas de reação com 50 mM BTP a pH 9,0, 750 μ M do esteróide, 3% Triton X-100, 1,5 mM NAD e 15 mM $MgCl_2$.

Para os esteróides utilizados pela enzima como substratos, testaram-se concentrações do cofator NAD entre 0,35 e 1,5 mM, para 750 μ M de esteróide, de modo a comparar a atividade da enzima variando a concentração de NAD. Com base na figura 28, podemos confirmar que a DHEA apresenta uma atividade muito baixa, sendo nula a 0,35 mM de NAD e os restantes esteróides apresentam cerca de metade da atividade em relação ao colesterol.

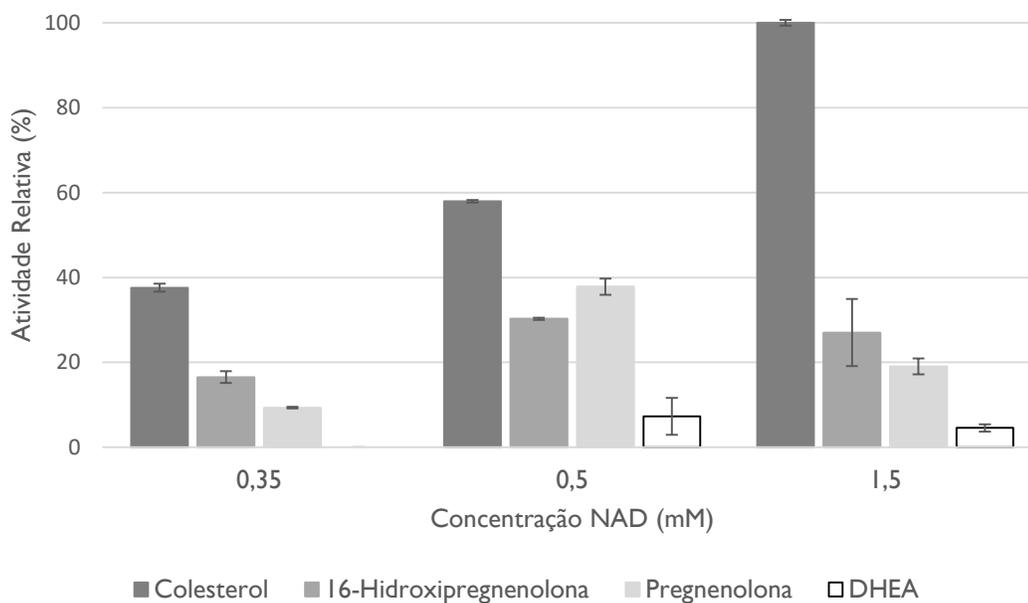


Figura 28 - Esteróides testados como substratos da enzima 3β-HSD na presença de diferentes concentrações de NAD.

Os esteróides que não eram substratos foram testados como potenciais inibidores da enzima 3β-HSD. Por estar descrito o seu efeito inibidor, o primeiro a ser testado foi o azasteróide finasterida (Figura 29). O colestanoetriol apresenta também um ligeiro efeito inibidor da atividade da enzima (Figura 30). Dos restantes análogos testados nenhum exibe efeito inibidor, sendo que o etinilestradiol e o estriol parecem ter um ligeiro efeito potenciador na atividade da enzima.

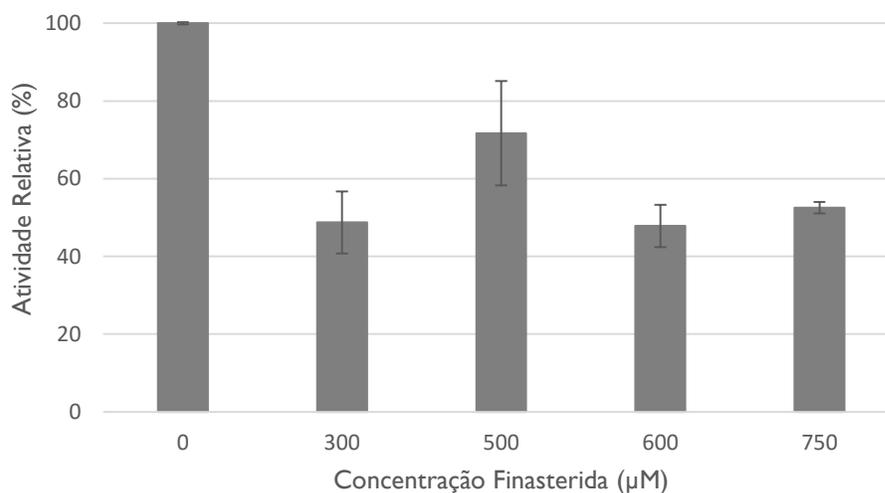


Figura 29 – Atividade da finasterida como potencial inibidor da enzima 3β-HSD.

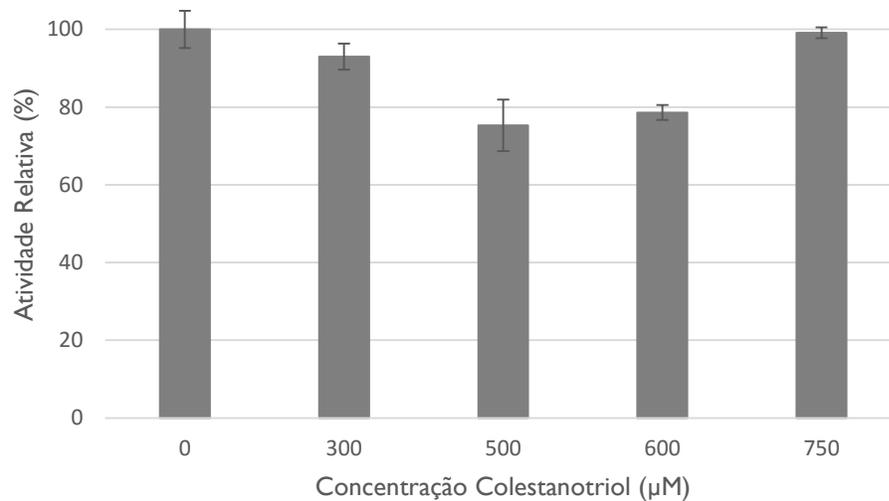


Figura 30 - Atividade do colestanoetriol como potencial inibidor da enzima 3β -HSD.

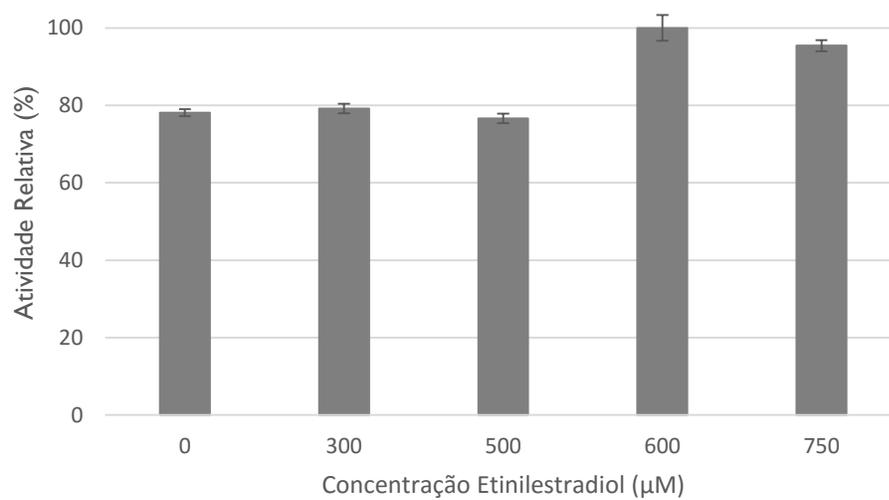


Figura 31 Atividade do etinilestradiol como potencial inibidor da enzima 3β -HSD.

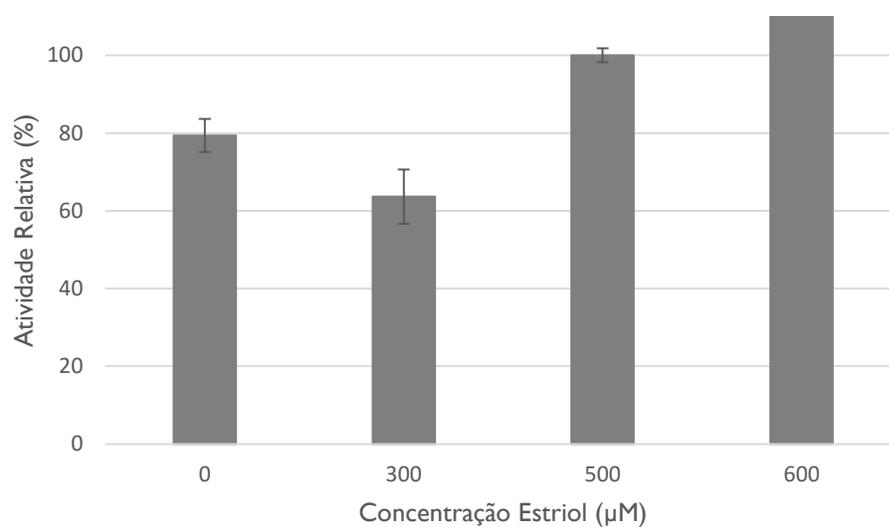


Figura 32 - Atividade do estradiol como potencial inibidor da enzima 3β-HSD.

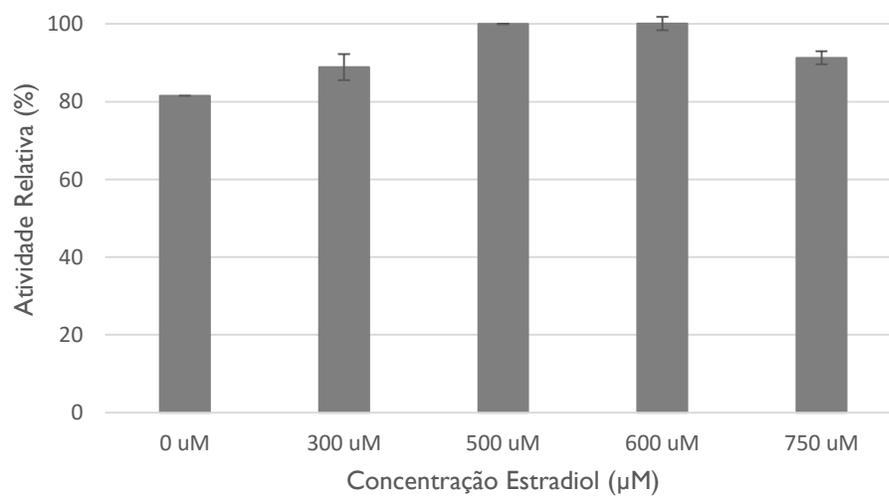


Figura 33 - Atividade do estradiol como potencial inibidor da enzima 3β-HSD.

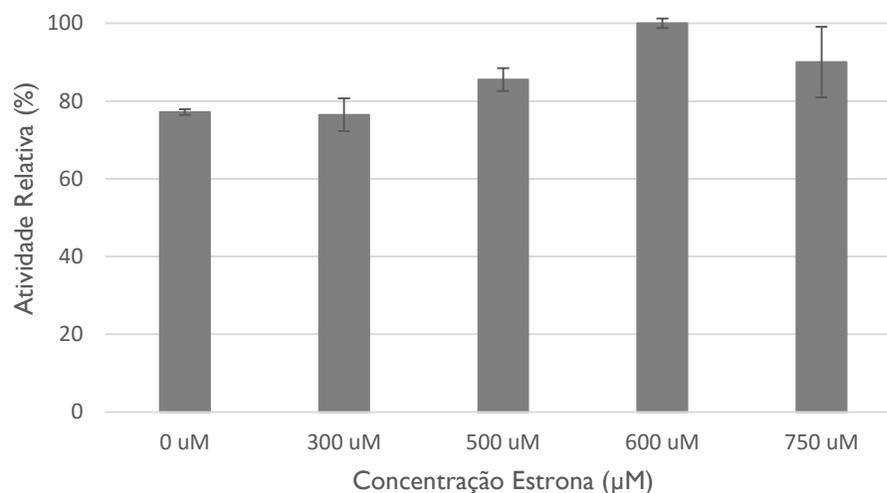


Figura 34 - Atividade da estrona como potencial inibidor da enzima 3 β -HSD.

3.6 Cálculo das Constantes Cinéticas

Os parâmetros cinéticos da 3 β -HSD recombinante calculados (K_M , V_{max}) para os substratos colesterol, pregnenolona e 16 α -hidroxipregnenolona com o cofator NAD estão indicados na Tabela 2.

A atividade limitada para o substrato pregnenolona apenas permitiu o cálculo das constantes cinéticas a 1,5 mM de NAD, a outras concentrações mais baixas a atividade da enzima não é suficiente para permitir o cálculo das constantes cinéticas. Em relação ao substrato DHEA, nenhuma das concentrações de NAD utilizadas foi possível conseguir uma atividade que permitisse o cálculo das constantes cinéticas.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos calculados para a enzima 3 β -HSD.

Substrato (A)	Cofator NAD (B) (mM)	K_M (μ M)	V_{max} (μ mol/min/ mg)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_M (μ mol/min)	K_D^{**} (μ M)
Colesterol	1,5	1033 \pm 283	3,26 \pm 0,56	23,6 \pm 4,0	2,28 ⁻² \pm 4,49E ⁻³	
	0,5	195 \pm 72	0,61 \pm 0,07	4,4 \pm 0,5	2,28 ⁻² \pm 5,39E ⁻³	
	(0,35-3) *	1060 \pm 740	3,31 \pm 1,41	23,9 \pm 8,4	2,26E ⁻² \pm 1,17E ⁻²	503 \pm 324
16 α - Hidroxi pregnenolona	1,5	740 \pm 439	1,03 \pm 0,35	7,4 \pm 2,56	1,01E ⁻² \pm 4,20E ⁻³	
	0,5	1270 \pm 461	1,52 \pm 0,36	11,0 \pm 2,6	8,66E ⁻³ \pm 2,29E ⁻³	
	(0,35-3) *	248 \pm 210	0,72 \pm 0,18	5,2 \pm 1,6	2,11E ⁻² \pm 1,08E ⁻²	539 \pm 560
Pregnenolona	1,5	555 \pm 163	0,61 \pm 0,09	4,4 \pm 0,7	8,02E ⁻³ \pm 1,61E ⁻³	

* Calculado com base na equação 3

** Constante de dissociação em equilíbrio (calculada para NAD em relação à enzima)

CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO

A cada minuto, três pessoas no mundo morrem com tuberculose. Com mais de 8 milhões de novos casos de doença ativa e cerca de 1,5 milhões de mortes por ano, a TB é considerada uma emergência de saúde global (OMS, 2015). Esta doença não afeta de igual modo homens e mulheres, sendo que homens adultos têm mais do dobro do risco de desenvolver tuberculose ativa, podendo haver um papel protetor das hormonas sexuais femininas neste processo (Bini et al., 2014; Neyrolles & Quintana-Murci, 2009). A bactéria *Mycobacterium tuberculosis* é o agente patogénico causador da TB, transmitido de pessoa para pessoa por inalação. Nos pulmões, Mtb é fagocitado por macrófagos, que se pensa ser a célula hospedeira predominante para a maioria do ciclo de vida infeccioso (Galagan, 2014).

O Mtb pode infetar, crescer e sobreviver dentro dos macrófagos, utilizando mecanismos que ainda não são bem compreendidos. Contudo, diversas linhas de evidência sugerem que as micobactérias patogénicas utilizam lípidos do hospedeiro, nomeadamente colesterol, como fonte de carbono, desempenhando um papel importante na sobrevivência de Mtb durante a infeção (Ouellet et al., 2011). A infeção por Mtb nos macrófagos altera o seu ambiente intracelular, causando uma desregulação da biossíntese lipídica. Consequentemente, leva à formação de um granuloma que apresenta uma abundância de lípidos, sendo esta composição conveniente para Mtb visto que é capaz de utilizar colesterol como fonte de carbono. Apesar do papel preponderante deste esteróide na infeção de Mtb, o seu metabolismo ainda não se encontra totalmente desvendado. A sequenciação do genoma Mtb em 1998 (Cole et al., 1998) abriu a porta para uma melhor compreensão do metabolismo de colesterol em micobactérias patogénicas. No genoma de Mtb foram anotados cerca de 250 genes envolvidos no metabolismo de lípidos e ácidos gordos (Brzostek et al., 2007; Wiperman et al., 2014). Dos genes anotados, foram selecionados para este trabalho dois genes que estão descritos como capazes de oxidar colesterol: colesterol oxidase/ChoD (*Rv3409c*) e colesterol desidrogenase/3 β -HSD (*Rv1106c*).

A enzima 3 β -HSD (*Rv1106c*) foi caracterizada enzimaticamente (Yang et al., 2007), sendo capaz de converter o colesterol em colesteno, enquanto que para a enzima ChoD (*Rv3409c*) esta capacidade ainda não foi demonstrada. Assim, o motivo da utilização destas enzimas neste trabalho foi tentar encontrar o substrato específico da ChoD utilizando a 3 β -HSD como um controlo positivo, bem como o teste de outros substratos e compostos esteróides que pudessem ter efeito inibidor da 3 β -HSD.

A ChoD é uma flavoenzima dependente do cofator FAD comumente conhecida por catalisar a oxidação e a isomerização de colesterol a colesteno e consequente produção de H_2O_2 (Vrielink, 2010; Brzostek et al., 2007). Normalmente, esta enzima é extracelular e surge numa forma segregada ou associada à parede celular (Kreit & Sampson, 2009; Vrielink, 2010; Bednarska et al., 2014). Um aspeto importante da catálise desta enzima é a sua capacidade de associação com a bicamada lipídica que contém o substrato esteroide, nomeadamente colesterol.

O gene *Rv3409c* anotado em *Mtb* como ChoD foi considerado essencial para a virulência deste patogénico (Brzostek et al., 2007), dado que as ChoDs são as enzimas mais comumente associadas com o primeiro passo da via de degradação de colesterol. Estando este gene anotado como tal, os autores do estudo relacionaram a sua essencialidade com a função na degradação do colesterol. No entanto, estudos posteriores indicam que nem esta enzima, nem a sua homóloga em *Mycobacterium smegmatis* MSMEG1604 degradam colesterol, mas que apresentam uma função imunossupressora, atuando ao nível do macrófago, especialmente do recetor TLR2 (Bednarska et al., 2014; Brzostek et al., 2013; Gao & Sampson, 2014). Estudos de mutagénese verificaram que a disrupção deste gene em *M. smegmatis* levava à acumulação de uma forma alterada de glicopeptidolípido hiper-ramnosilado (LI334) incomum, propondo assim que o gene *Rv3409c/MSMEG1604* esteja envolvido na produção deste composto que poderá ter propriedades imunomoduladoras (Gao & Sampson, 2014).

O facto de a enzima ChoD não utilizar colesterol como substrato foi também por nós confirmado neste trabalho. Contudo, devido à sua anotação como ChoD foram testados outros substratos lipídicos, nomeadamente pregnenolona e DHEA, dado que a enzima poderia ter a capacidade de degradar outros produtos da via de biossíntese do colesterol. Verificou-se, assim, que estes esteróides também não são substratos para a enzima ChoD de *Mtb*. Estes resultados foram testados por TLC, tendo como controlo positivo a enzima 3β -HSD, que oxida estes esteróides (facto confirmado neste trabalho). Todavia, a deteção dos produtos oxidados por TLC revelou-se problemática. Assim, estas reações deveriam ser repetidas na presença de um teste colorimétrico para deteção da produção de H_2O_2 como o teste catalase em que H_2O_2 reage rapidamente com fenol e 4-aminoantipirina produzindo uma coloração rosa.

A ChoD *Mtb* pertence à família GMC oxidorreductase que inclui glucose oxidases, piranose oxidases, metanol oxidases e colina oxidases. Assim, não é surpreendente que esta enzima tenha homologia estrutural com uma piranose-2-oxidase (PDB ID: 4MOG). No entanto, tendo em conta que parece estar envolvida na síntese de um glicopeptidolípido hiper-ramnosilado pareceu-nos

possível que um carboidrato ainda não testado pudesse ser o seu substrato. Assim, a glucose e a maltose foram testadas como possíveis substratos da enzima ChoD, mas também não foram utilizados. Adicionalmente, como a homologia de ChoD de Mtb com outras ChoDs com atividade confirmada é limitada, concordamos com a afirmação dos outros autores que a função desta enzima está mal anotada, não sendo uma colesterol oxidase e o seu verdadeiro substrato permanece desconhecido.

A 3 β -HSD é uma enzima expressa por Mtb intracelularmente e usa NAD como cofator para oxidar o colesterol a colesteno. Outros esteróides foram identificados como substratos desta enzima, sendo capaz de oxidar pregnenolona e DHEA aos seus respectivos produtos 3-ceto-4-ona (Yang et al., 2007). Inicialmente tentou-se expressar o gene correspondente *Rv1106c* utilizando o vetor de expressão pET30a. Paralelamente às tentativas de expressão deste gene noutros vetores de expressão, tentou-se a expressão do gene homólogo de *Mycobacterium marinum*, MMAR_4359. O motivo da escolha de *M. marinum* deveu-se à estreita relação genética entre estas duas micobactérias, apresentando uma identidade de aminoácidos de 85% (Stinear et al., 2008). Curiosamente, não houve oxidação do colesterol por parte desta preparação enzimática de *M. marinum*, em nenhuma das condições testadas. Embora o metabolismo de colesterol não tenha sido estudado especificamente em *M. marinum*, apenas a formação de corpos lipídicos durante a infecção (à semelhança de Mtb) e manipulação destas reservas lipídicas. Estes estudos foram conduzidos no modelo de infecção *Dictyostelium discoideum* um organismo unicelular que sintetiza sitosterol e não colesterol (Barisch et al., 2015). Apesar da visualização de uma banda com peso molecular esperado para esta enzima em SDS-PAGE, a identidade da mesma não foi confirmada por espectrometria de massa (MS), o que sugere que a proteína MMAR_4359 poderá não ter sido adequadamente expressa e que a banda visível será uma proteína de *E. coli*, a bactéria hospedeira utilizada para expressão recombinante.

Com recurso a um vetor de expressão (pETM-11) obteve-se a proteína 3 β -HSD de Mtb em forma solúvel, o que permitiu purificar a proteína. Para verificar se a enzima apresentava atividade, testou-se colesterol como substrato e foi desde logo possível confirmar a oxidação do colesterol a colesteno por TLC.

O uso de caudas de afinidade, especialmente uma cauda de histidinas, facilita enormemente a purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade em colunas carregadas com níquel. No entanto, em alguns casos a presença da cauda de histidinas pode alterar a conformação estrutural da proteína, e conseqüentemente a sua atividade (Arnau et al., 2008).

Portanto, decidiu-se remover a cauda de histidinas do N-terminal com uma protease específica, TEV, de modo a avaliar o efeito da ausência da cauda na atividade específica da enzima. Após a remoção da cauda, verificou-se uma ligeira diminuição da atividade relativamente à enzima com cauda. Assim, o trabalho de caracterização foi efetuado com a enzima com a cauda de histidinas, pois para além de esta apresentar atividade específica ligeiramente superior, o protocolo de purificação permitiu obter um maior rendimento, aproximadamente 2 mg de proteína pura por litro de cultura. Durante o processo de remoção da cauda com TEV, perdeu-se bastante proteína e o rendimento de não ultrapassou os 0,17 mg de proteína pura por litro de cultura.

As infeções por *Mycobacterium tuberculosis* ocorrem com mais frequência em homens do que em mulheres, um fenómeno que pode envolver hormonas esteróides (Nhamoyebonde & Leslie, 2014; Bini et al., 2014). A enzima 3 β -HSD é capaz de metabolizar hormonas esteróides, regulando o equilíbrio entre esteróides ativos e inativos (García-Gómez et al., 2013). Estudar a suscetibilidade sexual através da inibição da enzima com hormonas de esteróides sexuais foi outro objetivo deste trabalho e como tal investigaram-se as condições ótimas da enzima 3 β -HSD para, posteriormente, proceder-se aos testes na presença das hormonas esteróides.

Para as condições ótimas da enzima realizou-se um perfil de temperaturas o qual a enzima apresenta uma temperatura ótima a 27°C. Como não foi possível trabalhar a uma temperatura de 27°C, utilizou-se a temperatura ótima para atividade da enzima a 30°C, sendo esta também considerada a temperatura ótima no estudo de Yang et al., 2007. Também se realizou um perfil de pH e esta enzima apresenta uma curta gama de pHs, sendo o pH ótimo 9,0 (o mesmo pH obtido no mesmo estudo).

A enzima não é dependente de catiões para a sua atividade, no entanto a presença dos iões divalentes Mg²⁺ e Ca²⁺ e dos iões monovalentes Na⁺ e K⁺ têm um grande efeito na atividade da enzima. Assim, ao contrário do anteriormente descrito (Yang et al., 2007), a enzima em estudo apresenta uma melhor atividade específica na presença de Mg²⁺ e não de Ca²⁺ e a ação combinada de Mg²⁺ e NaCl não apresenta diferença considerável em relação a Mg²⁺ por si só.

Esta enzima é dependente do cofator NAD que é reduzido a NADH. Nas condições testadas, a enzima apresenta atividade máxima com 1,5 mM de NAD, e acima desta concentração perde progressivamente atividade. Esta inibição deve-se ao facto de o NADH se comportar como um inibidor competitivo em relação ao NAD na reação catalisada pela 3 β -HSD (Bremer, 1969; Yang et al., 2007), o que torna o cálculo das constantes catalíticas bastante complexo, como discutido abaixo.

Para além do colesterol, as hormonas esteróides testadas foram: pregnenolona, 16 α -hidroxipregnenolona, DHEA, finasterida, etinilestradiol, estradiol, estriol, colestanoetriol e estrona. Começaram por ser testados todos os esteróides para se averiguar se eram substratos da enzima; os que não eram substratos testaram-se como possíveis inibidores da enzima.

De todos os esteróides testados, apenas três eram utilizados pela enzima como substratos, sendo eles a pregnenolona, 16 α -hidroxipregnenolona e a DHEA. Comparativamente com o colesterol, estes substratos apresentaram uma atividade baixa, especialmente a DHEA. Este estudo permitiu concluir que o substrato preferencial da enzima é colesterol, embora esta enzima de *Mtb* também consiga oxidar pregnenolona, 16 α -hidroxipregnenolona e a DHEA aos seus respetivos produtos progesterona e androsterona. A utilização de pregnenolona e DHEA já tinham sido anteriormente descritas (Yang et al., 2007) e nas condições testadas pelos autores a enzima era igualmente específica para pregnenolona e três vezes menos específica para o colesterol. Os resultados da enzima em estudo no presente trabalho contrariam estas observações, porque esta enzima apresentou uma clara preferência para colesterol, seguido de 16 α -hidroxipregnenolona (embora o valor globalmente calculado de K_{cat}/K_M seja semelhante para estes dois substratos, a V_{max} para o colesterol e o K_{cat} são muitíssimo superiores), pregnenolona (cerca de três vezes inferior). A oxidação de DHEA decorreu com uma atividade vestigial e não foi possível calcular constantes cinéticas. Quando possível duas formas de cálculo das constantes são apresentadas devido à inibição do substrato pelo cofator NAD e produto NADH.

A especificidade de substratos aqui apresentados é mais semelhante à reportada para a enzima homóloga de *Nocardia spp.* (Kishi et al., 2000). Esta enzima utiliza colesterol e pregnenolona, mas não DHEA. Para justificar esta diferença, Yang e colaboradores propuseram que poderia haver diferenças nas condições dos ensaios enzimáticos, nomeadamente devido à utilização de diferentes tampões e concentrações de agentes de solubilização (Yang et al., 2007).

Os substratos pregnenolona e DHEA são hidrossolúveis e possibilitam a realização dos ensaios enzimáticos na ausência de detergente. Como tal, os autores justificam que a menor afinidade da enzima para o colesterol resulta, possivelmente, deste ser um fraco substrato ou devido à interferência do detergente na atividade da enzima. A eficiência catalítica mais baixa obtida neste estudo para 3 β -HSD em relação ao estudo de Yang e colaboradores para os substratos comuns aos dois estudos, pregnenolona e DHEA, poderia justificar esta hipótese. Contudo, no estudo deste trabalho verificou-se que as concentrações utilizadas de detergente não afetam a atividade enzimática e para, verdadeiramente despistar esta possibilidade, os ensaios com os substratos

pregnenolona e DHEA foram realizados na presença e ausência de detergente, com os mesmos resultados.

Todavia, reconhecemos um problema de saturação da enzima com colesterol. Para o cálculo de constantes cinéticas, a saturação de substrato é um parâmetro essencial, devido ao facto da velocidade inicial da reação aumentar gradualmente com o aumento da concentração de substrato. A total saturação da enzima permite que a sua velocidade seja independente da concentração de substrato. No caso particular desta enzima, os problemas em atingir concentrações saturantes de colesterol foram devidos a uma limitação do próprio ensaio (difícil solubilização de colesterol) e dificultada pela própria reação, dependente do cofator, mas inibida por ele próprio e pelo subproduto. Assim, o K_M aparente calculado nas condições ótimas (1,5 mM de NAD) é $1033 \pm 283 \mu\text{M}$ e para as várias concentrações de NAD (0,35-3 mM NAD) é $1060 \pm 740 \mu\text{M}$. Apesar das limitações referidas, a fórmula de cálculo das constantes cinéticas utilizada tendo em conta as várias concentrações de NAD inclui as concentrações mais baixas do cofator às quais a enzima está saturada (tabela 2 – ex: 0,5 mM NAD) dando alguma robustez a estes valores. Kishi et al. apresentam o mesmo problema de saturação para a enzima de *Nocardia spp.* com K_M calculado para o colesterol 2,5 mM e concentração mais alta de colesterol utilizada 2,9 mM.

No estudo de Yang e colaboradores, após a construção de um mutante do gene *Rv1106c* (3 β -HSD), a atividade de oxidação de colesterol foi extinta. Este resultado implica que em *Mtb* esta 3 β -HSD (*Rv1106c*) é a única enzima que oxida colesterol. A interrupção da atividade enzimática é uma boa ferramenta para a descoberta de moléculas que possam inibir completamente a oxidação do colesterol *in vivo* em *Mtb*, especialmente devido à importância recentemente descoberta do metabolismo de colesterol em *Mtb* (Yang et al., 2007; Griffin et al., 2012). Adicionalmente, devido à relação entre sexo e diferença na taxa de incidência de TB e o efeito protetor de hormonas sexuais, o trabalho foi focado em esteróides sexuais e outros compostos esteróides, como potenciais inibidores desta enzima.

Apenas finasterida (azasteróide já descrito como inibidor (Thomas et al., 2011) e o colestanoetriol apresentam uma ligeira inibição da enzima 3 β -HSD, resultado não observado com os esteróides sexuais como o etinilestradiol, estriol, estradiol e estrona que não apresentaram qualquer inibição nas condições testadas, alguns inclusivamente apresentaram até uma ligeira estimulação da atividade da enzima.

A finasterida é um azasteróide indicada para o tratamento da hiperplasia benigna da próstata e alguns cancros da próstata, porque inibe a enzima 5 α -redutase que catalisa a produção de

desidrotestosterona a partir da testosterona. A atividade de azasteróides, particularmente da finasterida, como inibidores de vias biossintéticas de esteróides foi reportada (Thomas et al., 2011).

O colestanoetriol é um oxisterol que se forma *in vivo* por oxidação química e/ou enzimática do colesterol. Os oxisteróis foram reconhecidos por afetarem respostas do sistema imunitário e têm sido implicados na suscetibilidade de doenças infecciosas, tais como a tuberculose (Bah et al., 2016). Foi demonstrado que oxisteróis, como o colestanoetriol, acumulam-se em macrófagos em doenças como aterosclerose, desencadeando a apoptose e/ou necrose *in vitro* (Engel et al., 2014). Apesar de ser uma ligeira inibição podemos sugerir que ao inibir ligeiramente, a enzima há uma redução do consumo de colesterol e como consequência poderá ter um efeito benéfico no controlo da infeção por micobactérias.

Das hormonas esteróides sexuais testadas, nenhuma inibiu a atividade da enzima o que nos deixa sem conclusões sobre possíveis implicações destas moléculas no aparente desequilíbrio observado na suscetibilidade sexual para a tuberculose.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi testar vários esteróides como possíveis substratos ou inibidores das enzimas ChoD (*Rv3409c*) e 3 β -HSD (*Rv1106c*) anotadas como estando envolvidas no metabolismo do colesterol, consideradas essenciais para a sobrevivência de *Mtb in vitro* e necessárias para a utilização de colesterol como fonte de carbono.

Confirmámos que, nas condições testadas, a enzima ChoD não oxida colesterol, concluindo que a anotação desta enzima como provável colesterol oxidase está provavelmente mal atribuída. Os domínios conservados detetados na sequência desta enzima sugerem que pertence à família GMC oxidorredutase, enzimas que apresentam um domínio de ligação ao cofator FAD, um cofator altamente conservado e, entre si, um domínio de ligação ao substrato bastante variável (Vrieling & Ghisla, 2009). A enzima ChoD apresenta esta homologia com o local de ligação FAD e variabilidade no local de ligação do substrato, tanto em relação a colesterol oxidases caracterizadas como a outros membros da família GMC oxidorredutase. O substrato fisiológico desta enzima permanece um mistério. A caracterização e correta anotação desta enzima passará pela identificação do seu substrato.

Estudos anteriores concluíram que 3 β -HSD de *Mtb* é a única enzima que esta bactéria utiliza para oxidar colesterol. A tentativa de encontrar um inibidor para esta enzima passou forçosamente por um primeiro passo de otimização das condições de ensaio de atividade e caracterização da enzima. Os resultados apontam para que algumas das propriedades diferem das anteriormente reportadas para a mesma enzima, nomeadamente o substrato preferencial desta enzima, colesterol, seguido de 16 α -hidroxipregnenolona, pregnenolona e a uma utilização quase vestigial de DHEA. Pelo contrário, a enzima anteriormente estudada apresentava clara preferência por DHEA. A não preferência por colesterol e a localização intracelular da enzima 3 β -HSD levou os autores a questionar o papel desta enzima no metabolismo de colesterol. No entanto, os resultados de preferência de substrato obtidos no presente estudo quando observados em conjunto com a descoberta de um sistema de importação de colesterol em micobactérias volta a apontar para um papel preponderante desta enzima no metabolismo do colesterol.

Dos esteróides testados como inibidores da enzima 3 β -HSD apenas a finasterida e o colestanoetriol inibiam ligeiramente a atividade enzimática. Seria, assim, interessante explorar o efeito inibitório do colestanoetriol, cujo resultado obtido neste estudo é muito preliminar, assim como apostar no teste de outros possíveis inibidores que tenham em conta a estrutura deste composto. Uma vez que os esteróides sexuais utilizados neste estudo não inibiram a atividade da

enzima 3β -HSD, a hipótese de que estas hormonas, devido à sua analogia com o colesterol, poderiam influenciar o metabolismo deste esteróide e ter um papel na suscetibilidade à TB, mais prevalente nos homens do que nas mulheres, não pôde ser confirmada nas condições testadas.

BIBLIOGRAFIA

AI, Jing-Wen et al. - Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging Microbes and Infections*. 5, (2016) 1–8.

ARNAU, J. et al. - The use of TAGZyme for the efficient removal of N-terminal his-tags. In: Michael Zachariou. *Affinity Chromatography. Methods and Protocols*. 2^a Ed., Totowa, USA: Humana Press, 2008, ISBN: 978-1-58829-659-7. p. 229-230.

BAH, Saikou Y. et al. - Immune oxysterols: Role in mycobacterial infection and inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Epub ahead, (2016).

BARISCH, Caroline et al. - Lipid droplet dynamics at early stages of *Mycobacterium marinum* infection in *dictyostelium*. *Cellular Microbiology*. 17, 9 (2015) 1332–49.

BEDNARSKA, Katarzyna et al. - Cholesterol oxidase binds TLR2 and modulates functional responses of human macrophages. *Mediators of Inflammation*. 2014, (2014) 1–13.

BINI, Estela Isabel et al. - The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 9, 4 (2014) e93831.

BREMER, J. - Pyruvate dehydrogenase, substrate specificity and product inhibition. *European J. Biochem*. 8, (1969) 535–40.

BRZOSTEK, Anna et al. - Cholesterol oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett*. 275, 1 (2007) 106–12.

BRZOSTEK, Anna et al. - *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *Journal of Bacteriology*. 191, 21 (2009) 6584–91.

BRZOSTEK, Anna et al - ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 134, (2013) 1–7.

CHISHOLM, Rebecca H.; TANAKA, Mark M. - The emergence of latent infection in the early evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Biol. Sci*. 283, 1831 (2016) 1–8.

CLARKE, C. et al. - Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. *Journal of the South African Veterinary Association*. 87, 1 (2010) 1–7.

COLE, S. T. et al. - Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393, 6685 (1998) 537–44.

DANIEL, Thomas M. - The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. 100, 11 (2006) 1862–70.

DAVIS, J. Muse; RAMAKRISHNAN, Lalita - The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 136, 1 (2009) 37–49.

DHEDA, Keertan; BARRY, Clifton E.; MAARTENS, Gary - Tuberculosis. *Lancet*. 6736, 15 (2015) 1–17.

DOLENC-VOLJC, M.; ZOLNIR-DOVE, M. - Delayed diagnosis of *Mycobacterium marinum* infection: A case report and review of the literature. *Acta Dermatovenerol APA*. 19, 2 (2010) 35–39.

DOUKYU, Noriyuki - Characteristics and Biotechnological Applications of Microbial Cholesterol Oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 83, 5 (2009) 825–37.

DYE, Christopher - Doomsday postponed? Preventing and reversing epidemics of drug-resistant tuberculosis. *Nature Reviews Microbiology*. 7, 1 (2009) 81–87.

ENGEL, Thomas et al. - 3β , 5α , 6β -cholestanetriol and 25-hydroxycholesterol accumulate in ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1)-deficiency. *Atherosclerosis*. 235, 1 (2014) 122–29.

FALETROV, Yaroslav V. et al - 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 134, (2013) 59–66.

FALKINHAM, Joseph O. - Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*. 107, 2 (2009) 356–67.

FALKINHAM, Joseph O. - Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiology*. 5, 6 (2010) 951–60.

FALKINHAM, Joseph O. - Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine*. 36, 1 (2015) 35–41.

FORTUNE, Sarah M.; RUBIN, Eric J. - The complex relationship between mycobacteria and macrophages: It's not all bliss. *Cell Host & Microbe*. 2, 1 (2007) 5–6.

GALAGAN, James E. - Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics*. 15, 5 (2014) 307–20.

GAO, Jin; SAMPSON, Nicole S. - A GMC oxidoreductase homologue is required for acetylation of glycopeptidolipid in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry*. 53, 4 (2014) 611–13.

GARCÍA-GÓMEZ, Elizabeth; GONZÁLEZ-PEDRAJO, Bertha; CAMACHO-ARROYO, Ignacio - Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed Research International*. 2013, (2013) 1–10.

GLICKMAN, Michael S.; JACOBS, William R. - Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell*. 104, 4 (2001) 477–85.

GLUCKMAN, Stephen J. - *Mycobacterium marinum*. *Elsevier Science Inc*. 13, 3 (1995) 273–76.

GRIFFIN, Jennifer E. et al - Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chemistry & Biology*. 19, 2 (2012) 218–27.

INGEN, Jakko et al. - Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging Infectious Diseases*. 18, 4 (2012) 653–55.

JACIN, H.; MISHKIN, A. - Separation of carbohydrates on borate-impregnated silica gel G plates. *J. Chromatogr*. 18, (1965) 170–73.

KAUFMANN, Stefan H. E.; McMICHAEL, Andrew J. - Annulling a dangerous liaison: Vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine*. 11, 4 (2005) S33–44.

KISHI, Koji et al. - The characteristics and applications of recombinant cholesterol dehydrogenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64, 7 (2000) 1352–58.

KLINK, Magdalena et al. - Cholesterol oxidase is indispensable in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 8, 9 (2013) e73333.

KORB, Vanessa C.; CHUTURGOON, Anil A.; MOODLEY, Devapregasan - *Mycobacterium tuberculosis*: Manipulator of protective immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 3 (2016) 1–15.

KREIT, Joseph; SAMPSON, Nicole S. - Cholesterol oxidase: Physiological functions. *FEBS J*. 276, 23 (2009) 6844–56.

LONNROTH, Knut et al. - Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. *Social Science & Medicine*. 68, 12 (2009) 2240–46.

LOVEWELL, Rustin R.; SASSETTI, Christopher M.; VANDERVEN, Brian C. - Chewing the fat: Lipid metabolism and homeostasis during *M. tuberculosis* infection. *Current Opinion in Microbiology*. 29, (2016) 30–36.

LUU-THE, V. - Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 137, (2013) 176–82.

MCGRATH, Emmet E. et al. - Nontuberculous mycobacteria and the lung: From suspicion to treatment. *Lung*. 188, 4 (2010) 269–82.

MEIERAN, Sharon E. - Chronic pregnenolone effects in normal humans: Attenuation of benzodiazepine-induced sedation. *Psychoneuroendocrinology*. 29, 4 (2004) 486–500.

MERINO, E. et al. - Isolation of cholesterol and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: Evidence of a common pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97, 2 (2012) 891–904.

MILLER, Walter L. - Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular And Cellular Endocrinology*. 379, 1-2 (2013) 62–73.

MILLER, Walter L.; AUCHUS, Richard J. - The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*. 32, 1 (2011) 81–151.

MURRAY, John F.; SCHRAUFNAGEL, Dean E.; HOPEWELL, Philip C. - Treatment of tuberculosis. A historical perspective. *Ann. Am. Thorac. Soc*. 12, 12 (2015) 1749–59.

NAVAS, Jesús et al. - Identification and mutagenesis by allelic exchange of choE, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology*. 183, 16 (2001) 4796–4805.

NEYROLLES, Olivier; QUINTANA-MURCI, Lluís - Sexual inequality in tuberculosis. *PLoS Medicine*. 6, 12 (2009) e1000199.

NGUYEN, Liem - Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: An update. *Archives of Toxicology*. 90, 7 (2016) 1585–1604.

NHAMOYEBONDE, Shepherd; LESLIE, Alasdair - Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*. 209, 3 (2014) S100–106.

NUNES-COSTA, Daniela et al. - The looming tide of nontuberculous mycobacterial infections in Portugal and Brazil. *Tuberculosis*. 96, (2016) 107–19.

World Health Organization. (2015)

O´GARRA, Anne et al. - The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 31, (2013) 475–527.

OUELLET, Hugues; JOHNSTON, Jonathan B.; ORTIZ DE MONTELLANO, Paul R. - Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*. 19, 11 (2011) 530–39.

PANDEY, Amit K.; SASSETTI, Christopher M. - Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *PNAS*. 105, 11 (2008) 4376–80.

PHILLIPS, Michael S.; REYN, C. Fordham - Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 33, 8 (2001) 1363–74.

PREVOTS, D. Rebecca; MARRAS, Theodore K. - Epidemiology of human pulmonary infection with non-tuberculous mycobacteria: A review. *Clin. Chest. Med.* 36, 1 (2016) 13–34.

PRIMM, Todd P.; LUCERO, Christie A.; FALKINHAM, Joseph O. - Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 17, 1 (2004) 98–106.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. - The mycobacteria: An introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech.* 20, 1 (2001) 21–54.

READING, Patrick C.; MOORE, Jeffrey B.; SMITH, Geoffrey L. - Steroid hormone synthesis by vaccinia virus suppresses the inflammatory response to infection. *Journal of Experimental Medicine.* 197, 10 (2003) 1269–78.

RUSSELL, David G. - Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology.* 5, 1 (2007) 39–47.

SHINNICK, T. M.; GOOD, R. C. - Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 11 (1994) 884–901.

SLANY, Michal et al. - *Mycobacterium marinum* infections in humans and tracing of its possible environmental sources. *Can. J. Microbiol.* 58, 1 (2012) 39–44.

SMITH, Issar - *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews.* 16, 3 (2003) 463–96.

STINEAR, Timothy P. et al. - Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research.* 18, 5 (2008) 729–41.

TARABORRELLI, Stefania - Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.* 94, (2015) 8–16.

THOMAS, Suzanne T.; YANG, Xinxin; SAMPSON, Nicole S. - Inhibition of the *M. tuberculosis* 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase by azasteroids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 21, 8 (2011) 2216–19.

THORSON, Anna; DIWAN, Vinod K. - Gender inequalities in tuberculosis: Aspects of infection, notification rates, and compliance. *Current Opinion in Pulmonary Medicine.* 7, 3 (2001) 165–69.

TOBIN, David M.; RAMAKRISHNAN, Lalita - Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology.* 10, 5 (2008) 1027–39.

TORTOLI, Enrico - Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: Many doubts, few certainties. *Infection, Genetics and Evolution*. 12, 4 (2012) 827–31.

TORTOLI, Enrico - Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*. 27, 4 (2014) 727–52.

VRIELINK, Alice - Cholesterol oxidase: Structure and function. *Subcellular Biochemistry*. 51, (2010) 137–58.

VRIELINK, Alice; GHISLA, Sandro - Cholesterol oxidase: Biochemistry and structural features. *FEBS Journal*. 276, 23 (2009) 6826–43.

WERF, Marieke J. et al. - Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infectious Diseases*. 14, 62 (2014) 1–9.

WIGGERS, H. J. et al. - Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. *Analytical Biochemistry*. 370, 1 (2007) 107–14.

WIPPERMAN, Matthew F.; SAMPSON, Nicole S.; THOMAS, Suzanne, T. - Pathogen roid rage: Cholesterol utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 4 (2014) 269–93.

YANG, Xinxin - Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry*. 46, 31 (2007) 9058–67.

YANG, Zhenhua et al - Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 38, 2 (2004) 199–205.

ANEXO I

(PROTÓCOLOS E SOLUÇÕES)

1) Meio *Mycobacterium*

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Glicerol	20 g	2%
Casaminoácidos	5 g	0,5%
Ácido Fumárico	1 g	0,1%
MgSO ₄	0,5 g	0,05%
K ₂ HPO ₄	1 g	0,1%
FeSO ₄	0,02 g	0,002%
Tween 80	2 g	1,52 mM
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O meio foi esterilizado por autoclave durante 20 minutos a 120°C com uma pressão de 1 atm.

2) Eletroforese em Gel de Agarose 1%

Tampão TAE 50x

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Tris base	242 g	2 M
Ácido Acético	57,1 mL	2 M
0,5 M EDTA pH 8	100 mL	50 mM

Procedeu-se à dissolução de Tris na solução aquosa de EDTA em simultâneo com o aquecimento da mistura. Foi adicionado ácido acético, seguindo-se o ajuste do pH para 8 com solução de NaOH a 5 mM. Adicionou-se água destilada para perfazer o volume final de 1 L.

Gel de Agarose 1%

Reagente	Quantidade por 100 mL	Concentração Final
Agarose	1 g	1%
Tampão TAE 1x	100 mL	1x
RedSafe™ 20000x (Intron Biotechnology)	5 µL	1x

A agarose foi dissolvida no tampão TAE 1x e esta mistura foi aquecida até ferver. A mistura foi arrefecida até deixar de libertar vapores, sendo adicionado RedSafe™ nesta fase, seguindo-se agitação ligeira para homogeneizar. Verteu-se a mistura para um suporte apropriado para o gel, foram colocados os pentes e durante 30 minutos aguardou-se que o gel polimerizasse. As amostras com loading buffer (Takara) e o marcador de pesos moleculares de DNA (NZYDNA Ladder III, NZYTech) foram aplicados no gel, tendo este sido corrido em tampão TAE 1x a 90 V durante aproximadamente 40 minutos.

3) Células Competentes de *E. coli* BL21 Star

As células de *E. coli* (estirpe BL21 Star) foram crescidas em meio LB (ver abaixo) a 37°C e 150 rpm até uma $DO_{610nm} = 0,3-0,4$. Recolheu-se 20 mL de células por centrifugação em tubos esterilizados durante 15 minutos a 3000 rpm, 4°C. Suspendeu-se suavemente as células em 8 mL de solução RF1 (ver abaixo), seguindo-se incubação em gelo durante 15 minutos. As células foram centrifugadas novamente durante 15 minutos a 3000 rpm, 4°C, foram suavemente suspensas em 2 mL de solução RF2 (ver abaixo) e foram incubadas mais uma vez em gelo durante 15 minutos. Finalmente, preparam-se alíquotas de 100 µL de suspensão de células e armazenaram-se a -80°C.

Solução RF1

Reagente	Quantidade por 100 mL	Concentração Final
CH ₃ CO ₂ K	296 mg	30 mM
CaCl ₂	112 mg	10 mM
MnCl ₂	632 mg	50 mM
Glicerol	15 mL	15%

Os reagentes foram adicionados pela ordem em que se encontram na tabela e o pH foi lentamente ajustado para 5,8 com ácido acético para evitar a precipitação. A solução foi esterilizada através de filtração.

Solução RF2

Reagente	Quantidade por 100 mL	Concentração Final
MOPS	200 mg	10 mM
CaCl ₂	840 mg	75 mM
Glicerol	15 mL	15%

O pH da solução foi lentamente ajustado para 6,8 a 7,0 para evitar a precipitação. A solução foi esterilizada através de filtração.

4) Meio Luria-Bertani (LB)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Triptona	10 g	1%
Extrato de Levedura	5 g	0,5%
NaCl	5 g	0,5%
Agar (para meio sólido)	20 g	2%

O meio foi esterilizado por autoclave durante 20 minutos a 120°C com uma pressão de 1 atm.

5) Meio Terrific Broth (TB)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Triptona	12 g	1,2%
Extrato de Levedura	24 g	2,4%
Glicerol	4 mL	4%
KH ₂ PO ₄	2,31 g	0,231%
K ₂ HPO ₄	12,54 g	1,254%
Glicilglicina	33 g	3,3%

O meio foi esterilizado por autoclave durante 20 minutos a 120°C com uma pressão de 1 atm.

6) Tampão A (Tampão de Ligação)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Hidrogenofosfato dissódio di-hidratado (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	1,78 g	10 mM
Di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	1,56 g	10 mM
NaCl	29,22 g	0,5 M
Imidazol	1,36 g	20 mM

Ajustou-se o pH da solução para 7,4 e esterilizou-se por filtração.

7) Tampão B (Tampão de Eluição)

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Hidrogenofosfato dissódio di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1,78 g	10 mM
Di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1,56 g	10 mM
NaCl	29,22 g	0,5 M
Imidazol	34 g	500 mM

Ajustou-se o pH da solução para 7,4 e esterilizou-se por filtração.

8) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE)

A preparação do gel de poliacrilamida iniciou-se com a montagem da cassete de vidro com 1 mm de espessura e o respetivo suporte. Em seguida, foi preparada a solução do gel *resolving* (abaixo), que foi vertido para o interior da cassete de vidro até atingir aproximadamente 1 cm abaixo do nível dos dentes do pente. Este gel foi coberto com isopropanol e aguardou-se que polimerizasse durante 30 minutos. Posteriormente, foi necessário retirar todo o isopropanol da superfície do gel *resolving* ao enxaguar com água, tendo sido também removidos os vestígios de água. Foi então preparada a solução do gel *stacking*, que foi vertido para o interior da cassete de vidro até preencher toda a cassete, foi inserido o pente e aguardou-se que o gel polimerizasse durante 30 minutos. Finalmente, o pente foi removido após a polimerização, foi montada a tina e foram aplicados as amostras com *loading buffer* (5x SDS-PAGE Sample Loading Buffer, NYZTech) e o marcador de pesos moleculares de proteínas (NZYTech) no gel. Finalmente, o gel foi corrido com o tampão de corrida 10x (abaixo) a 200 V durante aproximadamente 50 minutos.

Gel Resolving (12%)

Reagente	Quantidade	Concentração Final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%) (NZYTech)	1,125 mL	12%
H ₂ O	1,63 mL	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,937 mL	0,4 M
Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 10% (m/v)	37,5 µL	0,1%
Persulfato de amónio (APS) 10% (m/v)	37,5 µL	0,1%
TEMED	5µL	ND*

* Não determinada

Os reagentes foram adicionados pela ordem em que se encontram na tabela, o APS e o TEMED foram adicionados à mistura imediatamente antes de verter a mistura para a cassete de vidro, permitindo a polimerização.

Gel Stacking (4%)

Reagente	Quantidade	Concentração Final
Acrilamida/bis-Acrilamida, solução 29:1 (40%) (NZYTech)	0,119 mL	4 %
H ₂ O	0,806 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,313 mL	0,1 M
Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 10% (m/v)	12,5 µL	0,1%
Persulfato de amónio (APS) 10% (m/v)	12,5 µL	0,1%
TEMED	2,5 µL	ND*

* Não determinada

Os reagentes foram adicionados pela ordem em que se encontram na tabela, o APS e o TEMED foram adicionados à mistura imediatamente antes de verter a mistura para a cassete de vidro, permitindo a polimerização.

Tampão de Corrida 10x, pH 8,3

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Tris base	30,3 g	250 mM
Glicina	144g	1,92 M
SDS	10 g	1%

Solução de Coloração

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Coomassie R-250	1 g	0,1%
Ácido acético glacial	100 mL	10% (v)
Metanol	400 mL	40% (v)

Adicionou-se o ácido acético glacial a 500 mL de água ultrapura. Em seguida, adicionaram-se o metanol e o corante Coomassie e a mistura foi agitada para se tornar homogênea. Por fim, a mistura foi filtrada para eliminação de partículas.

Solução de Descoloração

Reagente	Quantidade por Litro	Concentração Final
Metanol	250 mL	25% (v)
Ácido acético glacial	75 mL	7,5% (v)

Primeiro, foram adicionados ácido acético glacial a 675 mL de água ultrapura e só depois foi adicionado o metanol à mistura.

9) Solução Ácido-Sulfúrico- α -Naftol

Reagente	Quantidade
Solução α -naftol a 15% em Etanol	10,5 mL
Ácido sulfúrico concentrado	6,5 mL
Etanol	40,5 mL
H ₂ O	4 mL

Adicionaram-se os reagentes por esta ordem, enquanto se arrefecia no gelo.