

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Priscila Silva Grijó Farani**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATP DIFOSFOHIDROLASE DE *Solanum tuberosum* COMO  
FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NO ESTUDO DE NTPDases**

**Juiz de Fora  
2016**

**Priscila Silva Grijó Farani**

**CARACTERIZAÇÃO DA ATP DIFOSFOHIDROLASE DE *Solanum tuberosum* COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA NO ESTUDO DE NTPDases**

Dissertação de mestrado submetida à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – ênfase em Produtos Naturais Bioativos – da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila de Faria Pinto

**Juiz de Fora**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva Grijó Farani, Priscila .

Caracterização da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* como ferramenta biotecnológica no estudo de NTPDases / Priscila Silva Grijó Farani. -- 2016.

98 f.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. Apirase de batata. 2. Homologia. 3. Sinalização purinérgica. 4. Inibição de NTPDases. 5. Screening de substâncias. I. de Faria Pinto, Priscila , orient. II. Título.

Priscila Silva Grijó Farani

Caracterização da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* como ferramenta  
biotecnológica no estudo de NTPDases

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Apresentado em 18 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



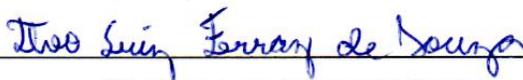
---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Priscila de Faria Pinto – Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Dr. Theo Luiz Ferraz de Souza  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à orientadora Priscila pela motivação constante, amizade, conselhos e por acreditar em nosso potencial. À Dra. Eveline Gomes Vasconcelos, pelo apoio e ensinamentos.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Estrutura e Função de proteínas.

Ao Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN/UFJF) e ao Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN/USP) por ceder as substâncias e frações que tornaram esse trabalho possível.

Ao Dr. Reinaldo Barros Geraldo que me auxiliou com os estudos de homologia e montagem da árvore filogenética.

Ao estagiário de iniciação científica Lucas Araújo por me ajudar a realizar todos os ensaios de inibição enzimática realizados neste trabalho.

Aos meus pais, Gilson e Laila, pelo apoio e carinho que me motivam todos os dias a alcançar vãos maiores, e pelas lições de vida que me ajudam a amadurecer e me preparam para as batalhas constantes da vida.

Ao meu namorado Paulo, pelo amor, apoio incondicional e companheirismo. À Frida, por encher diariamente nossas vidas de alegria e me ensinar a cada dia que o amor realmente ocorre de todas as formas.

Aos meus amigos, a família que eu escolhi, por estarem sempre presentes e servirem sempre como um apoio nos momentos difíceis.

Ao CNPq, Capes e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>AAATs</b>	Ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos
<b>ACR</b>	Apyrase Conserved Regions (Regiões conservadas de apirase)
<b>ADP</b>	Adenosine triphosphate (difosfato de adenosina)
<b>AP</b>	Alkaline Phosphatase (fosfatase alcalina)
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina)
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulose
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOC</b>	Deoxicolato de sódio
<b>E-5'NT</b>	5'ecto-nucleotidases
<b>EC</b>	Enzyme Commission number
<b>ECA II</b>	Enzima conversora de angiotensina II
<b>E-NPP</b>	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiasterase
<b>IgG</b>	Imunoglobulina classe G
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KDa</b>	KiloDalton
<b>M</b>	Molar
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normal
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>NTPDases</b>	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
<b>P2X</b>	Receptor ionotrópico do tipo P2
<b>P2Y</b>	Receptor metabotrópico do tipo P2
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline (tampão fosfato salino)

<b>POM-1</b>	Polioxotungstato
<b>POMs</b>	Polioximetálatos
<b>PPADS</b>	Fosfato piridoxal-6-azofenil-2',4'-ácido dissulfônico
<b>RB-2</b>	Reactive Blue 2 (azul reativo 2)
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato de sódio)
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de hidrólise do ATP com participação das diferentes ectonucleotidasas.....	16
<b>Figura 2.</b> Árvore filogenética de NTPDases pertencentes a diferentes organismos.....	20
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas dos inibidores de ecto-nucleotidasas derivados de nucleotídeos.....	28
<b>Figura 4.</b> Estruturas químicas dos inibidores de ecto-nucleotidasas não-derivados de nucleotídeos.....	29
<b>Figura 5.</b> Estrutura dos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos.....	31
<b>Figura 6.</b> Estruturas químicas da ticlopidina e clopidogrel.....	32
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas da taspigargina e do cardamonina.....	33
<b>Figura 8.</b> Esquema do processo de purificação da apirase de <i>Solanum tuberosum</i> .....	36
<b>Figura 9.</b> Gráfico do conteúdo proteico e da atividade ATPásica referentes às frações obtidas da coluna Sephadex G-25.....	49
<b>Figura 10.</b> Gráfico do conteúdo proteico e da atividade ATPásica referentes às frações obtidas da coluna Sephadex G-100.....	49
<b>Figura 11.</b> Gráfico do conteúdo proteico e da atividade ATPásica referentes às frações obtidas da coluna de troca iônica Carboximetilcelulose (CMC).....	49
<b>Figura 12.</b> Avaliação do conteúdo proteico obtido após purificação da apirase de batata por SDS-PAGE .....	50
<b>Figura 13.</b> Identificação da apirase de batata pela técnica de <i>Western Blotting</i> .....	51
<b>Figura 14.</b> Localização dos peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas na sequência FASTA da apirase de <i>Solanum tuberosum</i> (Número de acesso: P80595) .....	52

<b>Figura 15.</b> Atividade fosfohidrolítica da apirase de batata em gel não desnaturante.....	51
<b>Figura 16.</b> Curva de padronização da quantidade de substrato ideal para os ensaios de inibição enzimática.....	54
<b>Figura 17.</b> Avaliação da influência do tempo de incubação das substâncias Cu(isapn) 1 $\mu$ M e A45 25 $\mu$ M na atividade fosfohidrolítica.....	55
<b>Figura 18.</b> Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de <i>Solanum tuberosum</i> promovida pelas substâncias A47, A33, A2 e A50.....	59
<b>Figura 19.</b> Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de <i>Solanum tuberosum</i> promovida pelas substâncias A2, A50, A49, A19, A37 e A41.....	61
<b>Figura 20.</b> Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de <i>Solanum tuberosum</i> promovida pelas substâncias A22, A42, A39 e A30.....	63
<b>Figura 21.</b> Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de <i>Solanum tuberosum</i> pelos compostos Aceturato de diminazeno, Cu(isapn) e da Ticlopidina	65
<b>Figura 22.</b> Estrutura química do aceturato de diminazeno.....	71
<b>Figura 23.</b> estrutura química do complexo de cobre(II) com a isatin-imina.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Substâncias testadas no <i>screening</i> separadas por grupos.....	42
<b>Tabela 2.</b> Resultado final do processo de <i>screening</i> de substâncias e frações sobre a apirase de <i>Solanum tuberosum</i> separadas por grupos.....	56

## RESUMO

As ectonucleotidases compreendem um grupo de famílias de enzimas que participam da hidrólise extracelular de nucleotídeos, podendo estar localizadas na superfície celular, solúveis no meio intersticial ou nos fluidos corporais. As NTPDases (EC 3.6.1.5) são enzimas pertencentes a uma família de proteínas amplamente distribuída nos organismos e que têm como característica em comum a habilidade de hidrolisar nucleotídeos di- e trifosfatados (ADP e ATP), na presença de concentrações milimolares de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . A apirase de batata (*Solanum tuberosum*) foi a primeira enzima da família das ectonucleotidases a ser purificada e sua isoforma solúvel é pode ser obtida em elevado grau de rendimento e pureza utilizando métodos convencionais de purificação e assegurando alta reprodutibilidade em ensaios farmacológicos e imunológicos. As NTPDases estão envolvidas em vários processos fisiopatológicos como em respostas imunes, na inflamação, na coagulação, na formação de tumores, em distúrbios do sistema nervoso e na virulência de microrganismos. Dessa forma, a busca de inibidores específicos para as NTPDases possui grande interesse científico, uma vez que nenhum inibidor potente e específico para uma isoforma ainda foi encontrado. Assim, o objetivo deste trabalho foi purificar a apirase de *S. tuberosum*, realizar a caracterização dessa proteína e sua aplicação como ferramenta biotecnológica no estudo das NTPDases através da triagem *in vitro* de substâncias e frações com potencial inibitório sobre sua atividade. No processo de purificação foi possível avaliar o sucesso da técnica através da identificação da apirase de batata por *western blotting* e espectrometria de massas. A atividade fosfohidrolítica da proteína foi preservada durante a purificação e verificada através de depósitos de fosfato de cálcio em altura simulares para os substratos ATP e ADP em gel não-desnaturante. Os testes de inibição da atividade *in vitro* revelaram 8 substâncias isoladas (A6, A7, A8, A45, A47, A33, Cu(isapn) e Aceturado de diminazeno) e 10 frações derivadas de extratos de diferentes espécies vegetais (A2, A50, A49, A19, A37, A41, A22, A42, A39 e A30) com potencial inibitório promissor sobre a atividade ATPásica da apirase de batata. As análises *in silico* através de *docking* molecular realizado com as substâncias isoladas revelou que todas elas possuem espontaneidade de ligação com o sítio catalítico da enzima, reiterando seu potencial de inibição. Estes resultados revelaram substâncias com potencial inibitório promissor sobre a enzima, sinalizando uma aplicação dessas substâncias no tratamento de diversas condições fisiopatológicas relacionadas com a exacerbação da sinalização purinérgica no organismo.

**Palavras-chave:** Apirase de batata, sinalização purinérgica, inibição de NTPDases, *screening* de substâncias.

## ABSTRACT

Ectonucleotidases comprise a group of enzyme's families, which participate in the hydrolysis of extracellular nucleotides and may be located on the cell surface, soluble in the extracellular medium or in the interstitial fluids. The NTPDases (EC 3.6.1.5) are enzymes belonging to a protein family widely distributed among organisms and that have as common feature the ability to hydrolyse di- and triphosphate nucleotides (ADP and ATP) in the presence of millimolar concentrations of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$ . Potato apyrase was the first enzyme of the ectonucleotidase family to be purified and its soluble isoform is easily obtained in a high level of yield and purity through conventional purification methods, ensuring high reproducibility in pharmacological and immunological assays. NTPDases are involved in several pathophysiological processes such as immune and inflammatory responses, clotting, tumor formation, neuronal disorders and virulence of microorganisms. Thus, the search for ATP diphosphohydrolases inhibitors has great scientific relevance, since no potent and specific inhibitor for an isoform has been found so far. The aim of this work was to obtain pure *Solanum tuberosum* apyrase from purification, perform *in silico* studies to characterize this protein as a biotechnological tool in the study of NTPDases and perform an *in vitro* screening for compounds and fractions with inhibitory potential against *Solanum tuberosum* ATP diphosphohydrolase. In the purification process it was possible to evaluate the technique efficiency through identification of potato apyrase by western blotting and mass spectrometry. The protein phosphohydrolytical activity was preserved and verified by calcium phosphate deposit in the same height for ATP and ADP in a non-denaturing gel. The *in vitro* inhibition evaluation revealed 8 isolated substances (A6, A7, A8, A45, A47, A33, Cu(isapn) e aceturado de diminazeno) and 10 fractions from extracts derived of different plant species (A2, A50, A49, A19, A37, A41, A22, A42, A39 e A30) with promising inhibitory potential against the ATPase activity of potato apyrase. *In silico* analysis through molecular docking of the isolated substances revealed that all of them have binding spontaneity with the catalytic site of the enzyme, reassuring its inhibitory potential. These results revealed isolated compounds and fractions with promising inhibitory potential on *Solanum tuberosum* apyrase, reiterating the application of these substances in the treatment of various pathophysiological conditions related to the exacerbation of purinergic signaling. However, further studies are needed to corroborate this hypothesis.

**Key words:** Potato apyrase, purinergic signaling, NTPDase inhibition, substance screening.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASES, UMA FAMÍLIA DE ENZIMAS PERTENCENTE AO GRUPO DAS ECTONUCLEOTIDASES .....	15
1.1.1 Apirase de <i>Solanum tuberosum</i> .....	18
1.2 DISTÚRBIOS RELACIONADOS COM AS E-NTPDases .....	21
1.3 INIBIDORES DE ECTONUCLEOTIDASES .....	26
1.3.1 Inibidores de ecto-nucleotidases derivados de nucleotídeos .....	26
1.3.2 Inibidores de E-NTPDases não derivados de nucleotídeos .....	28
1.3.3 Inibidores utilizados como fármacos.....	31
1.3.4 Inibidores derivados de plantas.....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE BATATA <i>Solanum tuberosum</i> .....	36
3.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE E VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA .....	38
3.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA GRADIENTE 8-16% E <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	39
3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	40
3.4.1 Análise de dados.....	41
3.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA APIRASE DE BATATA .....	41

3.5.1 Grupos de substâncias e frações testadas .....	41
3.5.2 Ensaio de inibição enzimática .....	46
3.5.3 Cálculo da inibição .....	47
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1 GRÁFICOS DE CONTEÚDO PROTEICO E ATIVIDADE ADPÁSICA DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE <i>Solanum tuberosum</i> .....	48
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase DE <i>Solanum tuberosum</i> POR SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING UTILIZANDO SOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM APIRASE DE BATATA.....	50
4.3 ELETROFORESE EM GEL NÃO-DESNATURANTE E VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DA PROTEÍNA PURIFICADA.....	52
4.4 TESTES DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DA APIRASE DE <i>Solanum tuberosum</i> UTILIZANDO FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS PROVENIENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS .....	54
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 NUCLEOSÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASES, UMA FAMÍLIA DE ENZIMAS PERTENCENTE AO GRUPO DAS ECTONUCLEOTIDASES

As ectonucleotidasas compreendem um grupo de famílias de enzimas que participam da hidrólise extracelular de nucleotídeos, podendo estar localizadas na superfície celular, solúveis no meio intersticial ou nos fluidos corporais (ZIMMERMANN, 2001). Atualmente, quatro famílias de enzimas constituem o grupo das ectonucleotidasas: (i) nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), (ii) ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiasterases (E-NPPs), (iii) fosfatases alcalinas (APs) e (iv) 5' ecto-nucleotidasas (E-5'NT), possuindo ampla distribuição tecidual (ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER, 2012).

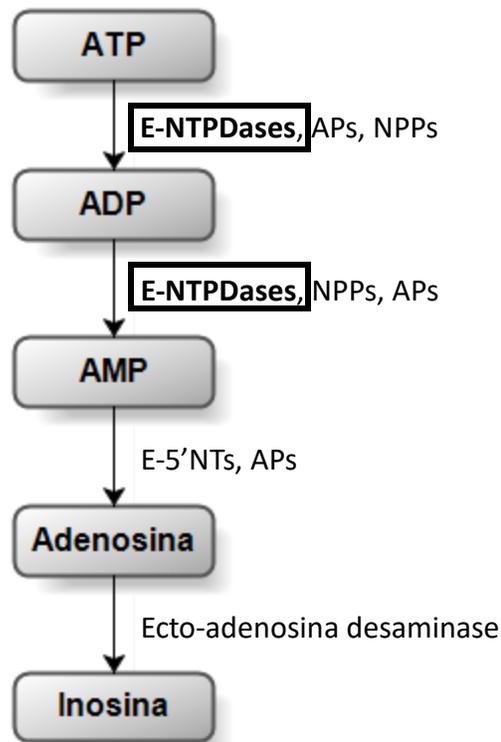
As NTPDases (EC 3.6.1.5) são enzimas pertencentes a uma família de proteínas amplamente distribuída nos organismos e que têm como característica em comum a habilidade de hidrolisar nucleotídeos di- e trifosfatados (ADP e ATP), juntamente com outras enzimas do mesmo grupo, na presença de concentrações milimolares de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e, cujo produto final da hidrólise são os nucleosídeos monofosfatados (Figura 1) (ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER, 2012). Essa família se diferencia das outras difosfohidrolases, pois possui elevada atividade, amplo espectro de substrato, exigência de cátion bivalente e é insensível aos inibidores clássicos de outras ATPases do tipo  $\text{V}^1$ ,  $\text{F}^2$  e  $\text{P}^3$ . Podem ser denominadas NTPDases em mamíferos, NTPases, ATPDases e NDPases em parasitos e apirases em plantas (HANDA & GUIDOTTI, 1996; KNOWLES, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

---

<sup>1</sup> Bomba de próton vesicular ou vacuolar, geralmente associada a lisossomos em mamíferos, responsável pela rotatividade de ATP (ALEXANDER *et al.*, 2015).

<sup>2</sup> Conhecida como ATP sintase, é um complexo associado à membrana mitocondrial que utiliza o transporte de  $\text{H}^+$  através da membrana para realizar a síntese de ATP (ALEXANDER *et al.*, 2015).

<sup>3</sup> Consiste em uma família de transportadores de íons que utilizam a energia livre proveniente da hidrólise de ATP para construir gradientes eletroquímicos através das membranas (APELL, 2004).



**Figura 1.** Esquema de hidrólise do ATP com participação das diferentes ectonucleotidasas. **E-NTPDases:** nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases; **APs:** fosfatase alcalina; **NPPs:** ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiasterases; **E-5'NTs:** 5' ecto-nucleotidasas.

Diferentes isoformas de NTPDases foram localizadas e caracterizadas em uma variada gama de organismos, o alinhamento das sequências de algumas isoformas permitiu a identificação de cinco regiões conservadas (ACRs). Estas regiões, ACRs, são regiões que contêm resíduos de aminoácidos essenciais para o funcionamento dessas enzimas, evidenciando a importância destas na manutenção dos níveis de nucleotídeos extracelulares e na sinalização purinérgica (FARIA-PINTO *et al.*, 2004; FARIA-PINTO *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 1996).

Em plantas, os genes das apirases já foram clonadas de ervilhas (*Pisum sativum*), batata (*Solanum tuberosum*), vagem (*Dolichos biflorus*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), soja (*Glycine soja*) e algodão (*Gossypium hirsutum*). As NTPDases nesses organismos estão envolvidas principalmente com o processo de crescimento, uma vez que o silenciamento destes genes da apirase promoveu retardo geral e alterações da

morfologia do tubérculo de *S. tuberosum*. A literatura também relata o envolvimento destas enzimas no processo de nodulação de *D. biflorus* por rizóbios (KNOWLES, 2011).

Em parasitos, a identificação e descrição das NTPDases abrange um número significativo de organismos, incluindo um vasto número de organismos patogênicos. A maior parte destas descrições é realizada por inferência a partir de estudos genômicos. Isoformas de NTPDases já foram caracterizadas e bastante exploradas em protozoários, tais como *Toxoplasma gondii* (BERMUDES *et al.*, 1994), *Trypanosoma cruzi* (FIETTO *et al.*, 2004), *Leishmania amazonensis* (COIMBRA *et al.*, 2002), *Leishmania chagasi* e *Leishmania brasiliensis* (REZENDE-SOARES *et al.*, 2010). No helminto *Schistosoma mansoni*, existem duas isoformas descritas, a SmATPDase 1 e a SmATPDase 2, com massa molecular de aproximadamente 63 kDa, identificadas no tegumento do verme adulto (VASCONCELOS *et al.*, 1993; VASCONCELOS *et al.*, 1996) e em ovos do parasito (FARIA-PINTO *et al.*, 2004). Uma das hipóteses a respeito da função das NTPDases nestes organismos está relacionada a hidrólise do ATP e ADP, as quais são necessárias para a manutenção da virulência e dos mecanismos de escape do sistema imunológico do hospedeiro (KNOWLES, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Nos mamíferos, as NTPDases estão envolvidas nos processos de sinalização purinérgica, atuando em diversos processos fisiológicos como tromborregulação e nas respostas inflamatórias e imunológicas (KNOWLES, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 1996). Oito isoformas foram descritas em mamíferos, destas, quatro delas (NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8) estão localizadas na superfície celular e as demais (NTPDase4-7) encontram-se localizadas no meio intracelular, sendo que as NTPDases 5 e 6 também apresentam formas secretadas (ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER, 2012).

A mais extensivamente estudada delas é a NTPDase1, também denominada CD39, que já foi caracterizada como um marcador de ativação de linfócitos, expresso também em células *natural killer*, monócitos, células dendríticas, e com expressão diferenciada nos subtipos de células T ativadas, demonstrando seu amplo papel na resposta imune celular (ROBSON, SEVIGNY & ZIMMERMANN, 2006). A capacidade de hidrolisar o ADP, molécula pró-agregante, retrata a importância da presença desta isoforma na superfície celular, que está relacionada à manutenção da fluidez sanguínea,

atuando como modulador da inflamação vascular e em eventos de trombose. A isoforma NTPDase 1 também se relaciona com o metabolismo nucleotídico na superfície das células musculares lisas dos vasos sanguíneos, contribuindo para regulação local do tônus muscular (LECKA *et al.*, 2014; ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER, 2012). Além destas funções, as NTPDases 1 participam de respostas metabólicas mais prolongadas, como proliferação celular, diferenciação e apoptose, como aquelas envolvidas na aterosclerose, doenças neurológicas degenerativas e algumas condições inflamatórias (ROBSON, SEVIGNY & ZIMMERMANN, 2006).

### **1.1.1 Apirase de *Solanum tuberosum***

A apirase de batata (*Solanum tuberosum*) foi a primeira proteína da família das NTPDases a ser purificada (TRAVERSO-CORI, A., CHAIMOVICH & CORI, 1965) e posteriormente a ter seu gene clonado (HANDA & GUIDOTTI, 1996). O sequenciamento de aminoácidos da região N-terminal (VASCONCELOS *et al.*, 1996) permitiu a primeira descrição dessa família de proteínas (VASCONCELOS *et al.*, 2009). A clonagem do gene da apirase de batata e o alinhamento de sua sequência primária permitiu a visualização das cinco regiões conservadas de apirase (ACRs) e mostrou a homologia dessa enzima com outras proteínas similares de protozoários, plantas, leveduras e a CD39 humana (KNOWLES, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 1996).

As isoformas de apirase de batata são solúveis e facilmente recuperadas com elevado grau de rendimento e pureza empregando-se apenas métodos convencionais de purificação. A pureza das isoformas obtidas assegura uma elevada reprodutibilidade em ensaios farmacológicos e imunológicos (TRAVERSO-CORI, A., CHAIMOVICH & CORI, 1965; VASCONCELOS *et al.*, 2009). Comercializada pela empresa Sigma, esta enzima é amplamente utilizada em experimentos que exigem eliminação rápida dos níveis de ATP (KNOWLES, 2011).

As isoformas de apirase, isoladas a partir de *S. tuberosum*, podem variar em massa molecular, ponto isoelétrico e razão de atividade ATPase/ADPase de acordo com a variedade vegetal utilizada (KETTLUN, A. M. *et al.*, 1982; KETTLUN, ANA MARÍA *et*

*al.*, 1992), podendo ser observadas variações, também, conforme suas propriedades catalíticas, solubilidade, localização subcelular e função biológica.

A apirase de *S. tuberosum* apresenta propriedades imunoestimulatórias (FARIA-PINTO *et al.*, 2010a, 2010b; FARIA-PINTO *et al.*, 2008) quando utilizadas para o desenvolvimento de anticorpos policlonais produzidos em camundongos e coelhos. Os soros imune obtidos mostraram forte imunorreatividade cruzada com isoformas de ATP difosfohidrolases de parasitos como *S. mansoni*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* sugerindo que essas proteínas compartilham epítomos (COIMBRA *et al.*, 2008; FARIA-PINTO *et al.*, 2004; MAIA *et al.*, 2011; REZENDE-SOARES *et al.*, 2010). Curiosamente, estes mesmos anticorpos falharam em reconhecer NTPDases de mamíferos e induzir a produção de auto-anticorpos, reiterando a importância da aplicação da apirase de batata como ferramenta no estudo do papel das NTPDases em doenças parasitárias (FARIA-PINTO *et al.*, 2006).

Em 2008, foi relatada a existência dessa imunorreatividade cruzada para mais de uma parasitose o que abriu caminho para análise *in silico* da relação estrutural entre essas enzimas e outros membros da família das NTPDases (FARIA-PINTO *et al.*, 2008). O alinhamento de 32 membros da família das ATP difosfohidrolases disponíveis no banco até aquele momento incluiu sequências de proteínas pertencentes a mamíferos, helmintos, protozoários, mosquitos e plantas, revelando a existência de duas vias evolucionárias principais provavelmente devido à uma divergência de ancestrais (FARIA-PINTO *et al.*, 2008). Mais tarde, Nunes e colaboradores (2015), demonstrou a estreita relação filogenética entre as NTPDases de mamíferos e parasitos, que se encontram separados em dois clados bem definidos (Figura 2) (NUNES *et al.*, 2015).

Os dados obtidos em 2008 para construção da árvore filogenética eram limitados e, desde então, novos genes têm sido sequenciados e adicionados aos bancos de dados disponíveis. Além disso, o enfoque na relação entre a apirase de *S. tuberosum* e as isoformas existentes de *H. sapiens* ainda não havia sido explorado.

Atualmente, existem 8 isoformas descritas de *H. sapiens* (ROBSON, SEVIGNY & ZIMMERMANN, 2006) e, um dos propósitos deste trabalho é analisar, através do alinhamento da sequência primária e construção da árvore filogenética, a proximidade evolutiva entre as ecto-NTPDases destes dois organismos, com o intuito de auxiliar na



plaquetária e processos inflamatórios através da ativação de receptores purinérgicos específicos (VASCONCELOS *et al.*, 2009). Além disso, a alta homologia existente entre as NTPDases de diferentes espécies e a presença das cinco regiões conservadas da apirase permite explorar as análises *in silico* com o intuito de caracterizar novas regiões que possam servir como alvos farmacológicos para essas proteínas, vista a sua importância e utilidade já elucidada para parasitos e também para o estabelecimento de diversos processos patológicos em humanos.

## 1.2 DISTÚRBIOS RELACIONADOS COM AS E-NTPDases

Os níveis intracelulares de ATP variam de 3 a 10 mM, enquanto que no meio extracelular, essa quantidade encontra-se muito menor, em torno de 10 nM. Essa baixa concentração de ATP no meio extracelular é mantida devido a presença das ectonucleotidases, responsáveis pela hidrólise do ATP em ADP e, subsequentemente do ADP em AMP, a formação da adenosina como produto final ocorre pela ação da 5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2000;2001; ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER, 2012). Essa diferença de concentração promove a formação de um potencial de efluxo de ATP, de forma que a liberação desse ATP intracelular pode promover uma elevação considerável dos níveis extracelulares, afetando todo o balanço do processo de sinalização purinérgica (FENG *et al.*, 2011; ZIMMERMANN, 2000).

Todos os tipos celulares tendem a liberar nucleotídeos extracelulares de forma inata ou como uma resposta fisiológica ou patológica a algum dano ou estresse. Essas moléculas sinalizadoras participam de mecanismos de sinalização celular muito sofisticados, e são essenciais para uma comunicação intercelular efetiva (AL-RASHIDA & IQBAL, 2014). Os nucleotídeos liberados pelas células podem agir sobre os receptores purinérgico do tipo P1 ou P2. Os receptores do tipo P1 são acoplados à proteína G e sofrem ativação apenas pela ligação de adenosina, sendo divididos nos subtipos A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Os receptores P2 são ativados por nucleotídeos e dividem-se em P2X, que são ionotrópicos e possuem sete subtipos (P2X1 a P2X7), ou P2Y, que também são acoplados à proteína G e possuem oito subtipos (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) (AL-RASHIDA & IQBAL, 2014; ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER,

2012). Baseado em diferenças referentes à localização celular e à especificidade de substrato, existem oito NTPDases elucidadas até o momento: NTPDase1 (CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3), NTPDase4, NTPDase5 (CD39L4), NTPDase6 (CD39L2), NTPDase7 e NTPDase8 (AL-RASHIDA & IQBAL, 2014; ZIMMERMANN, 2001).

As ecto-nucleotidases são importantes na regulação de respostas imunológicas e inflamatórias, principalmente devido ao potencial pró-inflamatório e pró-trombótico do ATP e ADP, e, portanto, doenças como aterosclerose e trombofilia têm sido estudadas e avaliadas quanto à elevação da expressão ou atividade dessas enzimas (ATKINSON *et al.*, 2006). A NTPDase1 de mamíferos, também chamada de CD39 foi primeiramente identificada em linfócitos B (MALISZEWSKI *et al.*, 1994), mas também é expressa em células *natural killer*, monócitos, células dendríticas e células T ativadas. Já foi mostrada sua participação em processos como maturação de afinidade de respostas de anticorpos, tráfego leucocitário, recrutamento, ativação e polarização de células T *naive*, resposta inflamatória amplificada sob estímulos químicos e comunicação intercelular (DWYER *et al.*, 2007).

Jaques e colaboradores avaliaram 30 pacientes diagnosticados com artrite reumatoide e constataram elevada atividade da NTPDase nos linfócitos destes pacientes, o que contribui para a diminuição dos níveis de ATP e elevação dos níveis de adenosina no plasma sanguíneo (DOS SANTOS JAQUES *et al.*, 2013). A artrite reumatoide, por sua vez, apresenta íntima relação com doenças cardiovasculares como a aterosclerose, uma vez que a reação inflamatória exacerbada característica da doença contribui para ativação e recrutamento plaquetário, promovendo a formação de trombos (BECKER *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados na esclerose múltipla, em que linfócitos de pacientes acometidos pela doença apresentaram aumento da hidrólise de ATP e ADP, indicando atividade elevada destas enzimas ou sua maior expressão (SPANVELLO *et al.*, 2010).

O nucleotídeo ADP é um grande ativador da agregação plaquetária, o que denota sua importância na manutenção da fisiologia e consolidação de doenças. Camundongos *knock-out* para CD39 exibiram grandes perturbações na cascata de sinalização purinérgica nos vasos sanguíneos, promovendo defeitos na ativação plaquetária, tempo

de sangramento prolongado, permeabilidade vascular prolongada e trombofilia com altos níveis de deposição de fibrina nos tecidos e ativação de células endoteliais aberrantes (ATKINSON *et al.*, 2006). Plaquetas de pacientes com altos níveis de colesterol, diabéticos ou hipertensivos foram avaliadas quanto à hidrólise de ATP e ADP, e uma alta atividade hidrolítica detectada, possivelmente relacionada a uma resposta compensatória ao estado inflamatório e pró-oxidativo associado com a hipercolesterolemia (SCHETINGER *et al.*, 2007).

Hidrólise elevada de ATP e ADP também foi encontrado na superfície de plaquetas de pacientes com infarto agudo do miocárdio (BAGATINI *et al.*, 2008). Expressão e atividade alteradas da CD39 também foram encontradas em micropartículas (vesículas fosfolipídicas formadas a partir de membranas de plaquetas e células endoteliais) de pacientes com hipertensão arterial pulmonar idiopática, doença caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar, proliferação de células endoteliais, infiltrados inflamatórios perivasculares, e trombose *in situ* (VISOVATTI *et al.*, 2012). Além disso, hidrólise elevada de ATP foram encontradas em pacientes com falência renal crônica submetidos à tratamento com hemodiálise ou não, e diminuição na hidrólise de ADP nestes mesmos pacientes (SCHETINGER *et al.*, 2007).

No sistema nervoso central, o ATP extracelular já foi elucidado como importante molécula sinalizadora, atuando como neurotransmissor, modulador da excitabilidade neuronal e fator de crescimento, sendo liberada juntamente com a acetilcolina (ZHANG *et al.*, 2000), noradrenalina (BOBALOVA & MUTAFOVA-YAMBOLIEVA, 2001) ou GABA (JO & SCHLICHTER, 1999). O ATP é liberado de células em processo de apoptose, podendo exercer efeitos prejudiciais sobre os neurônios e modulando processos inflamatórios mediados pelas células microgliais, com o intuito de estabelecer uma condição patológica ou proteger a integridade do sistema nervoso central (VOLONTE *et al.*, 2003).

A existência da via de sinalização purinérgica presente no SNC promove um balanço entre os níveis de ATP e adenosina, o que pode estar envolvido com a progressão de diversos distúrbios neurológicos (BONAN, 2012; ROSZEK & CZARNECKA, 2015). As principais isoformas de NTPDases expressas no tecido cerebral são as NTPDase1, NTPDase2 e NTPDase3 e, já foi demonstrado que alguns eventos

como convulsões, epilepsia, alterações hormonais, estresse e resposta nociceptiva podem promover alterações em suas atividades (BONAN, 2012).

Na avaliação de crises epiléticas após indução de diferentes modelos de epilepsia, Bonan e colaboradores (2000) observaram um aumento na hidrólise de ATP e ADP em sinaptossomas hipocampais de ratos adultos (BONAN *et al.*, 2000). Em outro estudo avaliando o prejuízo cognitivo provocado por convulsões epiléticas, foi possível observar aumento da hidrólise de ATP nos sinaptossomas hipocampais de ratos adultos, provocando dificuldade de memória e aprendizado após episódio convulsivo no período pós-natal (COGNATO *et al.*, 2011). Também já foi mostrado o envolvimento das NTPDases em doenças neurodegenerativas, em que observou-se alterações na taxa de hidrólise de nucleotídeos extracelulares em fatias do estriado em modelo experimental de doença de Parkinson induzida pela 6-hidroxidopamina após quatro semanas (OSES *et al.*, 2011). Estes achados reiteram a importância da sinalização purinérgica no sistema nervoso central, apresentando um campo promissor para a investigação de novos alvos terapêuticos.

O papel mais elucidado das NTPDases relativo à doenças, no entanto, parece estar relacionado ao câncer. Células cancerígenas possuem metabolismo único, favorecendo sua rápida proliferação celular. Células não proliferativas utilizam os produtos da glicólise e oxidação do piruvato para geração de ATP no intuito de suprir a demanda energética celular, já as células em divisão utilizam intermediários da glicólise para síntese de macromoléculas, sendo necessário manter o equilíbrio entre a síntese de ATP e as necessidades biossintéticas celulares. Dessa forma, o metabolismo da glicose por este processo de glicólise aeróbica, também chamado de “efeito Warburg”, pode atuar ajudando células em divisão a alcançar esse balanço (ISRAELSEN & VANDER HEIDEN, 2010). Além disso, estudos indicam que o ATP é capaz de permeabilizar a membrana celular e induzir a morte celular programada em diversos modelos tumorais *in vitro*, sugerindo que a indução da apoptose promovida pelo ATP é um mecanismo que merece ser investigado (BUFFON *et al.*, 2007).

Fang e colaboradores (2010), mostraram que a NTPDase5 é uma proteína crucial na via PI3K/PTEN que promove o crescimento e sobrevivência celular e que está usualmente ativada em células cancerígenas, relatando a importância da NTPDase5

como potencial alvo terapêutico no câncer, uma vez que a enzima atua diminuindo o consumo de ATP pelas células tumorais (FANG *et al.*, 2010). Estudo realizado com linhagens celulares humanas de câncer cervical, avaliou o perfil de expressão das ectonucleotidases e quantificou suas respectivas atividades. A enzima que apresentou o maior perfil de expressão nas células tumorais foi a NTPDase5 (BECKENKAMP *et al.*, 2014).

A deleção do gene para CD39 (NTPDase1), principal ectonucleotidase expressa pelas células endoteliais e células T regulatórias, foi capaz de impedir a angiogênese, causando redução do crescimento de tumores implantados e inibindo metástases pulmonares (JACKSON *et al.*, 2007). Isso ocorreu devido à supressão da hidrólise do ATP, molécula sinalizadora liberada pelas células tumorais necróticas, que auxilia na resposta imune necessária para uma terapia anticancerígena bem-sucedida, além de inibir diretamente a proliferação celular e promover morte das células tumorais (FENG *et al.*, 2011). Com a confirmação que a CD39 expressa em células endoteliais promove crescimento de células tumorais por diminuir a concentração de ATP do microambiente tumoral (FENG *et al.*, 2011), fica evidente a necessidade de se modular a expressão e/ou a atividade enzimática dessas enzimas. Assim sendo, a CD39 já é considerada um alvo terapêutico promissor na área oncológica (BASTID *et al.*, 2013; YOUNG *et al.*, 2014).

As NTPDases de outros organismos também apresentam grande relevância, uma vez que estão envolvidos com a relação parasito-hospedeiro. A inibição da NTPDase presente na superfície de *T. cruzi* diminui a adesão e a invasão do parasito aos macrófagos, destacando a importância da sinalização purinérgica no processo de infecção da doença de Chagas (BISAGGIO *et al.*, 2003). A NTPDase de *Legionella pneumophila*, importante patógeno causador de pneumonia, similar à CD39, foi recentemente elucidada como enzima essencial para a replicação intracelular, relacionada com a virulência da bactéria (SANSOM *et al.*, 2007; SANSOM *et al.*, 2008) e denotando sua importância como alvo terapêutico. No *Schistosoma mansoni*, as NTPDases (SmATPDase1 e SmATPDase2) parecem estar envolvidas no mecanismo de escape imunológico, prevenindo que a produção de ATP causada pelo dano tecidual seja capaz de ativar a resposta inflamatória e a formação de trombos, promovendo a sobrevivência do parasito (BHARDWAJ & SKELLY, 2009).

Existem diversas doenças em que o envolvimento das NTPDases de humanos e de outros organismos tem sido estudadas, ficando evidente a necessidade de se modular a expressão e/ou a atividade enzimática dessas enzimas em diversos distúrbios. Um exemplo disto é a participação da CD39 e da NTPDase5 com células tumorais, tornando estas enzimas alvos terapêuticos promissores na área oncológica (BASTID *et al.*, 2013; YOUNG *et al.*, 2014).

### **1.3 INIBIDORES DE ECTONUCLEOTIDASES**

Uma vez que os nucleotídeos extracelulares, como o ATP e o ADP, sofrem inativação efetiva por enzimas de superfície que hidrolisam sequencialmente seus grupos fosfato, um inibidor seletivo para uma enzima específica irá funcionar como equivalente a um agonista ou antagonista de um receptor purinérgico específico (BAQI, 2015; GENDRON *et al.*, 2002). Dessa forma, inibidores das ecto-nucleotidases podem agir de forma a aumentar a vida útil tanto do ATP quanto de outros nucleotídeos extracelulares, podendo resultar na potencialização da sinalização purinérgica (BAQI, 2015; MULLER *et al.*, 2006).

Idealmente, um inibidor de NTPDase não deve ser um substrato enzimático, a fim de não sofrer defosforilação, deve apresentar seletividade para apenas uma das isoformas descritas da enzima e não deve interagir com os receptores P2X e P2Y (GENDRON *et al.*, 2000; MULLER *et al.*, 2006). Até hoje, nenhum inibidor de NTPDase potente e seletivo foi descrito na literatura, e os mais conhecidos são análogos de ATP, no entanto, não possuem estabilidade química e fisiológica (BAQI, 2015). Dessa forma, a busca de inibidores específicos e potentes é altamente desejável para utilização como ferramentas biológicas e até mesmo como novas drogas.

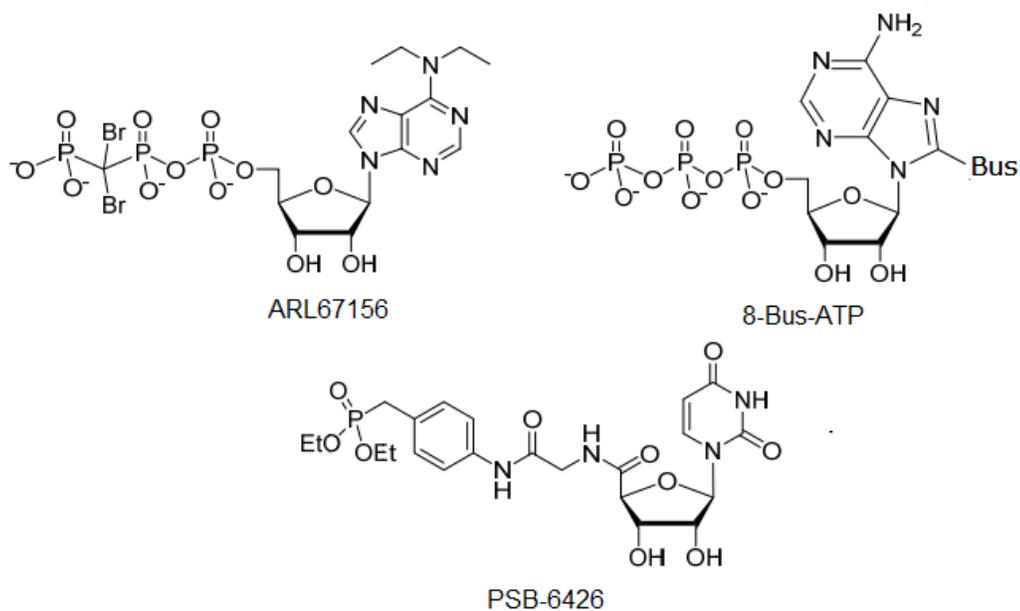
#### **1.3.1 Inibidores de ecto-nucleotidases derivados de nucleotídeos**

Os análogos estáveis de ATP, muitas vezes se mostraram mais eficazes em promover uma resposta biológica do que o próprio ATP endógeno (MULLER *et al.*, 2006). A molécula ARL-67156 (Figura 3) foi primeiramente descrita em 1995 por Crack *et al.*

como inibidor seletivo da NTPDase de células sanguíneas. É um análogo de ATP que possui ação sobre NTPDases e fosfatases alcalinas, mas devido à existência de uma ponte de oxigênio em sua estrutura é susceptível a hidrólise pelas E-NPPs (BAQI, 2015). Essa molécula é capaz de inibir fracamente as NTPDase1 e NTPDase3, mas não possui efeito inibitório significativo sobre as NTPDase2 e NTPDase8 (LEVESQUE *et al.*, 2007; VIVIAN *et al.*, 2010).

Gendron *et al.* em 2000, realizou síntese de diversas moléculas modificadas na cadeia fosfatídica de agonistas purinoceptores que se mostraram resistentes à hidrólise pelas NTPDases e também foram capazes de inibi-la, dando origem à primeira caracterização da família de análogos de ATP com substituição em C8 (Figura 3) (GENDRON *et al.*, 2000). Posteriormente, os derivados de 8-tioéter-ATP (8-BuS-AMP, 8-BuS-ADP e 8-BuS-ATP) foram avaliados quanto à sua especificidade, sendo eficazes na inibição da NTPDase1 de humanos e camundongos de maneira competitiva. A molécula 8-BuS-ATP mostrou-se susceptível à hidrólise por outras NTPDases, e as moléculas 8-BuS-AMP e 8-BuS-ADP foram as mais potentes e seletivas sobre a NTPDase1 expressa nas células endoteliais da veia umbilical humana e tecidos de camundongos (LECKA *et al.*, 2013).

A molécula PSB-6426 (Figura 3), resultado da substituição dos resíduos de fosfato por ésteres de ácido fosfônico ligados a uridina na posição 5', é quimicamente e metabolicamente estável, mostrando-se inibidora competitiva da NTPDase2. Além disso, sua característica não-carregada pode favorecer sua biodisponibilidade por via oral (BAQI, 2015; BRUNSCHWEIGER *et al.*, 2008).

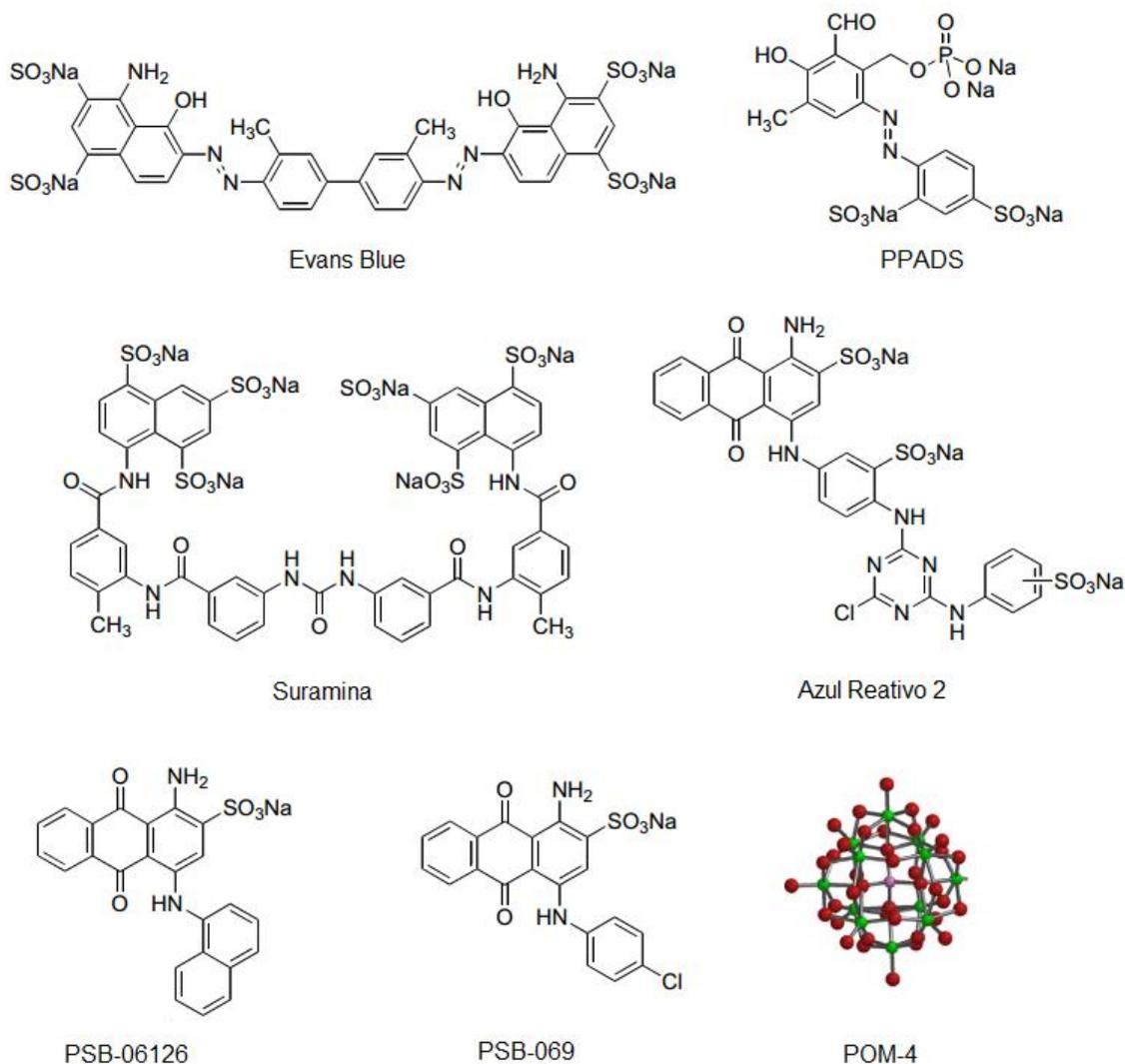


**Figura 3.** Estruturas químicas dos inibidores de ecto-nucleotidases derivados de nucleotídeos. (Adaptado de BAQI, 2015)

### 1.3.2 Inibidores de E-NTPDases não derivados de nucleotídeos

Dentre os inibidores de NTPDases não derivados de nucleotídeos, podemos citar corantes que contém grupos sulfonato como a suramina, Azul Reativo 2 (RB-2), PPADS (fosfato piridoxal-6-azofenil-2',4'-ácido disulfônico) e Azul de Evans (Figura 4).

Apesar de diminuírem a hidrólise de ATP, são não-seletivos, uma vez que também funcionam como potentes antagonistas de receptores do tipo P2, podendo muitas vezes anular os seus efeitos (BAQI, 2015; MULLER *et al.*, 2006). Apesar de serem amplamente utilizados em ensaios biológicos como inibidores de NTPDases, principalmente como controle positivo, ainda não foram estudados quanto à sua especificidade sobre as isoformas existentes.



**Figura 4.** Estruturas químicas dos inibidores de ecto-nucleotidases não-derivados de nucleotídeos. **Evans blue:** Azul de Evans; **PPADS:** Piridoxal fosfato 6-azofenil-2', 4'-ácido dissulfônico; **PSB-06126:** 1-amino-2-sulfo-4-(2-naftillamino)-antraquinona; **PSB-069:** 1-amino-2-sulfo-4-(4-clorofenilamino)-antraquinona; **POM-4:** Polioximetallatos. (Adaptado de BAQI, 2015)

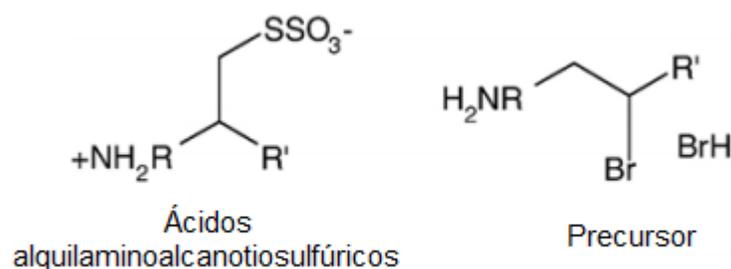
A suramina (Figura 4) é, originalmente, um dos antagonistas não-seletivos de receptores P2 mais utilizados desde sua descoberta em 1989 após investigação sobre

seu possível potencial inibidor da hidrólise de ATP sobre tecidos de bexiga urinária de cobaias (BULTMANN *et al.*, 1996; HOURANI & CHOWN, 1989). A própria substância e alguns de seus análogos foram analisados quanto ao seu potencial de inibição sobre a ecto-ATPase de artérias auriculares de coelhos ou células sanguíneas humanas, mostrando potencial inibitório significativo e de forma não competitiva sobre a enzima (BEUKERS *et al.*, 1995; CRACK *et al.*, 1994).

Recentemente, duas novas classes de inibidores foram caracterizadas, os polioximetallatos (POMs) e os derivados antraquinônicos como a 1-amino-2-sulfo-4-(2-naftillamino)-antraquinona (PSB06126) e a 1-amino-2-sulfo-4-(4-clorofenilamino)-antraquinona (PSB 069) (BAQI, 2015). Os POMs (Figura 4) são complexos metálicos inorgânicos negativamente carregados, relativamente estáveis em soluções aquosas em pH biológico. A presença da carga negativa faz com que apresentem similaridade com nucleotídeos, possuindo em sua estrutura íons metálicos de transição, como o tungstênio, molibdênio e vanádio, ligados por átomos de oxigênio (MULLER *et al.*, 2006). Dentre os seis polioximetallatos testados, todos mostraram maior potencial inibitório sobre NTPDases recombinantes do que os inibidores utilizados como controle (ARL67156, Azul Reativo 2 e suramina). O que pode explicar alguns efeitos observados em estudos *in vitro* e *in vivo*, mas a inibição não parece ter relação nem com o tamanho, forma ou cargas negativas de cada molécula (MULLER *et al.*, 2006). O polioxotungstato (POM-1) já está comercialmente disponível e é amplamente utilizado em estudos fisiológicos. No entanto, sua carga negativa e seu alto Massa molecular não favorecem sua utilização como fármaco (BAQI, 2015; BAQI *et al.*, 2009; WALL *et al.*, 2008).

Os derivados antraquinônicos (Figura 4), resultantes da identificação e modificação do grupo farmacofórico de RB-2, mostraram inibição similar ou maior do que o composto original. Este estudo também comprovou que a presença de um grupo sulfonado não-substituído na posição 2 do *scaffold* antraquinônico e a carga negativa da molécula são essenciais para a atividade NTPDase inibitória (BAQI *et al.*, 2009). A molécula PSB06126 foi um inibidor altamente seletivo da NTPDase3, enquanto que a PSB069 não apresentou seletividade sobre uma isoforma específica (BAQI *et al.*, 2009).

Uma família de drogas com potencial esquistossomicida, os ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (Figura 5), também foram estudadas quanto à inibição das ATP difosfohidrolases de *Schistosoma mansoni*. Os derivados estudados promoveram inibição sobre a atividade ADPásica e ATPásica do tegumento do verme, sendo a atividade ATPásica inibida em maior proporção. Alguns dos compostos estudados também promoveram inibição da atividade ATPásica e ADPásica da apirase de batata, que foi incluída no estudo por apresentar alta semelhança estrutural com as NTPDases solúveis (PENIDO *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Estrutura dos ácidos alquilaminoalcanotiosulfúricos (Adaptado de PENIDO *et al.*, 2007)

### 1.3.3 Inibidores utilizados como fármacos

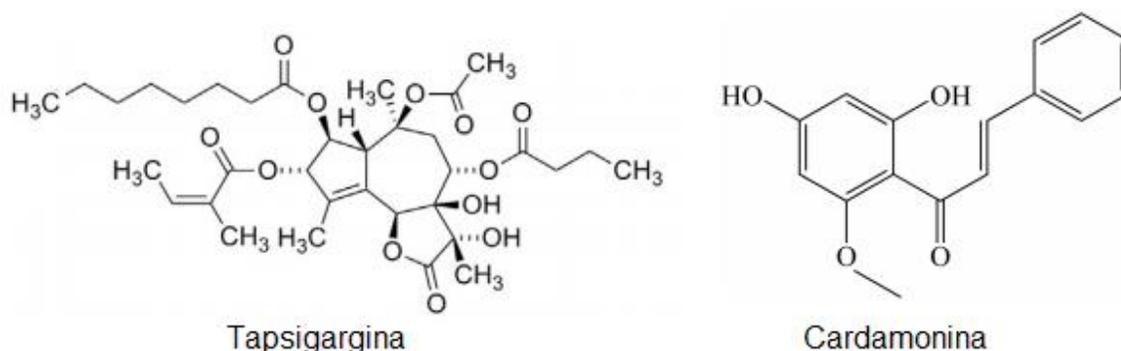
Ticlopidina e clopidogrel (Figura 6) são fármacos derivados da tienopiridina que possuem efeito anti-plaquetário e já são rotineiramente administrados em pacientes, como parte da terapia antitrombótica, principalmente após episódios cardíacos (LECKA *et al.*, 2014). Através da administração oral ou intravenosa, esses pró-fármacos sofrem conversão em sua forma reativa através da via do citocromo P450 no fígado, sendo seu efeito anti-agregante devido à inibição irreversível do receptor P2Y (LECKA, RANA & SEVIGNY, 2010).

Um estudo realizado com administração em concentrações terapêuticas dos pró-fármacos dessas drogas, mostrou que ambas foram capazes de reduzir a capacidade das células endoteliais vasculares em prevenir a agregação plaquetária por inibir em 80% a hidrólise de ADP como resultado da inibição da NTPDase1 de humanos, sendo que as outras isoformas de membrana não foram afetadas. Uma vez que a NTPDase1 é inibida, a hidrólise do nucleotídeo pró-agregante ADP não é realizada e, com o seu acúmulo, o



inibitório sobre as NTPDases. Sendo assim, Martins, Torres e Ferreira testaram seu potencial sobre a NTPDase do tegumento de *Schistosoma mansoni* demonstrando inibição máxima de 75% de sua atividade ATPásica na concentração de 300  $\mu\text{M}$ , a atividade ADPásica no entanto, não foi afetada (MARTINS, TORRES & FERREIRA, 2000). Em contraste com os resultados observados anteriormente, ao testar o potencial inibitório da tapsigargina sobre SmATPDase1 recombinante Da'dara e colaboradores encontraram apenas 20% de inibição sobre a atividade ATPásica, e 5% de inibição sobre a atividade ADPásica da enzima (DA'DARA *et al.*, 2014).

A cardamonina (Figura 7), uma chalcona isolada de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) foi recentemente testada em relação ao seu potencial de inibição sobre as isoformas de ATP difosfohidrolase de *S. mansoni*, promovendo 82% de inibição sobre a atividade ATPásica da NTPDase, enquanto a atividade ADPásica permaneceu inalterada (DE CASTRO *et al.*, 2015).



**Figura 7.** Estruturas químicas da tapsigargina e do cardamonina. (Adaptado de DOAN *et al.*, 2014 e NIU *et al.*, 2015)

Existe uma necessidade emergente da disponibilidade de inibidores das NTPDases principalmente para o mapeamento dos mecanismos e das consequências associadas com a liberação de nucleotídeos. Além de permitir a investigação dos papéis patofisiológicos relacionados às NTPDases contribuindo para a elucidação de novos fármacos com potencial de tratamento para uma vasta gama de doenças (AL-RASHIDA & IQBAL, 2014).

A apirase de *S. tuberosum*, ferramenta de estudo deste trabalho, apresenta grandes vantagens como ferramenta de estudo das NTPDases, principalmente das

isoformas secretadas. Seu processo de purificação é relativamente simples e permite a recuperação de quantidades satisfatórias de proteína, com elevado grau de pureza. Sua alta atividade hidrolítica permite visualização clara e objetiva do efeito de compostos inibidores. Assim, a inibição dessa enzima pode servir como processo de triagem para elucidação de novos compostos capazes de exercer ação específica sobre as NTPDases.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Purificar e caracterizar a apirase de *Solanum tuberosum* como ferramenta biotecnológica, validando sua aplicação como modelo na busca de novos inibidores das enzimas da família das ATP difosfohidrolases.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Padronizar a técnica de extração e purificação da apirase de *Solanum tuberosum*;
- b) Realizar ensaios enzimáticos de inibição da atividade com frações derivadas de diversas espécies vegetais, além de substâncias quimicamente sintetizadas sobre a apirase de *Solanum tuberosum*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE BATATA *Solanum tuberosum*

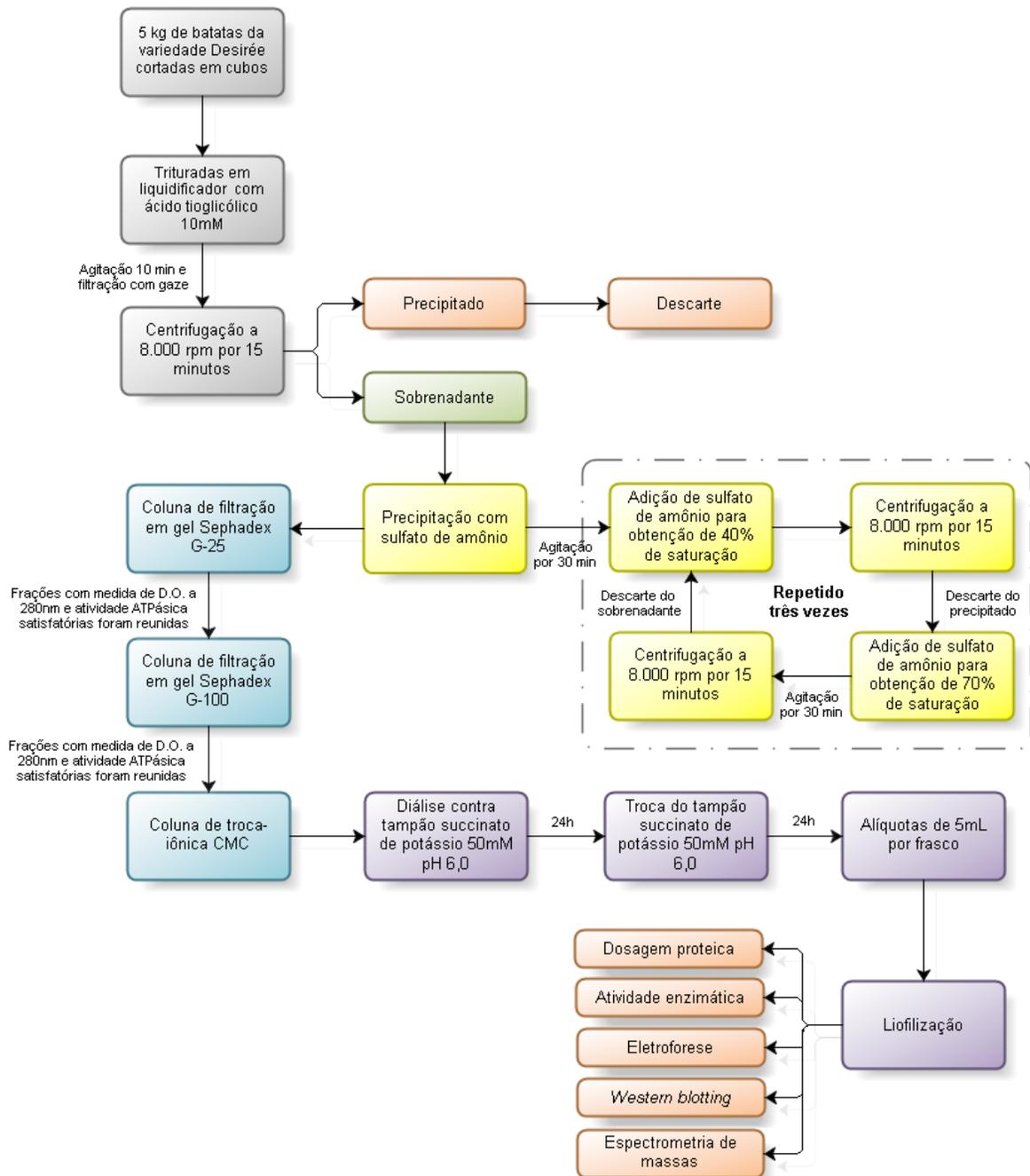


Figura 8. Esquema do processo de purificação da apirase de *Solanum tuberosum*.

A purificação de apirase de batata *S. tuberosum*, de origem comercial, foi realizada baseado em métodos previamente descritos (TRAVERSO-CORI, A., CHAIMOVICH & CORI, 1965; TRAVERSO-CORI, AÍDA, TRAVERSO & REYES, 1970; VALENZUELA *et al.*, 1973) e com modificações. Batatas da variedade Desirée foram obtidas em um supermercado local. Aproximadamente 5 kg de batatas foram descascadas, pesadas, cortadas em cubos e trituradas em liquidificador com adição de ácido tioglicólico 10 mM para inibição da ação das tirosinases. O extrato foi submetido à agitação durante 10 minutos, filtrado com o auxílio de gaze para eliminação dos resíduos sólidos e submetido à centrifugação a 8.000 rpm (11.860 g) por 15 minutos para remoção do amido, o sobrenadante foi mantido e o precipitado foi descartado.

Na segunda etapa, o volume do sobrenadante foi medido e quantidade suficiente de sulfato de amônio foi lentamente adicionado para se obter uma saturação de 40%, a solução teve o pH corrigido para 4,0 com hidróxido de amônio 2 N ou ácido sulfúrico 1 N e foi submetida à agitação branda por 30 minutos para equilíbrio do sistema. Procedeu-se à centrifugação a 8.000 rpm (11.860 g) por 15 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi mantido. Em seguida, foi adicionado quantidade suficiente de sulfato de amônio para se obter uma saturação de 70%, a solução foi então submetida à agitação branda por 30 minutos para equilíbrio do sistema e procedeu-se novamente à centrifugação a 8.000 rpm (11.860 g) por 15 minutos, mas dessa vez o precipitado foi mantido e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em ácido tioglicólico 10 mM em volume correspondente a 10% do extrato bruto. Esse procedimento foi feito três vezes, na segunda vez o precipitado foi ressuspenso em volume correspondente a 2% do extrato bruto e na terceira vez o precipitado foi ressuspenso em volume correspondente a 0,5%.

A amostra obtida pelo processo de precipitação com sulfato de amônio foi aplicada em coluna de filtração em gel Sephadex G-25 (2,4 cm x 20,0 cm; *bed volume*: 90 mL) e posteriormente Sephadex G-100 (2,4 cm x 50,0 cm; *bed volume*: 226 mL), sendo eluídas com solução succinato de potássio 50 mM pH4,0, KCl 400 mM e ácido tioglicólico 1 mM. O volume morto foi desprezado e frações foram coletadas em tubos de ensaio. Para verificação da existência do pico as frações foram submetidas à medida de densidade

óptica a 280 nm em espectrofotômetro e à medida de atividade ATPásica pelo Método de Taussky e Shorr (1953). As frações com atividade foram reunidas e aplicadas em coluna de troca iônica carboximetilcelulose CMC (2,4 cm x 10,0 cm; *bed volume*: 70 mL) e eluídas com solução de succinato de potássio 50 mM pH 6,0 e KCl 1 M. Procedeu-se à realização da medida de densidade óptica a 280nm em espectrofotômetro e a medida de atividade ATPásica. As frações com atividade foram reunidas e submetidas a diálise contra tampão succinato de potássio 50 mM pH6,0 por 48 horas, com uma troca de solução após 24 horas. O volume obtido no final do processo foi aliquotado em frascos pequenos de antibióticos previamente higienizados e submetido a liofilização em liofilizador.

O rendimento da purificação foi verificado ao longo do processo através de dosagem de proteínas, análise da atividade enzimática e eletroforese em gel de poliacrilamida. A identidade da proteína foi avaliada e confirmada por *western blotting* e espectrometria de massas.

### **3.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NÃO DESNATURANTE E VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA**

Alíquotas de 10 µg de apirase de batata foram solubilizadas em tampão de amostra composto por Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol 10%, deoxicolato de sódio (DOC) 0,2%, Triton X-100 0,2% e azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% com Triton X-100 0,1% e DOC 0,1% e submetidas à eletroforese inicialmente a 130V e subsequentemente a 100V por aproximadamente 3 horas usando o sistema Mini Protean III (BioRad). Após a corrida, o gel foi dividido ao meio e lavado duas vezes com tampão MOPS 50 mM pH 7,4 durante 20 minutos. Os géis foram incubados com MOPS 50 mM pH7,4, suplementado com CaCl<sub>2</sub> 10 mM e ATP 5 mM em estufa a 37°C. Após 1 hora de incubação, a atividade fosfohidrolítica foi detectada pela formação de precipitado de fosfato de cálcio no gel e fotografada sobre um fundo escuro.

### **3.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA GRADIENTE 8-16% E WESTERN BLOTTING**

Alíquotas de apirase de batata (10 µg) foi solubilizada em tampão de amostra, aquecida por 5 minutos a 95°C e aplicada em um gel de gradiente 8-16% de poliacrilamida (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden), utilizando padrão de Massa molecular pré-corado como referência. A corrida foi realizada por cerca de duas horas a 100V em sistema de eletroforese Amersham ECL Gel Box. Após a corrida, o gel foi dividido ao meio, sendo metade submetida à coloração pelo azul de Comassie (azul de Comassie 1% (m/v), ácido acético glacial v30% e metanol 40%) e a outra metade submetida à eletrotransferência para membrana de nitrocelulose em sistema Mini Trans-Blot III (BioRad) por 1 hora. Após a eletrotransferência, a membrana foi cortada em tiras, bloqueada por 2 horas com tampão fosfato (PBS), caseína 3% e tween 20 0,1% e incubadas com anticorpos anti-apirase de batata produzidos em camundongos na diluição 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2000. Os ensaios foram revelados por quimioluminescência utilizando anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase na diluição 1:500 (Bethyl Laboratories INC, TX, USA) e luminol como substrato, seguido de exposição a filmes de raio-X de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western Blotting System, GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

Para obtenção dos soros anti-apirase de camundongos fêmeas de camundongos C57BL/6 foram adquiridas do centro de Biologia da Reprodução (CBR), localizado no Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Estes camundongos, com sete semanas de vida e cerca de 22 g, receberam duas doses de apirase de batata (10 µg) via intraperitoneal, com intervalo de quinze dias. A apirase de batata foi emulsificada em adjuvante completo de Freund para o primeiro inóculo, e em adjuvante incompleto de Freund para o segundo inóculo. Amostras de sangue foram obtidas antes do primeiro inóculo e após 7 dias do último inóculo por coleta através do plexo retro-orbital, com auxílio de pipeta de Pasteur. As amostras de soro imune obtidas por centrifugação foram estocados a -20°C. A obtenção destes soros foi aprovada pelo comitê de ética em Experimentação animal da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o protocolo nº025/2012.

### 3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As bandas visualizadas no gel de poliacrilamida de gradiente foram excisadas e submetidas a análise por espectrometria de massas. Após a realização da digestão do gel e da obtenção dos peptídeos trípticos, estes foram ressuspensos em 20  $\mu\text{L}$  de solução de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA, Fluka<sup>®</sup>) e transferidos para vial com insert de 150  $\mu\text{L}$ . Um volume de 5  $\mu\text{L}$  foram injetados utilizando o sistema nanoUHPLC UltiMate<sup>®</sup> 3000 (Dionex<sup>®</sup>) equipado com coluna Nano-Trap Acclaim PepMap100 C18 (100  $\mu\text{M}$  i.d.  $\times$  2 cm, 5  $\mu\text{M}$ , 100  $\text{\AA}$ ; Thermo Scientific<sup>®</sup>) e coluna capilar Acclaim PepMap100 C18 RSLC (75  $\mu\text{M}$  i.d.  $\times$  15 cm, 2  $\mu\text{M}$ , 100  $\text{\AA}$ ; Thermo Scientific<sup>®</sup>). Primeiramente, os peptídeos são retidos no trap utilizando fase móvel composta de ACN 2% com TFA 0,05% e, após 3 minutos, são eluídos a uma vazão de 3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Estes peptídeos eluídos previamente são então submetidos à separação cromatográfica em coluna C18. Para tal, utilizou-se fase móvel com vazão de 0,300  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , sendo composta por: (A) ácido fórmico 0,1% e, (B) ACN 80%, ácido fórmico 0,1%, sob modo gradiente de 4 a 90% de B em 43 min, à 40°C.

O sistema nano UHPLC é acoplado ao instrumento Q-Exactive (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Bremen, Alemanha) através da fonte Nanospray Flex Ion (Thermo Scientific), realizando a análise por espectrometria de massas dos peptídeos eluídos. Esta fonte é equipada com emitter de aço-inoxidável nano-bore (150  $\mu\text{M}$  o.d.  $\times$  30  $\mu\text{M}$  i.d., Proxeon, Thermo Scientific<sup>®</sup>), operou sob voltagem de 1,9 kV, no modo positivo e temperatura de 250°C. Realizou-se varredura no modo scan com uma resolução de 70.000 com tempo máximo de injeção de 100 ms e acúmulo de íons no valor de  $3 \times 10^6$ . Neste equipamento a fragmentação dos íons ocorre na cela de higher-energy collisional dissociation (HCD) e, neste método selecionou-se os 12 íons mais intensos monitorados na faixa de 300-2.000 m/z, com carga  $\geq 2$  e  $\leq 5$ , que foram isolados em uma faixa de 2 m/z antes de serem fragmentados, com energia de colisão normalizada em 30 V. Os espectros MS/MS gerados foram adquiridos com resolução de 17.500, tempo máximo de injeção de 150 ms e acúmulo de íons no valor de  $5 \times 10^5$  íons. O tempo de exclusão utilizado foi de 40 segundos.

### 3.4.1 Análise de dados

Após a obtenção dos espectros de massas, este conjunto de dados foi submetido à busca em banco de dados utilizando o software Proteome Discoverer (versão 1.4, Thermo Scientific®). Para isso, utilizou-se o *workflow* com sistema de busca via SequestHT com event detector e precursor ions area detector, para quantificação por label-free. Os parâmetros de busca incluíram: (i) enzima: tripsina/P; (ii) número máximo de sítio de clivagem perdidos = 2; (iii) carbamidometilação (C), como modificação estática; (iv) oxidação de metionina e acetilação N-terminal, como modificações dinâmicas; (v) tolerância de massa de 10 ppm para íons parentais e de 0,1 Da para os fragmentos.

Como banco de dados para a realização da busca utilizou-se o banco de *Solanum tuberosum* revisado disponível no servidor Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), contendo 528 sequências. Após a busca, foram consideradas como identificadas apenas as proteínas que apresentaram peptídeos com confiabilidade de no mínimo 5% (*false discovery rate*) e com o mínimo de dois peptídeos únicos.

## 3.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA APIRASE DE BATATA

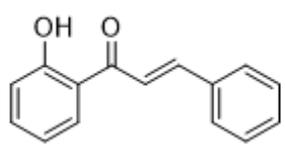
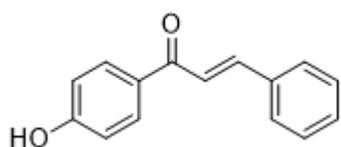
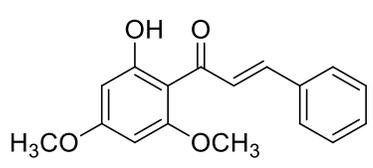
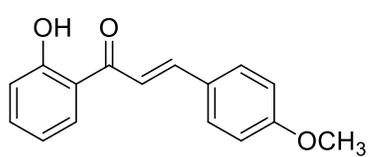
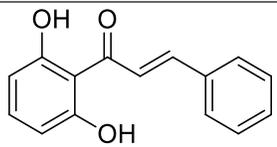
### 3.5.1 Grupos de substâncias e frações testadas

As substâncias e frações analisadas neste estudo foram cedidas pelo Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN/UFJF) e pelo Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN/USP).

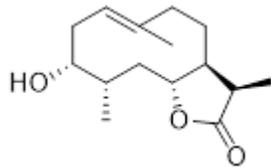
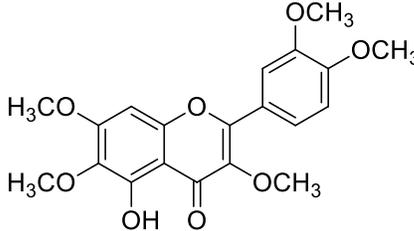
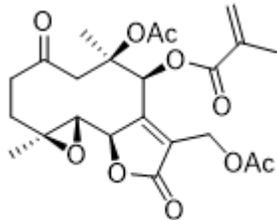
As substâncias purificadas, ou seja, compostos com o massa molecular definida, foram pesadas em balança analítica Shimadzu AX200 e empregadas para obtenção de uma concentração estoque 5 mM, sendo diluídas em água destilada ou DMSO. A partir da solução estoque, diluições seriadas foram realizadas para obtenção das seguintes concentrações: 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM e 0,03125 mM. As frações derivadas de extrações vegetais, por sua vez, também foram pesadas na quantidade padronizada de 1 mg e submetidas a diluições seriadas para obtenção das

seguintes concentrações: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL e 0,03125 mg/mL.

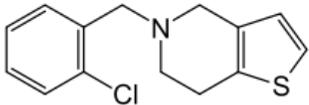
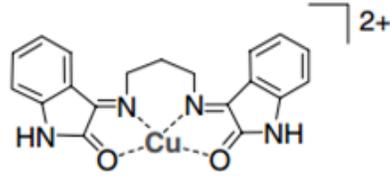
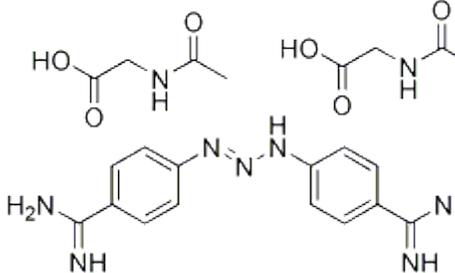
**Tabela 1.** Substâncias testadas no *screening* separadas por grupos.

Código	Nome químico	Massa pesada	Estrutura química
<b>Grupo 1: Chalconas</b>			
A6	( <i>E</i> )-1-(2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ) Massa molecular: 224,25 g/mol	0,001121g	
A7	( <i>E</i> )-1-(4-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> ) Massa molecular: 224,25 g/mol	0,001121g	
A8	( <i>E</i> )-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> ) Massa molecular: 284,31 g/mol	0,001421g	
A44	( <i>E</i> )-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> ) Massa molecular: 254,28 g/mol	0,001271g	
A45	( <i>E</i> )-1-(2,6-diidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> )	0,001201g	

	Massa molecular: 240,25 g/mol		
A46	( <i>E</i> )-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> ) Massa molecular: 254,28 g/mol	0,001271g	
A47	( <i>E</i> )-1-(2-hidroxi-4-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> ) Massa molecular: 344,36 g/mol	0,001722g	
A48	( <i>E</i> )-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> ) Massa molecular: 374,38 g/mol	0,001772g	
<b>Grupo 2: Outras substâncias puras</b>			
A10	Santina (C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> ) Massa molecular: 344,32 g/mol	0,001721g	
A11	Apigenina (C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) Massa molecular: 270,24 g/mol	0,001351g	

A33	Hidroxi-pelenolídeo (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> ) Massa molecular: 252,35 g/mol	0,001262g	
A35	Artemetina (C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> ) Massa molecular: 388,37 g/mol	0,001400g	
A43	Glaucolídeo A (C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub> ) Massa molecular: 464,47 g/mol	0,002200g	
<b>Grupo 3: <i>Aristolochia cymbifera</i>, <i>Solidago microglossa</i></b>			
A2	Extrato bruto raiz <i>Aristolochia cymbifera</i>	0,001g	-----
A3	Extrato bruto raiz <i>Solidago microglossa</i>	0,001g	-----
A50	Artemetina/hidroxi-pelenolídeo 5:1	0,001g	-----
<b>Grupo 4: <i>Artemisia absinthium</i></b>			
A5	Lavado DCM	0,001g	-----
A32	Óleo essencial	0,001g	-----
A34	Extrato bruto raiz	0,001g	-----
<b>Grupo 5: <i>C. parthenium</i></b>			
A9	Extrato bruto	0,001g	-----
<b>Grupo 6: <i>Vernonia polyanthes</i></b>			
A12	Lavado clorofórmico	0,001g	-----
A13	Macerado metanólico	0,002g	-----
A49	Lavado foliar DCM	0,001g	-----

<b>Grupo 7: <i>Achyroline saturoides</i></b>			
A14	Lavado clorofórmico	0,001g	-----
A15	Macerado metanólico	0,002g	-----
<b>Grupo 8: <i>Bidens pilosa</i></b>			
A16	Lavado clorofórmico	0,001g	-----
A17	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 9: <i>Equisetum arvense</i></b>			
A18	Macerado hexânico	0,001g	-----
A19	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A37	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 10: <i>Arrabidaea chica</i></b>			
A20	Macerado hexânico	0,001g	-----
A21	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A41	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 11: <i>Kalanchoe brasiliensis</i></b>			
A22	Macerado hexânico	0,001g	-----
A23	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A42	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 12: <i>Solanum lycocarpum</i></b>			
A24	Macerado hexânico	0,001g	-----
A25	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A36	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 13: <i>Solanum paniculatum</i></b>			
A26	Macerado hexânico	0,001g	-----
A27	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A40	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 14: <i>Pothomorphe umbellata</i></b>			
A28	Macerado hexânico	0,001g	-----
A29	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A39	Macerado metanólico	0,001g	-----

<b>Grupo 15: <i>Smilax áspera</i></b>			
A30	Macerado hexânico	0,001g	-----
A31	Macerado clorofórmico	0,001g	-----
A38	Macerado metanólico	0,001g	-----
<b>Grupo 16: Ticlopidina, Cu(isapn) e Aceturato de diminazeno</b>			
Ticlopidina	Ticlopidina	0,001g	
Cu(isapn)	[Cu(Isapn)] <sup>+2</sup>	0,001g	
Diminazeno	Aceturato de diminazeno	0,001g	

### 3.5.2 Ensaio de inibição enzimática

O produto da atividade enzimática foi avaliado de acordo com o método modificado de Taussky & Shorr (1953). No ensaio de triagem, **0,6 ng** de apirase de batata purificada foi adicionada ao meio de reação contendo 166,4 µl de água deionizada, 50 µl de tampão succinato 5x concentrado e 25 µl da droga de interesse totalizando um volume de 250 µl. As amostras foram analisadas em duplicata. Os tubos foram incubados durante 10 minutos em banho-maria a 37°C para estabilização do sistema e a reação foi disparada com a adição de 7,5 µl de ATP 0,1 M. Após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 250 µl de HCl 0,1 N. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada pela adição de 500 µl de reagente de cor (FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, molibdato de amônio e água deionizada), e realizou-se a medida da densidade óptica em 660nm.

As concentrações finais de droga testadas após adição ao meio de reação foram: 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$  e 3,125  $\mu\text{M}$ . Em cada ensaio, para cada concentração foram realizadas duplicatas do grupo branco, em que a amostra proteica é adicionada após o término da reação, e duplicatas do grupo teste, em que a amostra proteica já se encontra adicionada ao meio de reação quando a mesma é disparada.

### 3.5.3 Cálculo da inibição

Para cada experimento, foram realizadas uma atividade enzimática basal (controle) ou atividade enzimática em DMSO em cada concentração, caso a droga estivesse solubilizada neste solvente. A partir deste valor, a atividade residual encontrada para cada droga foi subtraída da atividade enzimática basal e assim obteve-se o percentual de inibição da atividade enzimática de cada teste.

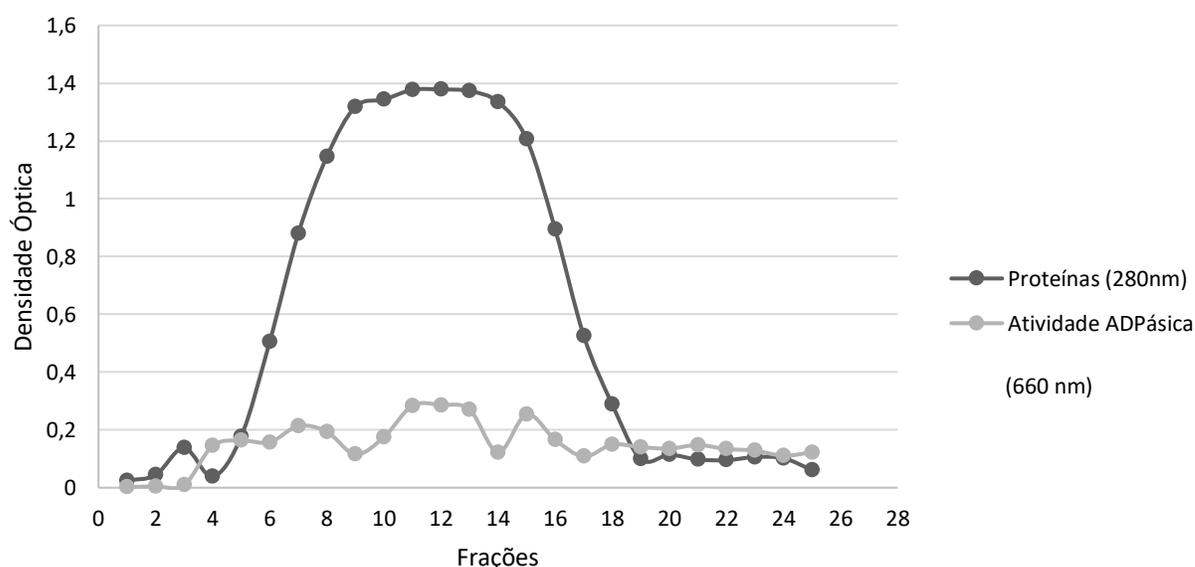
$$Atividade_{(nmolPi.mg^{-1}.min^{-1})} = \frac{atividade_{teste} - média\ atividade_{branco}}{conc.proteína/média_{curva}/tempo_{incubação}}$$

$$Inibição\ (%) = 100 - \left( \frac{média\ atividade_{droga}}{média\ atividade_{controle\ negativo}} \right) \times 100$$

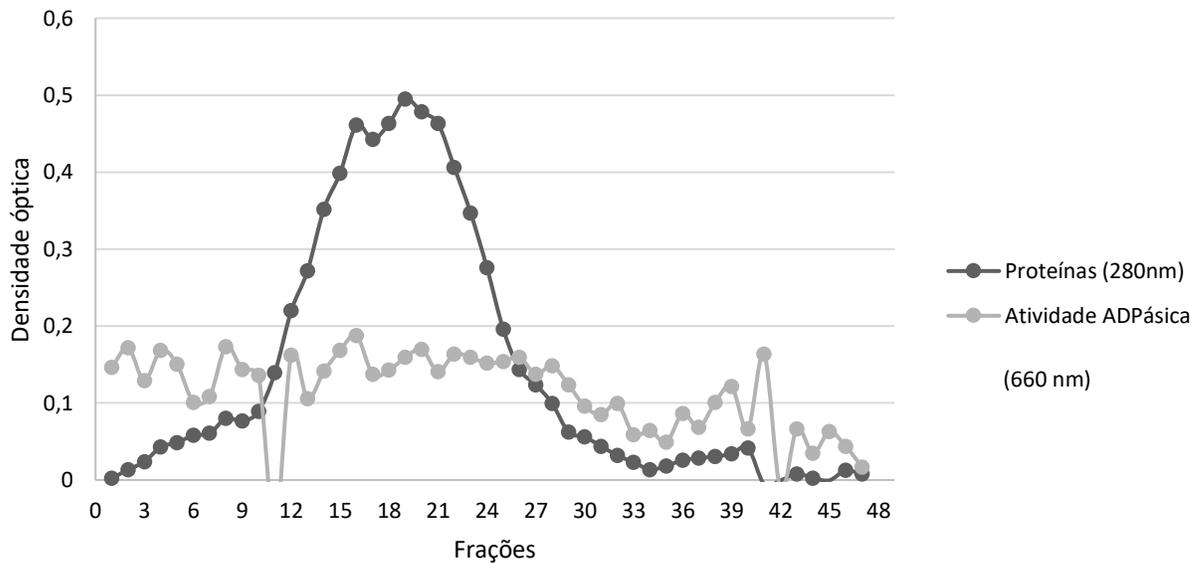
## 4 RESULTADOS

### 4.1 GRÁFICOS DE CONTEÚDO PROTEICO E ATIVIDADE ADPÁSICA DAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DA APIRASE DE *Solanum tuberosum*

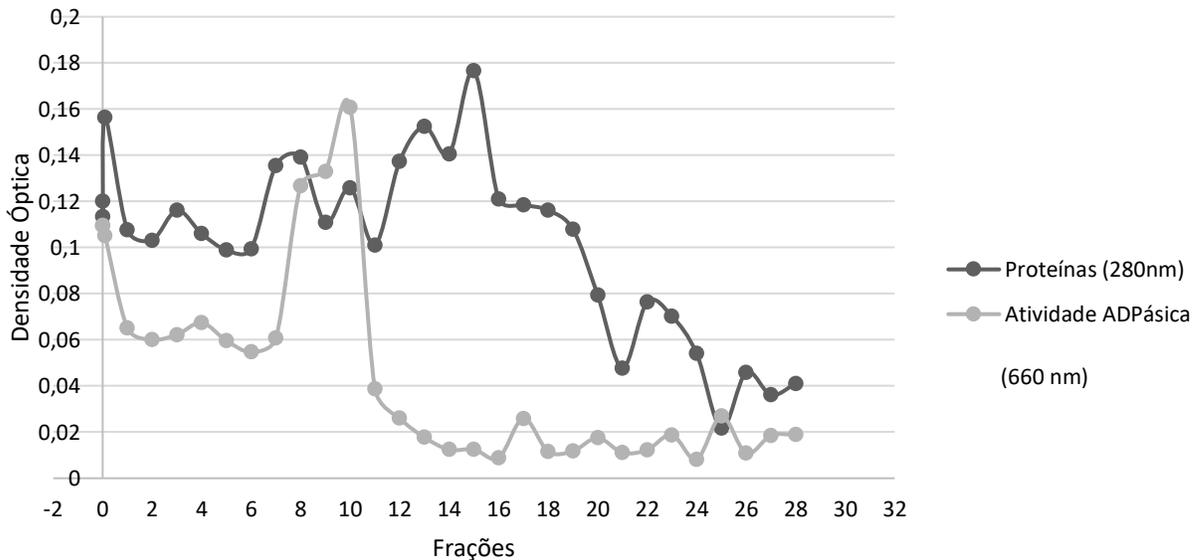
Para realização da purificação, a fração proveniente do processo de precipitação com sulfato de amônio foi submetida a passagem em três colunas, duas de gel filtração (G-25 e G100) e uma de troca iônica (CMC). As frações recolhidas de cada uma das colunas foram lidas em espectrofotômetro a 280 nm para estimativa do conteúdo proteico e analisadas em 660 nm após verificação da atividade ADPásica, realizada de acordo com o método de Taussky & Shorr (1953), com adaptações. Um gráfico foi construído com os valores obtidos para cada um dos parâmetros utilizados (Figura 9, Figura 10 e Figura 11) e, a partir destes gráficos, foi possível selecionar as frações com conteúdo proteico e atividade ADPásica satisfatórias para submeter as amostras as etapas seguintes. Na coluna G-25, as frações 4 a 20 foram reunidas e aplicadas na coluna Sephadex G-100. Na coluna G-100, as frações 9 a 30 foram reunidas e aplicadas na coluna de troca-iônica CMC. E por fim, as frações 1 a 24 foram reunidas e submetidas à liofilização.



**Figura 9.** Gráfico do conteúdo proteico e da atividade ADPásica referentes às frações obtidas da coluna Sephadex G-25. As frações 4 a 20 foram selecionadas e aplicadas na coluna de Sephadex G-100.



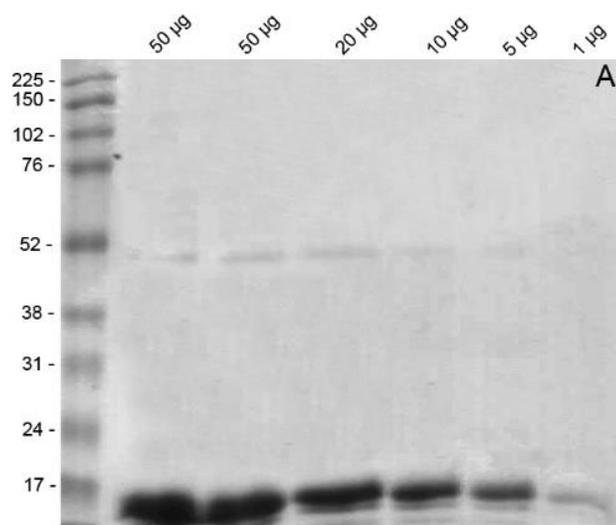
**Figura 10.** Gráfico do conteúdo proteico e da atividade ADPásica referentes às frações obtidas da coluna Sephadex G-100. As frações 9 a 30 foram selecionadas e aplicadas à coluna de troca iônica CMC.



**Figura 11.** Gráfico do conteúdo proteico e da atividade ADPásica referentes às frações obtidas da coluna de troca iônica Carboximetilcelulose (CMC). As frações 1 a 24 foram reunidas e submetidas à liofilização.

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO DA NTPDase DE *Solanum tuberosum* POR SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING UTILIZANDO SOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM APIRASE DE BATATA

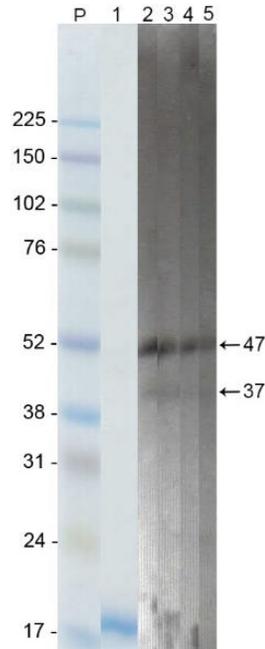
Após o processo de purificação da NTPDase de *S. tuberosum*, alíquotas de 1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg e 50 µg de proteína foram submetidas a separação por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (Figura 12). É possível observar a presença de duas bandas majoritárias na coloração por Comassie (Figura 12), de aproximadamente 50 kDa e 17 kDa, compatíveis com a massa predita para a apirase de batata.



**Figura 12. Avaliação do conteúdo proteico obtido após purificação da apirase de batata por SDS-PAGE.** Amostras de apirase da batata purificada (1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg e 50 µg) foram separadas por gel de poliacrilamida 12% e coradas com *Comassie blue*. A presença de duas bandas marcadas na região de 50 kDa e 17 kDa revelam a pureza da amostra obtida pela purificação.

A confirmação da identidade da proteína foi possível após a avaliação da reatividade da amostra por western blotting. Alíquotas de 10 µg de proteína foram separadas por gel de poliacrilamida gradiente 8-16%, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas por *western blotting* utilizando soros de camundongos imunizados com apirase de batata. A coloração por comassie blue revelou a presença de

uma banda majoritária no gel de gradiente com aproximadamente 17 kDa (Figura 13, tira 1). Após a execução da técnica de western blotting, o soro policlonal anti-apirase de batata foi capaz de revelar bandas nas alturas de aproximadamente 47 kDa e 37 kDa em todas as diluições testadas (1:250 até 1:2000; Figura 13, tiras 2,3,4,5), confirmando a presença de isoformas de apirase de batata na amostra após a purificação.



**Figura 13. Identificação da apirase de batata pela técnica de *Western Blotting*.** Amostras de apirase da batata purificada (10  $\mu$ g) foram separadas por gel de gradiente em poliacrilamida 8-16%, coradas com *Comassie* (1) ou eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas com anticorpos anti-apirase de batata produzidos em camundongos C57/BL6 nas diluições 1:250 (2), 1:500 (3), 1:1000 (4) e 1:2000 (5), confirmando a presença da enzima purificada. A imunorreatividade foi revelada por quimioluminescência, usando-se anticorpos secundários anti-IgG de camundongo acoplados a peroxidase na diluição 1:5.000 e luminol como substrato. **P**: padrão de massa molecular.

As bandas de aproximadamente 48 e 17 kDa, similares as detectadas pela análise por western blot foram excisadas do gel e preparadas para análise por LC-MS/MS. Os peptídeos trípticos e as proteínas contidas nas bandas do gel foram identificados utilizando o programa SEQUEST. A análise dos peptídeos obtidos através da banda de 48 kDa mostrou 2 peptídeos (4,41%) que correspondem a peptídeos presentes na sequência da apirase de *S. tuberosum* (Figura 14). Na banda de 17 kDa foi identificado apenas um peptídeo que pode ser identificado como proveniente da apirase de *S. tuberosum* (Figura 14).

MLNQNSHFVFTILAI FLVLPLSLLSKNVDAQIPLRRHLLSHESEHYAVIFDAGSTGSRVHVFRFDEKLGL  
 LPIGNNIEYFMATEPGLSSYAEDPKAAANSLEPLLDGAEGVVPQELQSETPLELGATAGLRMLKGDAAEK  
 ILQAVRNLVKNQSTFHSKDQWVTILDGTQEGSYMWAAINYLLGNLGKDYKSTTATIDLGGGSVQMAYAIS  
 NEQFAKAPNNEDGEPEYVQQKHLMSKDYNLYVHSYLNYGQLAGRAEIFKASRNESNPCALEGYDGYYSYGG  
 VDYKVKAPKKGSSWKRCRRLTRHALKINAKCKIEECTFNGVWNGGGGDGQKNIHASSFFYDIGAQVGIVD  
 TKFPSALAKPIQYLNAAKVACQTNVADIKSIFPKTQDRNIPYLCMDLIYEYTLVLDGFGFLNPHKEITVIH  
 DVQYKNYLVGAAWPLGCAIDLVSSTTNKIRVASS

**Figura 14. Localização dos peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas na sequência FASTA da apirase de *Solanum tuberosum* (Número de acesso: P80595).** As bandas proteicas de aproximadamente 48 e 17 kDa foram excisadas do gel, submetidas ao tratamento para reduzir e alquilar as proteínas seguida de digestão enzimática utilizando tripsina. Os peptídeos tripticos foram submetidos a análise por LC-MS/MS e as proteínas contidas nas bandas do gel foram identificadas utilizando o programa SEQUEST. As sequências identificadas na banda de 48 kDa estão destacadas em cinza, e a sequência identificadas na banda de 17 kDa estão destacadas em preto.

#### 4.3 ELETROFORESE EM GEL NÃO-DESNATURANTE E VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DA PROTEÍNA PURIFICADA

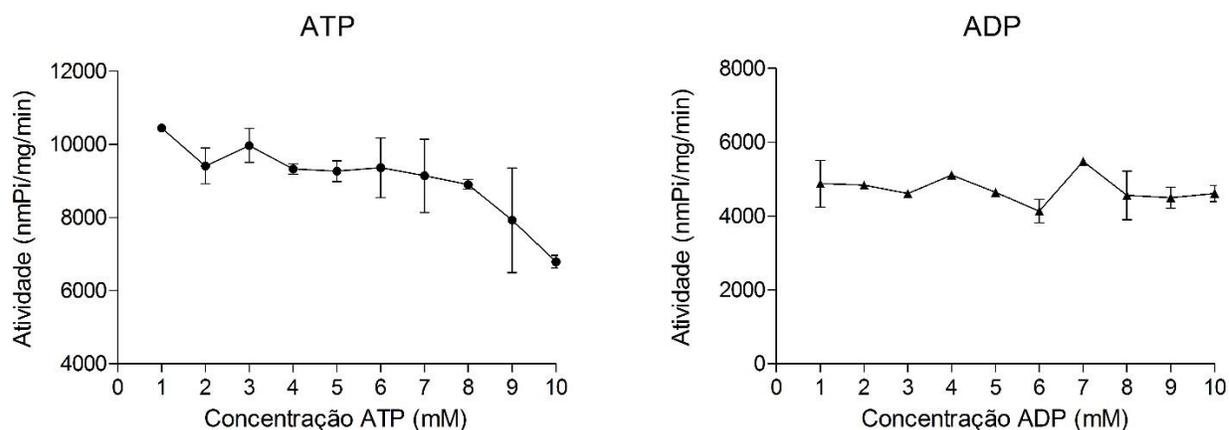
Alíquotas de 10 µg da proteína foram submetidas a eletroforese não-desnaturante para detecção da atividade fosfohidrolítica da enzima purificada. Foi possível observar a presença de depósito de fostato de cálcio em uma região do gel incubado com ATP (Figura 15, A) e ADP (Figura 15, B), indicando a preservação da atividade fosfohidrolítica da enzima de interesse após o processo de purificação.



**Figura 15. Atividade fosfohidrolítica da apirase de batata em gel não desnaturante.** Alíquotas de apirase da batata purificada (10 $\mu$ g) foram solubilizadas em DOC e Triton x100 e submetidas a corrida eletroforética em gel não desnaturante. Após a corrida, o gel foi lavado e incubado por 15h a 37°C em meio reação padrão com 10mM de CaCl<sub>2</sub> e 5mM do substrato ATP (A) ou ADP (B). Depósitos brancos de fosfato de cálcio foram visualizados como resultado da hidrólise dos nucleotídeos pela enzima. Os géis foram fotografados contra um fundo escuro.

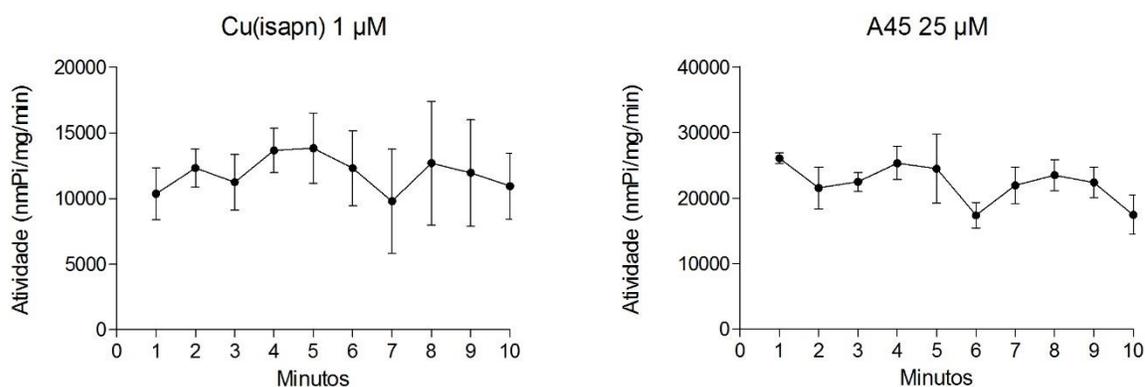
#### 4.4 TESTES DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA DA APIRASE DE *Solanum tuberosum* UTILIZANDO FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS PROVENIENTES DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS

O processo de triagem foi realizado pelo método de Taussky & Shorr (1953) utilizando a proteína na concentração de 0,6 ng. A reação foi incubada a 37°C durante 10 minutos antes da adição do substrato, com o intuito de estabilizar o sistema. Inicialmente, foi realizada uma curva da atividade fosfohidrolítica variando-se a concentração de ATP e ADP, com o intuito de definir a concentração que seriam utilizadas nos ensaios de inibição subsequentes (Figura 16). Foi possível observar que somente as concentrações de 8, 9 e 10 mM de ATP apresentaram uma taxa de decrescimento significativa. Após a realização deste ensaio, ficou definido que a concentração utilizada seria a de 3mM, uma vez que os gráficos não apresentaram variações significativas da atividade nas outras concentrações para qualquer um dos substratos avaliados, ATP ou ADP.



**Figura 16. Curva de padronização da quantidade de substrato ideal para os ensaios de inibição enzimática.** Alíquotas de 0,6 ng de apirase de bata purificada foram incubadas com os nucleotídeos ATP e o ADP em concentrações crescentes (1 mM a 10 mM) para avaliação das melhores condições de ensaio a 37°C. Após o tempo de incubação a reação foi parada pela adição de ácido sulfúrico a 4 N. A leitura foi realizada após incubação com o reagente de cor e a reação foi lida em 660 nm. Após 10 minutos de incubação com a enzima o teor de Pi liberado, fosfato inorganico, medido não sofreu grandes oscilações.

Em paralelo, foram selecionadas duas substâncias em concentrações previamente definidas, para avaliação da influência do tempo de incubação na atividade fosfohidrolítica da apirase de *S. tuberosum* (Figura 17). As amostras foram incubadas com ATP e a reação foi interrompida de 1 a 10 minutos após o disparo. Foi possível observar que não houveram variações significativas entre o tempo de incubação, dessa forma o tempo de escolha para avaliação dos próximos ensaios foi de 10 minutos.



**Figura 17. Avaliação da influência do tempo de incubação das substâncias Cu(isapn) 1µM e A45 25µM na atividade fosfohidrolítica.** Alíquotas de 0,6 ng de apirase de bata purificada foram incubadas com as substâncias Cu(isapn) – 1 µM - e A45 – 25 µM – e 3 mM de ATP a 37°C, com variação de tempo de incubação de 1 a 10 minutos. Após o tempo de incubação a reação foi parada pela adição de ácido sulfúrico a 4 N. A leitura foi realizada após incubação com o reagente de cor e a reação foi lida em 660 nm. Não havendo influência direta do tempo de incubação no perfil de hidrólise observado.

**Tabela 2.** Resultado final do processo de *screening* de substâncias e frações sobre a apirase de *Solanum tuberosum* separadas por grupos.

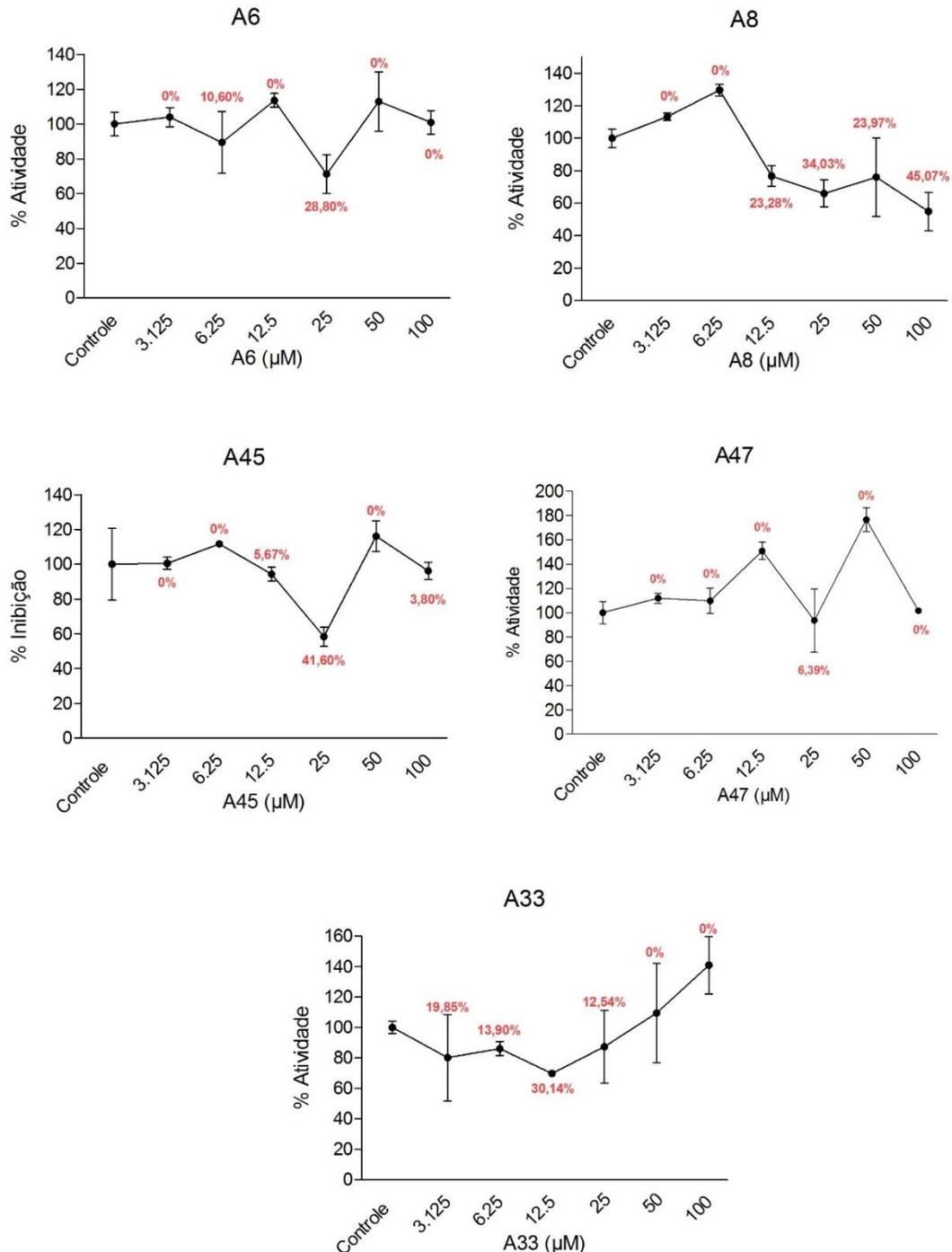
<b>Droga</b>	<b>Descrição</b>	<b>Resultado</b>
<b>Grupo 1: Chalconas</b>		
A6	(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	<b>Inibição</b>
A7	(E)-1-(4-hidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	Sem inibição
A8	(E)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	<b>Inibição</b>
A44	(E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona	Sem inibição
A45	(E)-1-(2,6-diidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	<b>Inibição</b>
A46	(E)-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona	Sem inibição
A47	(E)-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona	<b>Inibição</b>
A48	(E)-1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona	Sem inibição
<b>Grupo 2: Outras substâncias puras</b>		
A10	Satin	Sem inibição
A11	Apigenin	Sem inibição
A33	Hidroxipelenolídeo	<b>Inibição</b>
A35	Artemetina	Sem inibição
A43	Glaucolídeo A	Sem inibição
<b>Grupo 3: <i>Aristolochia cymbifera</i>, <i>Solidago microglossa</i></b>		
A2	Extrato bruto raiz <i>Aristolochia cymbifera</i>	<b>Inibição</b>
A3	Extrato bruto raiz <i>Solidago microglossa</i>	Sem inibição
A50	Artemetina/hidroxipelenolídeo 5:1	<b>Inibição</b>
<b>Grupo 4: <i>Artemisia absinthium</i></b>		
A5	Lavado DCM	Sem inibição
A32	Óleo essencial	Sem inibição
A34	Extrato bruto raiz	Sem inibição
<b>Grupo 5: <i>C. parthenium</i></b>		
A9	Extrato bruto	Sem inibição
<b>Grupo 6: <i>Vernonia polyanthes</i></b>		

A12	Lavado clorofórmico	Sem inibição
A13	Macerado metanólico	Sem inibição
A49	Lavado foliar DCM	<b>Inibição</b>
<b>Grupo 7: <i>Achyroline satureoides</i></b>		
A14	Lavado clorofórmico	Sem inibição
A15	Macerado metanólico	Sem inibição
<b>Grupo 8: <i>Bidens pilosa</i></b>		
A16	Lavado clorofórmico	Sem inibição
A17	Macerado metanólico	Sem inibição
<b>Grupo 9: <i>Equisetum arvense</i></b>		
A18	Macerado hexânico	Sem inibição
A19	Macerado clorofórmico	<b>Inibição</b>
A37	Macerado metanólico	<b>Inibição</b>
<b>Grupo 10: <i>Arrabidaea chica</i></b>		
A20	Macerado hexânico	Sem inibição
A21	Macerado clorofórmico	Sem inibição
A41	Macerado metanólico	<b>Inibição</b>
<b>Grupo 11: <i>Kalanchoe brasiliensis</i></b>		
A22	Macerado hexânico	<b>Inibição</b>
A23	Macerado clorofórmico	Sem inibição
A42	Macerado metanólico	<b>Inibição</b>
<b>Grupo 12: <i>Solanum lycocarpum</i></b>		
A24	Macerado hexânico	Sem inibição
A25	Macerado clorofórmico	Sem inibição
A36	Macerado metanólico	Sem inibição
<b>Grupo 13: <i>Solanum paniculatum</i></b>		
A26	Macerado hexânico	Sem inibição
A27	Macerado clorofórmico	Sem inibição
A40	Macerado metanólico	Sem inibição
<b>Grupo 14: <i>Pothomorphe umbellata</i></b>		

A28	Macerado hexânico	Sem inibição
A29	Macerado clorofórmico	Sem inibição
A39	Macerado metanólico	<b>Inibição</b>
<b>Grupo 15: <i>Smilax áspera</i></b>		
A30	Macerado hexânico	<b>Inibição</b>
A31	Macerado clorofórmico	Sem inibição
A38	Macerado metanólico	Sem inibição
<b>Grupo 16: Ticlopidina, Cu(isapn) e Diminazene</b>		
TICLO	Ticlopidina	<b>Inibição</b>
Cu(isapn)	[Cu(Isapn)] <sup>+2</sup>	<b>Inibição</b>
DIMI	Aceturato de diminazeno	<b>Inibição</b>

O grupo 1 apresentou resultados positivos para algumas das drogas analisadas quanto ao potencial de inibição da apirase de batata (Figura 18). A substância A6 (Figura 18) apresentou percentual de inibição de 10,60% para a concentração de 6.25  $\mu\text{M}$ , 28,80% para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ , e 0% para as demais concentrações, não sendo possível observar uma tendência dose-dependente. A substância A8 (Figura 18) apresentou uma relação dose-dependente à partir da concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  (23,28%) até a concentração de 100  $\mu\text{M}$  (45,07%) onde foi possível observar um aumento progressivo da inibição da atividade ATPásica. A substância A45 (Figura 18) apresentou o maior percentual de inibição para a concentração de 25  $\mu\text{M}$  (41,60%), seguido da concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  que apresentou um percentual de inibição de 5,67%. A substância A47 (Figura 18) apresentou inibição de 6,39% somente para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ .

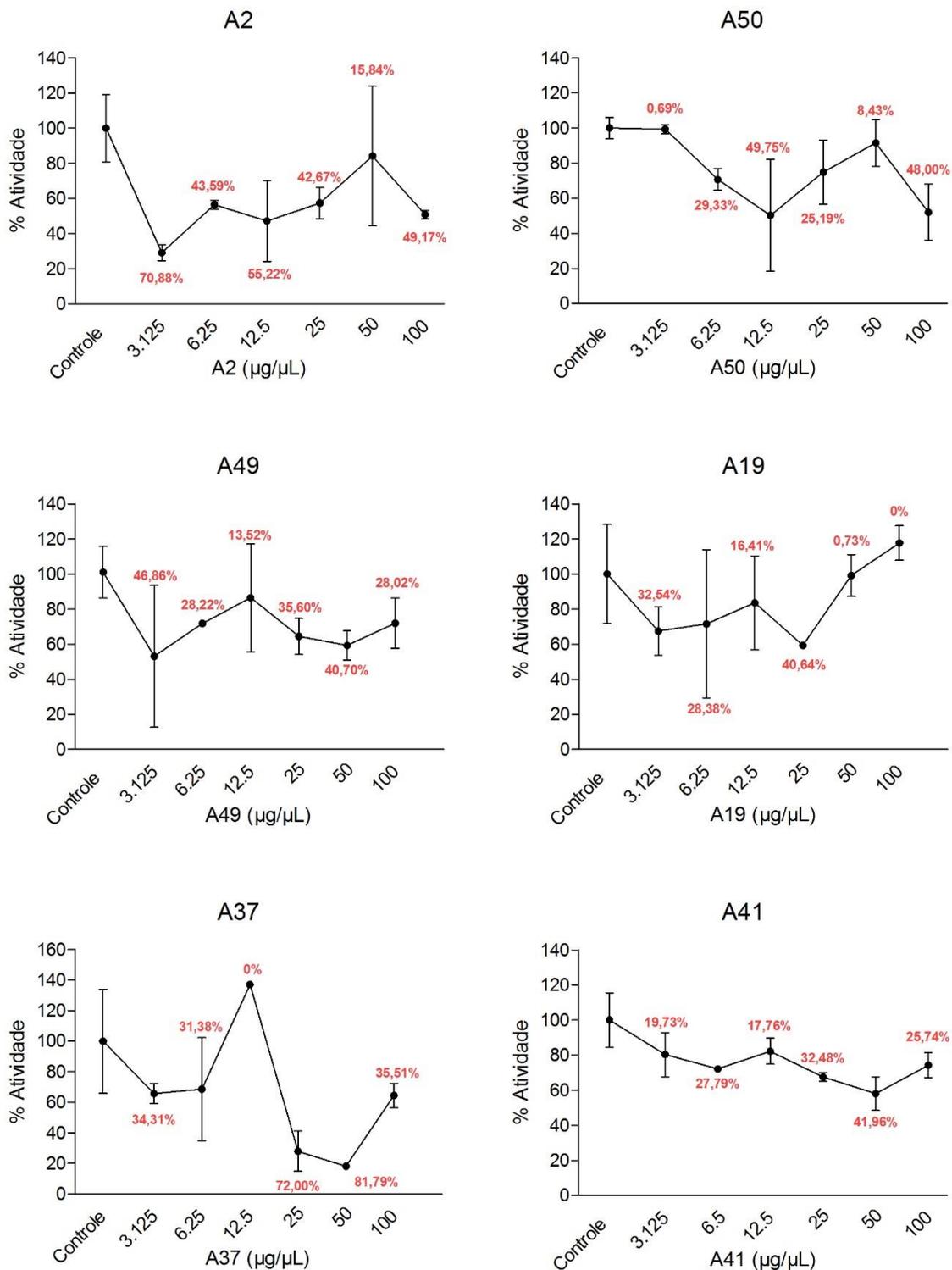
Do grupo 2 apenas a substância A33 apresentou inibição sobre a apirase de batata (Figura 18), em que a concentração de 3,125,  $\mu\text{M}$  promoveu 19,85% de inibição, seguida de 13,90 para a concentração de 6,25  $\mu\text{M}$ , 30,14% para a concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  e 12,54% para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ . As concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  não promoveram inibição sobre a enzima (Figura 18). Nenhuma outra substância pertencente ao grupo 2 (A10, A11, A35 e A43) apresentou valores expressivos de inibição (dados não mostrados).



**Figura 18.** Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* promovida pelas substâncias A6, A8, A45, A47 e A33. Os compostos foram analisados com base na atividade observada para o controle, que representa 100% da atividade ATPásica. Em vermelho têm-se a porcentagem de inibição de cada diluição em relação ao controle. As diluições foram representadas na forma de concentração em  $\mu\text{M}$  de cada droga. Para cada concentração de droga, foi realizado um controle DMSO na porcentagem correspondente ao da diluição das drogas.

Do grupo 3, as frações A2 e A50 apresentaram atividade inibitória sobre a apirase (Figura 19). A fração A2 apresentou maior valor de inibição, 70,88%, para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , seguido de 43,59% para 6,25  $\mu\text{M}$ , 55,22% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 42,67% para 25  $\mu\text{M}$ , 15,84% para 50  $\mu\text{M}$  e 49,17% para 100  $\mu\text{M}$ , não sendo observada uma relação dose-dependente do efeito observado. Já a fração A50 apresentou inibição de 0,69% para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 29,33% para 6,25  $\mu\text{M}$ , 49,75% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 25,19% para 25  $\mu\text{M}$ , 8,43% para 50  $\mu\text{M}$  e 48,00% para 100  $\mu\text{M}$  (Figura 19), não sendo possível observar nenhuma relação dose-dependente para o efeito. A outra fração pertencente a este grupo (A3) não apresentou valores de inibição significativos sobre a apirase de batata.

O grupo 6 possui apenas uma fração com atividade inibitória sobre a proteína, a A49, que apresentou percentual de inibição de 46,86% para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 28,22% para a concentração de 6,25  $\mu\text{M}$ , 13,52% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 35,60 para 25  $\mu\text{M}$ , 40,70% para 50  $\mu\text{M}$  e 28,02% para a concentração de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 19). As outras frações deste grupo (A12 e A13) não apresentaram valores de inibição sobre a apirase de batata. Do grupo 9, duas frações, a A19 e a A37, apresentaram valores de inibição sobre a apirase (Figura 19). A fração A19 apresentou 32,54% de inibição para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 28,38% para 6,25  $\mu\text{M}$ , 16,41% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 40,64% para 25  $\mu\text{M}$  e 0,73% para a concentração de 50  $\mu\text{M}$  (Figura 19). A fração A37 apresentou valores significativos de inibição para todas as concentrações (Figura 19), com 34,31% de inibição para a concentração de 3.125  $\mu\text{M}$ , 31,38% para 6,25  $\mu\text{M}$ , 72,00% para 25  $\mu\text{M}$ , 81,79% para 50  $\mu\text{M}$  e 35,51% para 100  $\mu\text{M}$ , apenas a concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  não apresentou inibição sobre a apirase de batata. A fração A18 pertencente a este grupo não apresentou valores de inibição sobre a proteína. Do grupo 10, apenas a fração A41 apresentou inibição sobre a apirase de *Solanum tuberosum* (Figura 19), com 19,73% de inibição para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 27,79% para 6,5  $\mu\text{M}$ , 17,76% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 32,48% para 25  $\mu\text{M}$ , 41,96% para 50  $\mu\text{M}$  e 25,74% para 100  $\mu\text{M}$ , sendo possível observar certa tendência dose-dependente para algumas das concentrações (Figura 19). As outras frações do grupo (A20 e A21), não apresentaram valores de inibição significativos sobre a apirase de batata.

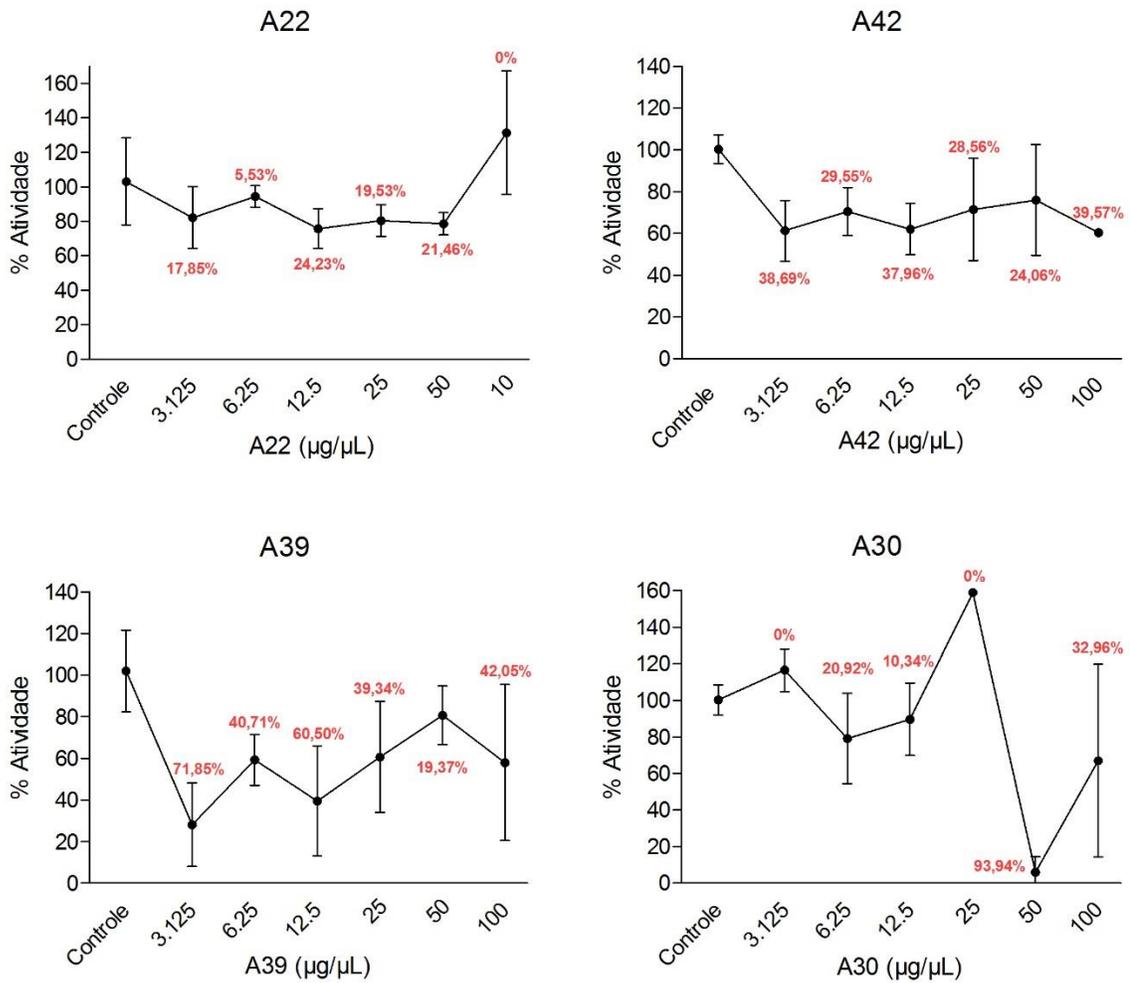


**Figura 19. Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* promovida pelas substâncias A2, A50, A49, A19, A37 e A41.** Os compostos foram analisados com base na atividade observada para o controle, que representa 100% da atividade ATPásica. Em vermelho têm-se a porcentagem de inibição de cada diluição em relação ao controle. As diluições foram representadas na forma de concentração em µM de cada droga.

Das frações pertencentes ao grupo 11, as frações A22 e A42 apresentaram atividade inibitória sobre a enzima. A fração A22 apresentou valores moderados de inibição para todas as concentrações, com 17,85% de inibição para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 5,53% para 6,5  $\mu\text{M}$ , 24,23% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 19,53% para 25  $\mu\text{M}$  e 21,46% para 50  $\mu\text{M}$  (Figura 20). A fração A42 apresentou o mesmo padrão de inibição com valores moderados, com 38,69% de inibição para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 29,55% para 6,5  $\mu\text{M}$ , 37,96% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 28,56% para 25  $\mu\text{M}$ , 24,06% para 50  $\mu\text{M}$  e 39,57% para 100  $\mu\text{M}$  (Figura 20). A fração A23 do mesmo grupo não apresentou inibição.

O grupo 14 apresentou inibição apenas na fração A39, com 71,85% de inibição para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$ , 40,71% para 6,5  $\mu\text{M}$ , 60,50% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 39,34% para 25  $\mu\text{M}$ , 19,37% para 50  $\mu\text{M}$  e 42,05% para 100  $\mu\text{M}$  (Figura 20). As frações A28 e A26 não apresentaram atividade inibitória sobre a proteína. Do grupo 15 apenas a fração A30 apresentou inibição sobre a proteína, com 20,92% de inibição para a concentração de 6,5  $\mu\text{M}$ , 10,34% para 12,5  $\mu\text{M}$ , 93,94% para 50  $\mu\text{M}$  e 32,96% para 100  $\mu\text{M}$  (Figura 20). As frações A31 e A38 não apresentaram atividade inibitória sobre a apirase de batata.

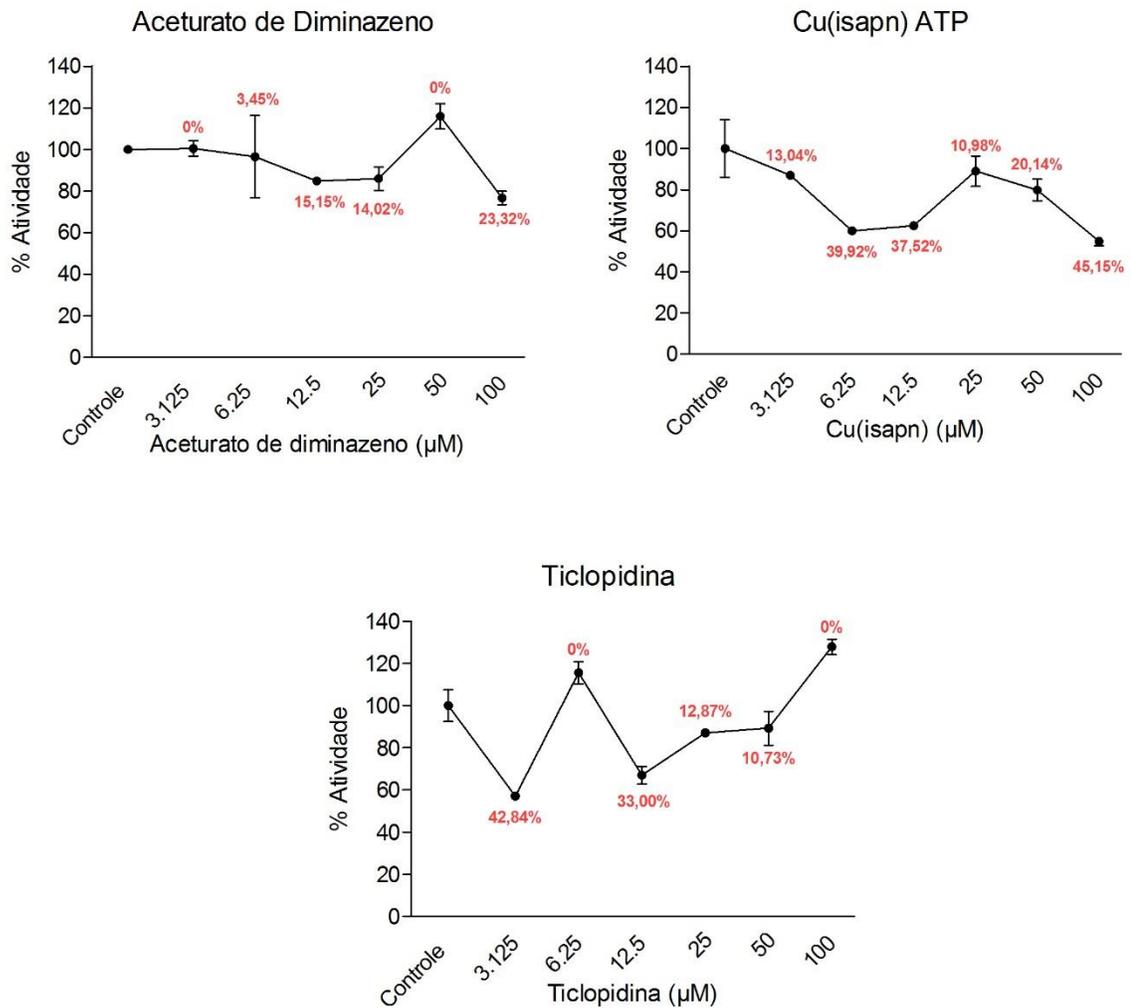
As frações pertencentes aos grupos 4, 5, 7, 8, 12 e 13 não apresentaram atividade inibitória sobre a apirase de *Solanum tuberosum*.



**Figura 20.** Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* promovida pelas substâncias A22, A42, A39 e A30. Os compostos foram analisados com base na atividade observada para o controle, que representa 100% da atividade ATPásica. Em vermelho têm-se a porcentagem de inibição de cada diluição em relação ao controle. As diluições foram representadas na forma de concentração em µM de cada droga. Para cada concentração de droga, foi realizado um controle DMSO na porcentagem correspondente.

O grupo 16 é composto pelas substâncias aceturato de diminazeno, Cu(Isapn) e a ticlopidina, sendo este último utilizado como controle positivo dos experimentos. O aceturato de diminazeno (Figura 21) promoveu inibição de 23,32% na maior concentração utilizada de 100  $\mu\text{M}$ , sendo o menor percentual de inibição (3,45%) encontrado para a concentração de 6,25  $\mu\text{M}$ . A curva de inibição não mostrou relação com a dose utilizada, pois mostrou algumas oscilações. A substância Cu(Isapn) (Figura 21) apresentou um percentual de inibição de 45,15% para a concentração de 100  $\mu\text{M}$ , sendo o menor percentual (10,98%) encontrado para a concentração de 25  $\mu\text{M}$ . A ticlopidina (Figura 21) promoveu inibição em todas as concentrações exceto pela 6,25 e 100  $\mu\text{M}$ , sendo a maior observada inibição (42,84%) observada para a concentração de 3,125  $\mu\text{M}$  e a menor (10,73%) para a concentração de 50  $\mu\text{M}$ . No entanto, a concentração de 100  $\mu\text{M}$  não promoveu inibição tanto nesse experimento quanto em outros anteriormente realizados (dados não mostrados).

Para os compostos que foram solubilizados em DMSO, foi realizado um controle para cada uma das concentrações de DMSO utilizada em cada diluição da droga: 0,625%, 1,25%, 2,50%, 5%, 10% e 20%, não sendo observada influência da concentração de DMSO sobre a atividade fosfohidrolítica da enzima.



**Figura 21. Inibição da atividade ATPásica da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* pelos compostos Aceturato de diminazeno, Cu(isapn) e da Ticlopidina.** Os compostos foram analisados com base na atividade observada para o controle, que representa 100% da atividade ATPásica. Em vermelho têm-se a porcentagem de inibição de cada diluição em relação ao controle. As diluições foram representadas na forma de concentração em µM de cada droga. Para cada concentração de droga, foi realizado um controle DMSO na porcentagem correspondente.

## 5 DISCUSSÃO

A apirase de batata, uma das primeiras proteínas da família das ATP difosfohidrolases a ser clonada, possui extenso potencial como ferramenta no estudo de diversas doenças (VASCONCELOS *et al.*, 2009). Análises *in silico* permitiram a avaliação da relação estrutural entre as NTPDases provenientes de diversos organismos, revelando alto grau de homologia entre a apirase de batata e várias outras proteínas desta família, em especial as isoformas de parasitos, entre elas a SmATPDase2 de *Schistosoma mansoni*, NTPases de *Leishmania*, NTPDase 5 e 6 de humanos e, em menor proporção, com CD39 de mamíferos ( VASCONCELOS *et al.*, 2009; FARIA-PINTO *et al.*, 2008; HANDA & GUIDOTTI, 1996). As NTPDases estão envolvidas em vários processos fisiopatológicos como respostas imunes e inflamatórias, coagulação, formação de tumores e virulência de microrganismos. Dessa forma, a busca de inibidores para as ATP difosfohidrolases possui grande interesse científico, uma vez que nenhum inibidor potente e específico para estas enzimas ainda foi encontrado (BAQI, 2015).

A homologia da apirase de batata com as isoformas de NTPDases de parasitos torna os ensaios aqui mostrados uma ferramenta no processo de triagem inicial para a busca de inibidores das ATP difosfohidrolases. A utilização da apirase de batata nestes ensaios pode vir a representar uma alternativa para diminuir o uso desnecessário de animais para obtenção de material biológico e/ou manutenção de ciclos para organismos específicos, atendendo, inclusive, ao apelo ético pela não utilização de animais na experimentação científica.

O processo de purificação aplicado mostrou-se eficiente na obtenção da proteína purificada, uma vez que os soros de camundongos imunizados com apirase de batata foram capazes de reconhecer bandas proteicas em todas as diluições utilizadas, sendo possível verificar a presença de bandas reativas na altura de 47 kDa e 37kDa, valor dentro do intervalo de massa predito para a apirase de *Solanum tuberosum* de acordo com estudos anteriores (HANDA & GUIDOTTI, 1996; KETTLUN, A. M. *et al.*, 2005; KETTLUN, A. M. *et al.*, 1982; TRAVERSO-CORI, A., CHAIMOVICH & CORI, 1965; VASCONCELOS *et al.*, 1996). A atividade fosfohidrolítica foi avaliada através de gel não

desnaturante, sendo a atividade ATPásica e ADPásica da proteína purificada confirmada através do depósito de fosfato de cálcio para os dois nucleotídeos utilizados.

A apirase de batata purificada foi submetida a testes cinéticos revelando uma razão ATPase/ADPase de aproximadamente 2,0, o que não está de acordo com o relatado para a variedade Desirée, que possui uma razão de hidrólise ATPase/ADPase igual a 1,0 (KETTUN, A. M. *et al.*, 1982; TRAVERSO-CORI, AÍDA, TRAVERSO & REYES, 1970; VASCONCELOS *et al.*, 2009). No entanto, já é conhecido que as batatas disponíveis comercialmente são geralmente misturas de variedades, o que pode fazer com que essa razão sofra variações de uma purificação para outra (TRAVERSO-CORI, AÍDA, TRAVERSO & REYES, 1970).

A técnica de espectrometria de massas para análise de proteínas é uma técnica de alta sensibilidade, resolução e acurácia uma vez que se baseia na medida de uma propriedade intrínseca da molécula, a sua massa (AEBERSOLD & MANN, 2003; MANN, HENDRICKSON & PANDEY, 2001). Neste estudo, a análise das bandas pela espectrometria de massas revelou na banda de ~47 kDa dois peptídeos únicos pertencentes a apirase de *Solanum tuberosum*. Na banda de 17 kDa, possivelmente um produto referente à hidrólise da proteína, foi identificado um peptídeo único também proveniente da apirase de *Solanum tuberosum*, o qual já era evidenciado anteriormente pelas eletroforese e ewestern blott das amostras purificadas. Outros peptídeos também foram identificados, mas não se referem à enzima de interesse deste estudo e também não são pertencentes à nenhuma outra proteína que age sobre a mesma via de hidrólise de nucleosídeos di- e tri-fosfatados. É possível que alguns destes peptídeos sejam provenientes dos reagentes utilizados e/ou do processo de purificação, visto que esta é uma etapa crucial da análise proteômica e, muitas vezes, a sensibilidade é determinada majoritariamente pelo processo de purificação do que pela sensibilidade intrínseca do espectrômetro de massas (MANN, HENDRICKSON & PANDEY, 2001).

Atualmente existe um apelo emergente pela descoberta de inibidores que sejam seletivos para cada subtipo de NTPDases e, é possível que a elucidação destes inibidores abra caminho para a descoberta de novas drogas, uma vez que as NTPDases estão envolvidas em diversos processos patológicos (MULLER *et al.*, 2006). Dessa forma, a modulação da sinalização purinérgica por um inibidor de NTPDase específico

encontra aplicação como uma ferramenta a ser utilizada na pesquisa básica e também com potencial de ser utilizada na clínica (GENDRON *et al.*, 2002). Um possível candidato seria a molécula análoga de ATP ARL67156 ( $N^6, N^6$ -diethyl- $\beta, \gamma$ -dibromomethylene-ATP), no entanto, em estudos recentes mostrou-se incompatível com as características desejáveis para um bom inibidor de NTPDases, como a susceptibilidade a hidrólise pelas NPPs e a inatividade sobre a isoforma 2 da NTPDase (BAQI, 2015).

A análise *in silico* do alinhamento entre estruturas primárias da NTPDase de *Solanum tuberosum* e as NTPDases descritas de *Homo sapiens*, revelou que a NTPDase6 é a proteína com maior homologia com a apirase de batata, apresentando 32% de identidade e 47% de similaridade, seguida da NTPDase5, que apresentou 29% de identidade e 47% de similaridade entre os aminoácidos. Oito isoformas de NTPDases já foram descritas em mamíferos, sendo as isoformas 1, 2, 3, e 8 de superfície celular, as isoformas 4 e 7 de localização intracelular e as isoformas 5 e 6 secretadas, pois não possuem o domínio C-terminal transmembrana podendo sofrer clivagem perto da porção N-terminal para formar uma proteína solúvel (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, ZEBISCH & STRATER, 2012). O gene da NTPDase6 é expressa predominantemente no músculo e nas células endoteliais capilares presentes no tecido cardíaco, no entanto, não parece estar envolvida na regulação dos níveis de ADP importantes para a manutenção da homeostase circulatória (HICKS-BERGER *et al.*, 2000; YEUNG *et al.*, 2000). E ambas as isoformas 5 e 6 são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento coclear, indicando a participação da sinalização pirimidinérgica neste sistema (O'KEEFFE *et al.*, 2010). A NTPDase 5 é uma enzima que age preferencialmente sobre a hidrólise de nucleotídeos di-fosfatados e, diferencia-se dos outros membros da família das NTPDases por ter sido caracterizada como um protooncogene, o PCPH (BRACCO, BERTONI & WINK, 2014; PAEZ *et al.*, 2001). O balanço PCPH/NTPDase5 pode agir sobre os níveis de ATP, interferindo com importantes funções celulares como ciclo celular, apoptose, proliferação e diferenciação (BRACCO, BERTONI & WINK, 2014). Estudos de revisão realizado por Bracco e colaboradores (2014) destacou a diferença dos níveis de expressão da NTPDase5 em diversos tipos e variados estágios de câncer, tendo sido identificada como um elemento crucial em vias envolvidas em processos neoplásicos e que conferem às células tumorais vantagens de sobrevivência em relação às células

normais (BRACCO, BERTONI & WINK, 2014). Dessa forma, é relevante reiterar a importância da elucidação de novas substâncias capazes de agir inibindo a via de sinalização das NTPDases, uma vez que estão envolvidas em diversos processos patológicos. Além disso, a proximidade evolutiva baseada em homologia existente entre a NTPDase de *Solanum tuberosum* e as NTPDases 5 e 6 de humanos corrobora a utilização da NTPDase de *Solanum tuberosum* como um modelo satisfatório no estudo destas duas enzimas.

Recentemente Souza e colaboradores (2014), realizaram análise comparativa entre as estruturas tridimensionais das isoformas de NTPDases secretadas de *Schistosoma mansoni* (SmATPDase2) e *Homo sapiens* (HsNTPDase6), visando estabelecer suas diferenças estruturais com o intuito de auxiliar na elaboração de fármacos e minimizar as possibilidades de inibição cruzada entre as duas proteínas, além de fornecer um modelo confiável para análises de *docking* para potenciais fármacos. Neste estudo foi possível observar algumas semelhanças entre a SmATPDase2 e a HsNTPDase6 como a presença de um único domínio transmembrana e o alto grau de conservação entre os resíduos do sítio catalítico das duas enzimas. No entanto, algumas diferenças também foram observadas, como diferenças no volume do sítio ativo e um perfil eletrostático mais negativamente carregado da SmATPDase2 na região da estabilização nucleosídica (DE SOUZA *et al.*, 2014). As semelhanças estruturais observadas neste estudo abrem portas para a elucidação de modelo tridimensional para a apirase de *Solanum tuberosum*, visando o estudo comparativo com outras NTPDases, em particular as isoformas 5 e 6.

As chalconas são cetonas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas precursores dos flavonóides e isoflavonóides, com ampla distribuição em produtos naturais (frutas, vegetais, chás e condimentos) e que, recentemente, ganharam grande importância devido às suas atividades farmacológicas anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antitumorais e anticancerígenas (NOWAKOWSKA, 2007; SINGH, ANAND & KUMAR, 2014).

Neste estudo, foram analisadas oito chalconas sintéticas quanto à inibição da apirase de *Solanum tuberosum*. Dentre elas, as chalconas A6, A46, A47 e A48 não apresentaram potencial inibitório, pois a maioria das concentrações utilizadas não inibiu

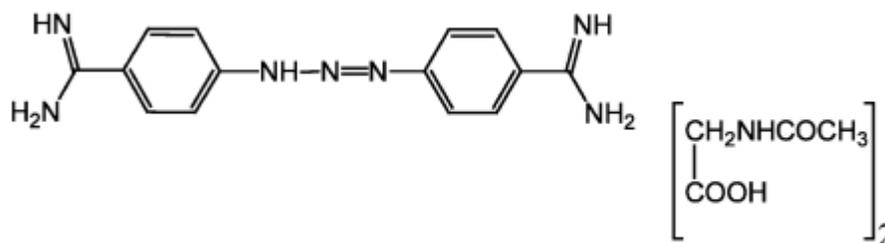
a atividade fosfohidrolítica da enzima ou apresentaram percentual de inibição muito baixo. Dentre as chalconas que apresentaram potencial inibidor da apirase, a A8 foi a que promoveu maior percentual (34,03%) de inibição da atividade hidrolítica na concentração de 25  $\mu$ M.

Os estudos realizados com a cardamonina, chalcona isolada da espécie *Piper aduncum* L. (Piperaceae), sobre o tegumento de *S. mansoni* mostrou inibição da atividade fosfohidrolítica das isoformas de ATP difosfohidrolase do parasito em torno de 82%, sendo utilizada nas concentração de 40  $\mu$ M (DE CASTRO *et al.*, 2015). Outro estudo semelhante mostrou a ação da tapsigargina, lactona sesquiterpênica isolada de *Thapsia garganica* L. (Apiaceae) também sobre a atividade fosfohidrolítica das ATP difosfohidrolases do tegumento de *S. mansoni*, em que o percentual de inibição máximo de aproximadamente 75% foi encontrado para a concentração de 300  $\mu$ M da droga. Interessante observar que, neste estudo, a tapsigargina não foi capaz de inibir a apirase de batata, apesar da semelhança estrutural entre as duas proteínas (MARTINS, TORRES & FERREIRA, 2000). Este fato pode ser justificado pela maior homologia entre a SmATPDase2 do parasito e a apirase de batata. A SmATPDase2 é uma proteína solúvel e secretada pelo parasito (LEVANO-GARCIA *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011). Como os ensaios com a tapsigargina foram realizados com amostras de tegumento de vermes adultos, a fração é enriquecida com a isoforma SmATPDase1, uma das enzimas mais expressas no tegumento (CASTRO-BORGES *et al.*, 2011), os resultados de falha na inibição com a apirase de batata podem ser justificados.

Penido e colaboradores (2007) ao analisar a ação das AAATs (ácidos alquil aminotiossulfúricos) sobre apirase de batata obtiveram percentuais de inibição superiores a 50% para as moléculas testadas na concentração de 1mM. No entanto, para a menor concentração, 1  $\mu$ M, o percentual de inibição foi menor do que os obtidos neste estudo para as chalconas A6, A7, A45 e A47 (PENIDO *et al.*, 2007). Os resultados encontrados aqui para algumas das chalconas analisadas (A8 e A45) foram promissores, mostrando-se capazes de inibir a atividade fosfohidrolítica da apirase de batata em percentuais próximos de 50% e em concentrações mais baixas do que as utilizadas nos estudos citados, considerando que o ensaio de inibição foi feito sobre a proteína purificada e que, portanto, apresenta atividade ATPásica basal maior (em torno de 20.000 nmolPi.mg<sup>-1</sup>

$1.\text{min}^{-1}$ ) do que o encontrado para todas as outras isoformas de ATP difosfohidrolases, incluindo a atividade observada para o homogeneizado de *S. mansoni* contendo 2 isoformas (atividades basais em torno de  $80 \pm 8,36 \text{ nmolPi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  ou  $130 \pm 34 \text{ nmolPi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ). Dessa forma, as chalconas A6, A8 e A45 podem apresentar-se como moléculas promissoras para o estudo de inibição de NTPDases de humanos.

Na análise do grupo 16 formado pelas substâncias aceturato de diminazeno, Cu(isapn) e ticlopidina, os percentuais de inibição encontrados também foram promissores. O aceturato de diminazeno, comercializado com o nome de Berenil® (Figura 22), é o fármaco de escolha para o tratamento da tripanossomíase animal há mais de 60 anos. Sua estrutura química consiste em uma diamidina aromática com duas porções amidinofenis ligados por uma ponte triazeno, e seu mecanismo de ação envolve a ligação com o DNA do cinetoplasto do tripanossoma promovendo danos irreversíveis que levam à formação de parasitos sem cinetoplasto, além de interagir com a DNA topoisomerase impedindo a replicação do DNA. Alguns estudos, no entanto, sugerem que o fármaco também possui potencial modulador da resposta imune do hospedeiro (KURIAKOSE & UZONNA, 2014). Sua elevada ação tripanossomicida despertou interesse sobre sua possível ação em outras doenças e atualmente novas propriedades do fármaco têm sido descobertas, como por exemplo, seu potencial ativador da Enzima Conversora de Angiotensina II (ECA II), podendo agir diretamente sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona e evidenciando seu papel no tratamento de doenças inflamatórias oculares (ZHENG *et al.*, 2015).

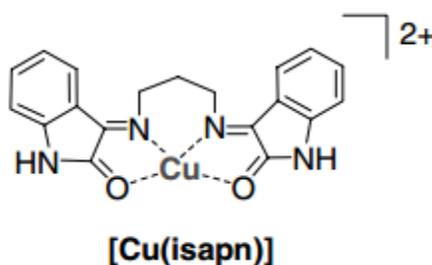


Aceturato de diminazeno

**Figura 22.** Estrutura química do aceturato de diminazeno. (Adaptado de ATSRIKU *et al.*, 2002)

Ainda não foram publicados estudos prévios relacionados à atividade dessa substância sobre a atividade das ATP difosfohidrolases, mas nesse estudo os resultados do aceturato de diminazeno mostraram-se satisfatórios, promovendo 23,32% de inibição da atividade fosfohidrolítica da apirase de batata na maior concentração de 100  $\mu\text{M}$ , e mantendo um percentual de inibição de 15,15% e 14,02% para as concentrações de 12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Recentemente, em nosso laboratório, essa substância foi analisada quanto ao potencial inibidor da ATP difosfohidrolase do tegumento de *S. mansoni* (dados não mostrados) e os resultados revelaram 100% de inibição da atividade fosfohidrolítica para as concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ , as outras concentrações testadas promoveram inibição maiores que 35% (dados não mostrados).

O  $[\text{Cu}(\text{Isapn})]^{+2}$  é um complexo quimicamente sintetizado do íon cobre(II) com derivados de iminas ou diiminas obtidos pela condensação de porções de isatina com aminas (Figura 23). Atualmente existe um interesse crescente pelo estudo da atividade biológica de complexos metálicos, pois alguns deles mostraram atividades antitumorais capazes de induzir apoptose, apesar de também possuírem propriedades pró-oxidantes sendo capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) potencialmente perigosas para o desencadeamento do processo de estresse oxidativo e para a viabilidade celular (CERCHIARO *et al.*, 2005).



**Figura 23.** Estrutura química do complexo de cobre(II) com a isatin-imina. (Adaptado de CERCHIARO *et al.*, 2005)

Similarmente ao aceturato de diminazeno, os complexos metálicos de cobre(II) ainda não foram avaliados quanto ao seu potencial inibitório sobre as ATP difosfohidrolases de nenhum organismo. No entanto, os resultados obtidos para o  $[\text{Cu}(\text{Isapn})]^{+2}$  neste estudo foram os mais estimulantes, sendo capaz de promover maior inibição sobre a apirase de batata, com percentuais de 45,15% para as a maior

concentração utilizada de 100  $\mu\text{M}$ . Percentuais satisfatórios de inibição também foram vistos para as concentrações de 12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , em que ocorreu 15,15% e 14,02% de inibição, respectivamente. Nosso laboratório também avaliou a atividade do Cu(isapn) sobre a atividade fosfolitolítica do tegumento de *S. mansoni*, e obteve resultados de 67,66% de inibição na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (dados não mostrados).

Ambos os resultados obtidos para o acetato de diminazeno quanto para o [Cu(Isapn)]<sup>+2</sup> promoveram maior percentual de inibição para a apirase de batata do que os percentuais obtidos por Penido e colaboradores para os AAATs na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Além disso, o percentual de inibição para concentrações menores de droga também foi superior ao encontrado no estudo das AAATs (PENIDO *et al.*, 2007).

A ticlopidina é um inibidor já elucidado das NTPDases, e neste estudo foi utilizado como um controle positivo dos experimentos. Foi possível observar inibição em todas as concentrações testadas, exceto pela concentração de 6,25 e 100  $\mu\text{M}$ , que não promoveram inibição da atividade fosfolitolítica das apirase de *Solanum tuberosum*. Este achado, no entanto, está em desacordo com estudos anteriores, em que a concentração de 100  $\mu\text{M}$  foi capaz de promover uma inibição de 80% na atividade ATPásica da apirase de batata (LECKA *et al.*, 2014). É possível que, durante os ensaios, a turvação promovida pela concentração elevada de ticlopidina na solução tenha afetado a leitura adequada do espectrofotômetro, promovendo uma leitura errônea da atividade fosfolitolítica na maior concentração.

*Aristolochia cymbifera* Mart. & Zucc (Aristolochiaceae), também chamada de mil-homens, caçaú, calunga ou aristolóquia é uma espécie nativa do Brasil e sua raiz já foi elucidada como tendo potencial estimulante, diurético e antisséptico (BRANDÃO *et al.*, 2008). Recentemente, o extrato alcoólico obtido de seu caule mostrou alto potencial bactericida sobre cepas importantes para o estabelecimento da cárie (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*) e outras de relevância como patógenos periodontais (ALVIANO *et al.*, 2008). Neste estudo, o extrato bruto obtido da sua raiz foi capaz de promover inibição sobre a apirase de *Solanum tuberosum*, e, visto que espécies do gênero *Aristolochia* são fontes de uma enorme variedade de compostos ativos pertencentes a diferentes classes (TIAN-SHUNG *et al.*, 2005), é possível que este extrato bruto contenha compostos relevantes capazes de promover a inibição da enzima.

*Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), comumente chamada de assa-peixe, têm sido utilizada popularmente no Brasil para o tratamento de reumatismo, bronquite e tosse (TOYANG & VERPOORTE, 2013). No entanto, sua atividade biológica foi comprovada no controle da pressão arterial (ROMANEZI DA SILVEIRA, FOGGIO & GONTIJO, 2003) e no tratamento da úlcera (BARBASTEFANO *et al.*, 2007). Este gênero é caracterizado quimicamente pela presença de flavonoides e terpenóides, e o estudo fitoquímico da espécie *Vernonia polyanthes* resultou no isolamento de diversos metabólitos secundários como flavonoides, saponinas, triterpenos e lactonas sesquiterpênicas (IGUAL *et al.*, 2013). Em 2007, Braga e colaboradores demonstrou o potencial do extrato metanólico desta planta sobre a inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis*, em que o extrato derivado de *V. polyanthes* apresentou maior efetividade dentre os extratos das outras espécies testadas (BRAGA *et al.*, 2007). Neste estudo, o lavado foliar de *V. polyanthes* demonstrou atividade inibitória sobre a *Solanum tuberosum*, desta forma, é possível que este extrato seja constituído de substâncias que promovam a inibição da enzima.

*Equisetum arvense* L. (Equisetaceae), também chamada de cavalinha, é uma espécie que cresce em diversas regiões da Europa, América do norte, América central e América do sul. A cavalinha é utilizada popularmente como agente diurético e no tratamento de pedras renais, infecções do trato urinário, pequenas cicatrizes e queimaduras (NAGAI, MYODA & NAGASHIMA, 2005). Ela já foi caracterizada como contendo constituintes antioxidantes: ácido caféico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, kaempferol, quecertina, apigenina e luteolina, e alguns destes compostos já demonstraram atividade antifúngica e antimicrobiana (GARCIA *et al.*, 2011; NAGAI, MYODA & NAGASHIMA, 2005; ONISZCZUK *et al.*, 2014). O extrato hidroalcoólico de *E. arvense* também já demonstrou atividade sedativa e anticonvulsivante (DOS SANTOS JR *et al.*, 2005). Neste estudo, o macerado clorofórmico e metanólico de *E. arvense* demonstrou atividade inibitória sobre a apirase de *Solanum tuberosum*. Neste sentido, é possível que alguns dos constituintes presentes nestes extratos estejam participando desse processo de inibição enzimática.

*Arrabidaea chica* Humb. & Bonpl. (Bignoniaceae) é uma espécie nativa da região amazônica, ocorrendo nas regiões tropicais da América do sul e África (BIESKI *et al.*,

2015). Na Amazônia é amplamente utilizada na medicina tradicional e possui ação antimicrobiana (MAFIOLETI *et al.*, 2013), cicatrizante (ARO; FREITAS, *et al.*, 2013; ARO; SIMÕES, *et al.*, 2013; JORGE *et al.*, 2008) e, recentemente seu potencial anti-inflamatório, antiangiogênico e antiproliferativo foi observado em modelo murino (MICHEL *et al.*, 2015). Flavonóides e antocianidinas já foram isolados de suas folhas, bem como antocianinas, antraquinonas, catequinas, ácidos orgânicos, esteroides, xantonas, taninos e flavonóis (BARBOSA *et al.*, 2008). No presente estudo, o macerado metanólico de *A. chica* foi capaz de promover inibição sobre a apirase de *Solanum tuberosum*, possivelmente devido à presença de algumas destas classes de substâncias já previstas em estudos prévios.

*Kalanchoe brasiliensis* Cambess (Crassulaceae) é uma planta medicinal brasileira tradicionalmente utilizada no tratamento de ferimentos, abscessos e processos inflamatórios e, seu extrato aquoso possui diversos flavonoides (IBRAHIM *et al.*, 2002). *K. brasiliensis* já demonstrou atividade inibitória sobre uma enzima *in vitro* em estudos anteriores, a tiroide peroxidase (FERREIRA, ROSENTHAL & CARVALHO, 2000). No presente estudo, o macerado hexânico e metanólico de *K. brasiliensis* foi capaz de inibir a atividade da apirase de batata, atividade que pode ocorrer devido a presença de flavonoides já descritos para essa espécie.

A raízes secas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Piperaceae) são utilizadas há várias décadas na medicina popular brasileira devido à sua atividade imunoestimulante, diurética e cicatrizante (BRANDÃO *et al.*, 2008; NORIEGA *et al.*, 2008). Análise fitoquímica da espécie revelou a presença de  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol e campesterol, e do extrato hexânico foram isolados 4-nerolidilcatecol, 4-5-hidróxi-7,3', 4'-trimetoxi-flavonona e sesamino (RODRIGUES *et al.*, 2012). Estudos relatam a atividade antioxidante na pele de camundongos com redução dos danos induzidos por raios UVB (ROPKE, C. D. *et al.*, 2005), além da inibição das metaloproteinases 2 e 9 na pele e na córnea podendo explicar, em parte, o mecanismo de ação protetor do extrato de *P. umbellata* (BARROS *et al.*, 2007; ROPKE, CRISTINA D. *et al.*, 2006). Além disso, as atividades oxidantes relatadas para extratos de *P. umbellata* foram atribuídos a presença do composto fenólico 4-nerolidilcatecol (LOPES *et al.*, 2013). Em 2008, Sacoman e colaboradores relataram a atividade anticancerígena do extrato e frações derivadas de

*P. umbellata* sobre linhagens celulares humanas, sugerindo a participação de diferentes compostos e reiterando a importância da família das Piperaceae como fontes de novas drogas (SACOMAN *et al.*, 2008). Atividade antimicrobiana da *P. umbellata* também foi relatada sobre *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Trichophyton rubrum* (ISOBE, OHSAKI & NAGATA, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2012). Este estudo revelou atividade inibitória do macerado metanólico sobre a pirase de *Solanum tuberosum*, o que sugere que essa fração contém compostos responsáveis por este mecanismo de ação e que devem ser melhor explorados.

*Smilax aspera* (Smilacaceae) tem sido utilizada tradicionalmente no tratamento da sífilis, diabetes, reumatismo e como antioxidante no tratamento sintomático da menopausa (IVANOVA *et al.*, 2011). Seu rizoma possui propriedades depurativas, diaforéticas, diuréticas estimulantes e tônicas, que são principalmente atribuídas à presença de saponinas esteroidais (BELHOUCHE *et al.*, 2008; DELGADO-PELAYO & HORNERO-MENDEZ, 2012). Estudo realizado com o trans-resveratrol, composto isolado de *S. aspera*, demonstrou efeitos anti-espasmódicos, hipotensores, anti-inflamatórios em ratos e efeito analgésico em camundongos (HARB, ZARGA & ABDALLA, 2009). A análise feita neste estudo revelou o potencial inibitório do macerado hexânico sobre a atividade da apirase de batata, promovendo percentuais de inibição próximos a 100% em todas as concentrações testadas.

Apesar do estudo realizado contribuir satisfatoriamente para a caracterização da apirase de batata como ferramenta biotecnológica, as oscilações observadas nos gráficos de inibição sugerem que a NTPDase de *S. tuberosum* não foi obtida em seu maior estado de pureza, o que requer ajustes no processo de purificação para que essa proteína seja completamente purificada e os resultados obtidos apresentem maior consistência e confiabilidade.

Como perspectivas futuras, seria desejável realizar modificações no processo de purificação da apirase de *S. tuberosum*, se forma a obtê-la em um maior grau de pureza, a análise completa do potencial de inibição destas moléculas e frações, avaliando a atividade ADPásica e a dependência do pH. Os resultados de inibição encontrados para as frações provenientes das espécies *Aristolochia cymbifera*, *Vernonia polyanthes*, *Equisetum arvense*, *Arrabidaea chica*, *Kalanchoe brasiliensis*, *Pothomorphe umbellata*, e

*Smilax aspera*, reiteram o potencial farmacológico destes vegetais e mostram a necessidade da realização de análise fitoquímica para a elucidação do(s) composto(s) responsáveis por este efeito inibitório sobre a apirase de *S. tuberosum*.

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, a purificação da apirase de *Solanum tuberosum* resultou na obtenção de uma proteína pura de ~47KDa, compatível com o massa predita para esta proteína, sendo confirmada sua identidade por ensaios de atividade em gel, *western blot* e espectrometria de massas.

Os testes de inibição da atividade fosfohidrolítica da apirase de *Solanum tuberosum*, revelaram 8 substâncias isoladas (A6, A8, A45, A33, Cu(isapn) e Aceturato de diminazeno) e 10 frações derivadas de extratos de diferentes espécies vegetais (A2, A50, A49, A19, A37, A41, A22, A42, A39 e A30) com potencial inibitório promissor sobre a atividade ATPásica da apirase de batata.

Com este estudo inicial, sugerimos que a apirase de batata possui potencial como ferramenta biotecnológica no estudo do potencial inibitório de substâncias sobre NTPDases que possuem alto grau de homologia com a apirase de batata.

## 7 REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 03/13/print 2003.

AL-RASHIDA, M.; IQBAL, J. Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. **Med Res Rev**, v. 34, n. 4, p. 703-43, Jul 2014.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 545-552, 6// 2008.

ARO, A. A.; FREITAS, K. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H.; GOMES, L.; VIDAL, B. C.; PIMENTEL, E. R. Effect of the Arrabidaea chica extract on collagen fiber organization during healing of partially transected tendon. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 799-807, 4/19/ 2013.

ARO, A. A.; SIMÕES, G. F.; ESQUISATTO, M. A. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; OLIVEIRA, A. L. R.; GOMES, L.; PIMENTEL, E. R. Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. **Injury**, v. 44, n. 7, p. 884-892, 7// 2013.

ATKINSON, B.; DWYER, K.; ENJYOJI, K.; ROBSON, S. C. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol Dis**, v. 36, n. 2, p. 217-22, Mar-Apr 2006.

BAGATINI, M. D.; MARTINS, C. C.; BATTISTI, V.; SPANEVELLO, R. M.; GASPARETTO, D.; ROSA, C. S.; GONCALVES, J. F.; SCHETINGER, M. R.; DOS SANTOS, R. B.; MORSCH, V. M. Hydrolysis of adenine nucleotides in platelets from patients with acute myocardial infarction. **Clin Biochem**, v. 41, n. 14-15, p. 1181-5, Oct 2008.

BAQI, Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery. **Mini Rev Med Chem**, v. 15, n. 1, p. 21-33, 2015.

BAQI, Y.; WEYLER, S.; IQBAL, J.; ZIMMERMANN, H.; MULLER, C. E. Structure-activity relationships of anthraquinone derivatives derived from bromaminic acid as inhibitors of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases). **Purinergic Signal**, v. 5, n. 1, p. 91-106, Mar 2009.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Vernonia polyanthes as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, n. 7-8, p. 545-551, 12// 2007.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. D. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. D. S.; SILVA JR., J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 544-548, 2008.

BARROS, L. F.; BARROS, P. S.; ROPKE, C. D.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B.; BELFORT JR, R. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of Pothomorphe umbellata after alkali injury. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 8, p. 1129-32, Aug 2007.

BASTID, J.; COTTALORDA-REGAIRAZ, A.; ALBERICI, G.; BONNEFOY, N.; ELIAOU, J. F.; BENSUSSAN, A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. **Oncogene**, v. 32, n. 14, p. 1743-51, Apr 4 2013.

BECKENKAMP, A.; SANTANA, D. B.; BRUNO, A. N.; CALIL, L. N.; CASALI, E. A.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; LENZ, G.; WINK, M. R.; BUFFON, A. Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. **Biochem Cell Biol**, v. 92, n. 2, p. 95-104, Apr 2014.

BECKER, L. V.; ROSA, C. S.; SOUZA VDO, C.; BAGATINI, M. D.; CASALI, E. A.; LEAL, C. A.; DA SILVA, J. C.; MORETTO, M. B.; PINHEIRO FDE, V.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R.; LEAL, D. B. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Biochem**, v. 43, n. 13-14, p. 1096-100, Sep 2010.

BELHOUCHE, Z.; SAUTOUR, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Steroidal saponins from the roots of Smilax aspera subsp. mauritanica. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 56, n. 9, p. 1324-7, Sep 2008.

BERMUDES, D.; PECK, K.R.; AFIFI, M.A.; BECKERS, C.J., JOINER, K.A. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii. **J Biol Chem**, v. 269, n.46, p. 29252-60, Nov 1994.

BEUKERS, M. W.; KERKHOF, C. J.; VAN RHEE, M. A.; ARDANUY, U.; GURGEL, C.; WIDJAJA, H.; NICKEL, P.; AP, I. J.; SOUDIEN, W. Suramin analogs, divalent cations and ATP gamma S as inhibitors of ecto-ATPase. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 351, n. 5, p. 523-8, May 1995.

BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? **Trends Parasitol**, v. 25, n. 6, p. 256-60, Jun 2009.

BIESKI, I. G. C.; LEONTI, M.; ARNASON, J. T.; FERRIER, J.; RAPINSKI, M.; VIOLANTE, I. M. P.; BALOGUN, S. O.; PEREIRA, J. F. C. A.; FIGUEIREDO, R. D. C. F.; LOPES, C. R. A. S.; DA SILVA, D. R.; PACINI, A.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. D. O. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal

Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 9/15/2015.

BISAGGIO, D. F.; PERES-SAMPAIO, C. E.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SOUTO-PADRON, T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. **Parasitol Res**, v. 91, n. 4, p. 273-82, Oct 2003.

BOBALOVA, J.; MUTAFOVA-YAMBOLIEVA, V. N. Co-release of endogenous ATP and noradrenaline from guinea-pig mesenteric veins exceeds co-release from mesenteric arteries. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 28, n. 5-6, p. 397-401, May-Jun 2001.

BONAN, C. D. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 739-50, Sep 2012.

BONAN, C. D.; AMARAL, O. B.; ROCKENBACH, I. C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A. M.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J. J. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. **Neurochem Res**, v. 25, n. 6, p. 775-9, Jun 2000.

BRACCO, P. A.; BERTONI, A. P.; WINK, M. R. NTPDase5/PCPH as a new target in highly aggressive tumors: a systematic review. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 123010, 2014.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 11/20/ 2008.

BRUNSCHWEIGER, A.; IQBAL, J.; UMBACH, F.; SCHEIFF, A. B.; MUNKONDA, M. N.; SEVIGNY, J.; KNOWLES, A. F.; MULLER, C. E. Selective nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) inhibitors: nucleotide mimetics derived from uridine-5'-carboxamide. **J Med Chem**, v. 51, n. 15, p. 4518-28, Aug 14 2008.

BUFFON, A.; RIBEIRO, V. B.; WINK, M. R.; CASALI, E. A.; SARKIS, J. J. Nucleotide metabolizing ecto-enzymes in Walker 256 tumor cells: molecular identification, kinetic characterization and biochemical properties. **Life Sci**, v. 80, n. 10, p. 950-8, Feb 13 2007.

BULTMANN, R.; WITTENBURG, H.; PAUSE, B.; KURZ, G.; NICKEL, P.; STARKE, K. P2-purinoceptor antagonists: III. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to suramin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 354, n. 4, p. 498-504, Oct 1996.

CASTRO-BORGES, W.; SIMPSON, D. M.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; BEYNON, R. J.; WILSON, R. A. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1519-33, Aug 24 2011.

CERCHIARO, G.; AQUILANO, K.; FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R.; FERREIRA, A. M. Isatin-Schiff base copper(II) complexes and their influence on cellular viability. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 7, p. 1433-40, Jul 2005.

COGNATO, G. P.; VUADEN, F. C.; SAVIO, L. E.; BELLAVER, B.; CASALI, E.; BOGO, M. R.; SOUZA, D. O.; SEVIGNY, J.; BONAN, C. D. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases role in the pathophysiology of cognitive impairment induced by seizure in early age. **Neuroscience**, v. 180, p. 191-200, Apr 28 2011.

COIMBRA, E. S.; GONCALVES-DA-COSTA, S. C.; CORTE-REAL, S.; DE FREITAS, F. G.; DURAO, A. C.; SOUZA, C. S.; SILVA-SANTOS, M. I.; VASCONCELOS, E. G. Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, v. 124, n. Pt 2, p. 137-43, Feb 2002.

COIMBRA, E. S.; GONCALVES-DA-COSTA, S. C.; COSTA, B. L.; GIAROLA, N. L.; REZENDE-SOARES, F. A.; FESSEL, M. R.; FERREIRA, A. P.; SOUZA, C. S.; ABREU-SILVA, A. L.; VASCONCELOS, E. G. A *Leishmania* (L.) *amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. **Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 327-35, Mar 2008.

CRACK, B. E.; BEUKERS, M. W.; MCKECHNIE, K. C.; IJZERMAN, A. P.; LEFF, P. Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P2X-purinoceptor ligands. **Br J Pharmacol**, v. 113, n. 4, p. 1432-8, Dec 1994.

DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; ALI, Y. B.; SKELLY, P. J. Schistosome tegumental ecto-apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. **PeerJ**, v. 2, p. e316, 2014.

DE CASTRO, C. C. B.; COSTA, P. S.; LAKTIN, G. T.; DE CARVALHO, P. H. D.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; PINTO, P. L. S.; COURI, M. R. C.; PINTO, P. D. F.; DA SILVA FILHO, A. A. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 921-928, 9/15/ 2015.

DE SOUZA, V. C.; NUNES, V. S.; VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; CAPRILES, P. V. S. Z. Structural Comparative Analysis of Secreted NTPDase Models of *Schistosoma mansoni* and *Homo sapiens*. In: CAMPOS, S. (Ed.). **Advances in Bioinformatics and Computational Biology: 9th Brazilian Symposium on Bioinformatics, BSB 2014, Belo Horizonte, Brazil, October 28-30, 2014, Proceedings**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p.91-98. ISBN 978-3-319-12418-6.

DELGADO-PELAYO, R.; HORNERO-MENDEZ, D. Identification and quantitative analysis of carotenoids and their esters from sarsaparilla (*Smilax aspera* L.) berries. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 33, p. 8225-32, Aug 22 2012.

DOAN, N. T.; PAULSEN, E. S.; SEHGAL, P.; MOLLER, J. V.; NISSEN, P.; DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T.; DIONNE, C. A.; CHRISTENSEN, S. B. Targeting thapsigargin towards tumors. **Steroids**, v. 97, p. 2-7, May 2015.

DOS SANTOS JAQUES, J. A.; BECKER, L. V.; SOUZA VDO, C.; LEAL, C. A.; BERTOLDO, T. M.; DE VARGAS PINHEIRO, K.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R.; LEAL, D. B. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochem Funct**, v. 31, n. 5, p. 395-9, Jul 2013.

DOS SANTOS JR, J. G.; BLANCO, M. M.; DO MONTE, F. H. M.; RUSSI, M.; LANZIOTTI, V. M. N. B.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of Equisetum arvense. **Fitoterapia**, v. 76, n. 6, p. 508-513, 9// 2005.

DWYER, K. M.; DEAGLIO, S.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; STROM, T. B.; ROBSON, S. C. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 1-2, p. 171-80, Mar 2007.

FANG, M.; SHEN, Z.; HUANG, S.; ZHAO, L.; CHEN, S.; MAK, T. W.; WANG, X. The ER UDPase ENTPD5 promotes protein N-glycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 711-24, Nov 24 2010.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L.; COELHO, P. M.; VASCONCELOS, E. G. ATP diphosphohydrolase from Schistosoma mansoni egg: characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, v. 129, n. Pt 1, p. 51-7, Jul 2004.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L.; COELHO, P. M.; VASCONCELOS, E. G. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian ATP diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 359-63, Sep 2006.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O.; GOMES, J. A.; ENK, M. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COELHO, P. M.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 943-53, Jul 2008.

FENG, L.; SUN, X.; CSIZMADIA, E.; HAN, L.; BIAN, S.; MURAKAMI, T.; WANG, X.; ROBSON, S. C.; WU, Y. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. **Neoplasia**, v. 13, n. 3, p. 206-16, Mar 2011.

FERREIRA, A. C. F.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Thyroid peroxidase inhibition by Kalanchoe brasiliensis aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 5, p. 417-421, 5// 2000.

FIETTO, J.L.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316 n. 2, p. 454-60, Abr 2004.

GARCIA, D.; GARCIA-CELA, E.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1378-1384, 8// 2011.

GENDRON, F. P.; HALBFINGER, E.; FISCHER, B.; DUVAL, M.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; BEAUDOIN, A. R. Novel inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations. **J Med Chem**, v. 43, n. 11, p. 2239-47, Jun 1 2000.

GENDRON, F. P.; KRUGH, O. B. B.; KONG, Q.; WEISMAN, G. A.; BEAUDOIN, A. R. Purine Signaling and Potential New Therapeutic Approach: Possible Outcomes of NTPDase Inhibition. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 3, p. 229-245, // 2002.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 218, n. 3, p. 916-23, Jan 26 1996.

HICKS-BERGER, C. A.; CHADWICK, B. P.; FRISCHAUF, A. M.; KIRLEY, T. L. Expression and characterization of soluble and membrane-bound human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (CD39L2). **J Biol Chem**, v. 275, n. 44, p. 34041-5, Nov 3 2000.

HOURLANI, S. M.; CHOWN, J. A. The effects of some possible inhibitors of ectonucleotidases on the breakdown and pharmacological effects of ATP in the guinea-pig urinary bladder. **Gen Pharmacol**, v. 20, n. 4, p. 413-6, 1989.

IBRAHIM, T.; CUNHA, J. M. T.; MADI, K.; DA FONSECA, L. M. B.; COSTA, S. S.; GONÇALVES KOATZ, V. L. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 7, p. 875-883, 6// 2002.

IGUAL, M. O.; MARTUCCI, M. E. P.; DA COSTA, F. B.; GOBBO-NETO, L. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 94-97, 12// 2013.

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. [Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, *Pariparoba*]. **Yakugaku Zasshi**, v. 122, n. 4, p. 291-4, Apr 2002.

ISRAELSEN, W. J.; VANDER HEIDEN, M. G. ATP consumption promotes cancer metabolism. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 669-71, Nov 24 2010.

IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; BATSALOVA, T.; DZHAMBASOV, B.; KOSTOVA, I. New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 282-287, 3// 2011.

JACKSON, S. W.; HOSHI, T.; WU, Y.; SUN, X.; ENJOYOJI, K.; CSZIMADIA, E.; SUNDBERG, C.; ROBSON, S. C. Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. **Am J Pathol**, v. 171, n. 4, p. 1395-404, Oct 2007.

JO, Y. H.; SCHLICHTER, R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 241-5, Mar 1999.

JORGE, M. P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A. L. T. G.; FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, R. A. F.; DE OLIVEIRA SOUSA, I. M.; FOGGIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 361-366, 8/13/ 2008.

KETTLUN, A. M.; ESPINOSA, V.; GARCIA, L.; VALENZUELA, M. A. Potato tuber isoapyrases: substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 975-82, May 2005.

KETTLUN, A. M.; URIBE, L.; CALVO, V.; SILVA, S.; RIVERA, J.; MANCILLA, M.; ANTONIETA, M.; VALENZUELA; TRAVERSO-CORI, A. Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 551-558, // 1982.

KETTLUN, A. M.; URRRA, R.; LEYTON, M.; VALENZUELA, M. A.; MANCILLA, M.; TRAVERSO-CORI, A. Purification and characterization of two isoapyrases from *Solanum tuberosum* var. *ultimus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3691-3696, // 1992.

KNOWLES, A. F. The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. **Purinergic Signal**, v. 7, n. 1, p. 21-45, Mar 2011.

KURIAKOSE, S.; UZONNA, J. E. Diminazene aceturate (Berenil), a new use for an old compound? **Int Immunopharmacol**, v. 21, n. 2, p. 342-5, Aug 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LECKA, J.; FAUSTHER, M.; KUNZLI, B.; SEVIGNY, J. Ticlopidine in its prodrug form is a selective inhibitor of human NTPDase1. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 547480, 2014.

LECKA, J.; GILLERMAN, I.; FAUSTHER, M.; SALEM, M.; MUNKONDA, M. N.; BROSSEAU, J. P.; CADOT, C.; MARTIN-SATUE, M.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; ROUSSEAU, E.; POIRIER, D.; KUNZLI, B.; FISCHER, B.; SEVIGNY, J. 8-BuS-ATP

derivatives as specific NTPDase1 inhibitors. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 1, p. 179-96, May 2013.

LECKA, J.; RANA, M. S.; SEVIGNY, J. Inhibition of vascular ectonucleotidase activities by the pro-drugs ticlopidine and clopidogrel favours platelet aggregation. **Br J Pharmacol**, v. 161, n. 5, p. 1150-60, Nov 2010.

LEVANO-GARCIA, J.; MORTARA, R. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Characterization of *Schistosoma mansoni* ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 352, n. 2, p. 384-9, Jan 12 2007.

LEVESQUE, S. A.; LAVOIE, E. G.; LECKA, J.; BIGONNESSE, F.; SEVIGNY, J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 1, p. 141-50, Sep 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LYTTON, J.; WESTLIN, M.; HANLEY, M. R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. **J Biol Chem**, v. 266, n. 26, p. 17067-71, Sep 15 1991.

MAFIOLETI, L.; DA SILVA JUNIOR, I. F.; COLODEL, E. M.; FLACH, A.; MARTINS, D. T. D. O. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 576-582, 11/25/ 2013.

MAIA, A. C.; DETONI, M. L.; PORCINO, G. N.; SOARES, T. V.; DO NASCIMENTO GUSMAO, M. A.; FESSEL, M. R.; MARQUES, M. J.; SOUZA, M. A.; COELHO, P. M.; ESTANISLAU, J. A.; DA COSTA ROCHA, M. O.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; FARIAPINTO, P.; VASCONCELOS, E. G. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Dev Comp Immunol**, v. 35, n. 10, p. 1059-67, Oct 2011.

MALISZEWSKI, C. R.; DELESPESE, G. J.; SCHOENBORN, M. A.; ARMITAGE, R. J.; FANSLOW, W. C.; NAKAJIMA, T.; BAKER, E.; SUTHERLAND, G. R.; POINDEXTER, K.; BIRKS, C.; ET AL. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. **J Immunol**, v. 153, n. 8, p. 3574-83, Oct 15 1994.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 437-473, 2001.

MARTINS, S. M.; TORRES, C. R.; FERREIRA, S. T. Inhibition of the ecto-ATP diphosphohydrolase of *Schistosoma mansoni* by thapsigargin. **Biosci Rep**, v. 20, n. 5, p. 369-81, Oct 2000.

MENDES, R. G.; GUSMAO, M. A.; MAIA, A. C.; DETONI MDE, L.; PORCINO, G. N.; SOARES, T. V.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E. G. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalisation of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 808-13, Nov 2011.

MICHEL, A. F. R. M.; MELO, M. M.; CAMPOS, P. P.; OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, F. A. S.; CASSALI, G. D.; FERRAZ, V. P.; COTA, B. B.; ANDRADE, S. P.; SOUZA-FAGUNDES, E. M. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 29-38, 5/13/ 2015.

MULLER, C. E.; IQBAL, J.; BAQI, Y.; ZIMMERMANN, H.; ROLLICH, A.; STEPHAN, H. Polyoxometalates--a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, n. 23, p. 5943-7, Dec 1 2006.

NAGAI, T.; MYODA, T.; NAGASHIMA, T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 389-394, 7// 2005.

NIU, P.-G.; ZHANG, Y.-X.; SHI, D.-H.; LIU, Y.; CHEN, Y.-Y.; DENG, J. Cardamonin Inhibits Metastasis of Lewis Lung Carcinoma Cells by Decreasing mTOR Activity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127778, 2015.

NORIEGA, P.; ROPKE, C. D.; CONSIGLIERI, V. O.; TAQUEDA, M. E. S.; TAVARES, L. C.; WASICKY, A.; BACCHI, E. M.; BARROS, S. B. M. Optimization of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel topical formulations using experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 149-159, 4/2/ 2008.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-137, 2// 2007.

NUNES, V. S.; VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; BORGES, C. C. H.; CAPRILES, P. V. S. Z. Structural Comparative Analysis of Ecto- NTPDase Models from *S. Mansoni* and *H. Sapiens*. In: HARRISON, R.; LI, Y., *et al* (Ed.). **Bioinformatics Research and Applications**: Springer International Publishing, v.9096, 2015. cap. 21, p.247-259. (Lecture Notes in Computer Science). ISBN 978-3-319-19047-1.

O'KEEFFE, M. G.; THORNE, P. R.; HOUSLEY, G. D.; ROBSON, S. C.; VLAJKOVIC, S. M. Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. **Histochem Cell Biol**, v. 133, n. 4, p. 425-36, Apr 2010.

ONISZCZUK, A.; PODGÓRSKI, R.; ONISZCZUK, T.; ŻUKIEWICZ-SOBCZAK, W.; NOWAK, R.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Extraction methods for the determination of

phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 377-381, 11// 2014.

OSSES, J. P.; BATASSINI, C.; POCHMANN, D.; BOHMER, A. E.; VUADEN, F. C.; SILVESTRIN, R. B.; OLIVEIRA, A.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R.; SOUZA, D. O.; PORTELA, L. V.; SARKIS, J. J.; MELLO E SOUZA, T. The hydrolysis of striatal adenine- and guanine-based purines in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 36, n. 2, p. 215-22, Feb 2011.

PAEZ, J. G.; RECIO, J. A.; ROUZAUT, A.; NOTARIO, V. Identity between the PCPH proto-oncogene and the CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase gene. **Int J Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1249-54, Dec 2001.

PENIDO, L. O. M.; RESENDE, D. M.; VIANELLO, M. A.; HUMBERTO DA SILVEIRA BORDIN, F.; JACINTO, A. A.; DIAS, W. D.; MONTESANO, M. A.; NELSON, D. L.; MARCOS ZECH COELHO, P.; VASCONCELOS, E. G. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Eur J Pharmacol**, v. 570, n. 1-3, p. 10-7, Sep 10 2007.

QUINN, M. J.; FITZGERALD, D. J. Ticlopidine and Clopidogrel. **Circulation**, v. 100, n. 15, p. 1667-1672, October 12, 1999 1999.

REZENDE-SOARES, F. A.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, M. J.; PORCINO, G. N.; GIAROLA, N. L.; COSTA, B. L.; TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA, M. A.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, E. G. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and identification of an antigenic and catalytically active isoform. **Parasitology**, v. 137, n. 5, p. 773-83, Apr 2010.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 409-30, Jun 2006.

RODRIGUES, E. R.; NOGUEIRA, N. G. P.; ZOCOLO, G. J.; LEITE, F. S.; JANUARIO, A. H.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; FACHIN, A. L.; DE MARCHI, M. R. R.; DOS SANTOS, A. G.; PIETRO, R. C. L. R. *Pothomorphe umbellata*: Antifungal activity against strains of *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 3, p. 265-269, 9// 2012.

ROMANEZI DA SILVEIRA, R.; FOGLIO, M. A.; GONTIJO, J. A. R. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 127-131, // 2003.

ROPKE, C. D.; DA SILVA, V. V.; KERA, C. Z.; MIRANDA, D. V.; DE ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. In Vitro and In Vivo Inhibition of Skin Matrix

Metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* Root Extract. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 2, p. 439-442, 2006.

ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C.; DA SILVA, V. V.; MICHALANY, N. S.; DE MORAES BARROS, S. B. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clin Exp Dermatol**, v. 30, n. 3, p. 272-6, May 2005.

ROSZEK, K.; CZARNECKA, J. Is Ecto-nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (NTPDase)-based Therapy of Central Nervous System Disorders Possible? **Mini Rev Med Chem**, v. 15, n. 1, p. 5-20, 2015.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 5, p. 411-5, May 2008.

SANSOM, F. M.; NEWTON, H. J.; CRISIS, S.; CIANCIOTTO, N. P.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J.; HARTLAND, E. L. A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 1922-35, Aug 2007.

SANSOM, F. M.; RIEDMAIER, P.; NEWTON, H. J.; DUNSTONE, M. A.; MULLER, C. E.; STEPHAN, H.; BYRES, E.; BEDDOE, T.; ROSSJOHN, J.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J.; ROBSON, S. C.; HARTLAND, E. L. Enzymatic properties of an ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase from *Legionella pneumophila*: substrate specificity and requirement for virulence. **J Biol Chem**, v. 283, n. 19, p. 12909-18, May 9 2008.

SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V. M.; BONAN, C. D.; WYSE, A. T. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **Biofactors**, v. 31, n. 2, p. 77-98, 2007.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758-777, 10/6/ 2014.

SPANEVELLO, R. M.; MAZZANTI, C. M.; SCHMATZ, R.; THOME, G.; BAGATINI, M.; CORREA, M.; ROSA, C.; STEFANELLO, N.; BELLE, L. P.; MORETTO, M. B.; OLIVEIRA, L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. The activity and expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 3-4, p. 210-4, Feb 2010.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **J Biol Chem**, v. 202, n. 2, p. 675-85, Jun 1953.

TIAN-SHUNG, W.; AMOORU G, D.; CHUNG-REN, S.; PING-CHUNG, K. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochi* species. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in**

**Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 32, Part L, 2005. p.855-1018. ISBN 1572-5995.

TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 681-723, 4/19/ 2013.

TRAVERSO-CORI, A.; CHAIMOVICH, H.; CORI, O. KINETIC STUDIES AND PROPERTIES OF POTATO APYRASE. **Arch Biochem Biophys**, v. 109, p. 173-84, Jan 1965.

TRAVERSO-CORI, A.; TRAVERSO, S.; REYES, H. Different molecular forms of potato apyrase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 137, n. 1, p. 133-142, 1970/03/01 1970.

VALENZUELA, M. A.; DEL CAMPO, G.; MARIN, E.; TRAVERSO-CORI, A. Effects of protein-modifying reagents on an isoenzyme of potato apyrase. **Biochem J**, v. 133, n. 4, p. 755-63, Aug 1973.

VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; PENIDO, M. L. O.; COSTA, S. C. G.; COELHO, P. M. Z. Potato Apyrase: A New Tool for Parasitic Disease Research. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 9, 2009.

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 36, p. 22139-45, Sep 6 1996.

VASCONCELOS, E. G.; NASCIMENTO, P. S.; MEIRELLES, M. N.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; FERREIRA, S. T. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, n. 2, p. 205-14, Apr 1993.

VISOVATTI, S. H.; HYMAN, M. C.; BOUIS, D.; NEUBIG, R.; MCLAUGHLIN, V. V.; PINSKY, D. J. Increased CD39 nucleotidase activity on microparticles from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40829, 2012.

VIVIAN, J. P.; RIEDMAIER, P.; GE, H.; LE NOURS, J.; SANSOM, F. M.; WILCE, M. C.; BYRES, E.; DIAS, M.; SCHMIDBERGER, J. W.; COWAN, P. J.; D'APICE, A. J.; HARTLAND, E. L.; ROSSJOHN, J.; BEDDOE, T. Crystal structure of a *Legionella pneumophila* ecto -triphosphate diphosphohydrolase, a structural and functional homolog of the eukaryotic NTPDases. **Structure**, v. 18, n. 2, p. 228-38, Feb 10 2010.

VOLONTE, C.; AMADIO, S.; CAVALIERE, F.; D'AMBROSI, N.; VACCA, F.; BERNARDI, G. Extracellular ATP and neurodegeneration. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 2, n. 6, p. 403-12, Dec 2003.

WALL, M. J.; WIGMORE, G.; LOPATAR, J.; FRENGUELLI, B. G.; DALE, N. The novel NTPDase inhibitor sodium polyoxotungstate (POM-1) inhibits ATP breakdown but also blocks central synaptic transmission, an action independent of NTPDase inhibition. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 7, p. 1251-8, Dec 2008.

YEUNG, G.; MULERO, J. J.; MCGOWAN, D. W.; BAJWA, S. S.; FORD, J. E. CD39L2, a gene encoding a human nucleoside diphosphatase, predominantly expressed in the heart. **Biochemistry**, v. 39, n. 42, p. 12916-23, Oct 24 2000.

YOUNG, A.; MITTAL, D.; STAGG, J.; SMYTH, M. J. Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches. **Cancer Discov**, v. 4, n. 8, p. 879-88, Aug 2014.

ZHANG, M.; ZHONG, H.; VOLLMER, C.; NURSE, C. A. Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. **J Physiol**, v. 525 Pt 1, p. 143-58, May 15 2000.

ZHENG, C.; LEI, C.; CHEN, Z.; ZHENG, S.; YANG, H.; QIU, Y.; LEI, B. Topical administration of diminazene aceturate decreases inflammation in endotoxin-induced uveitis. **Mol Vis**, v. 21, p. 403-11, 2015.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4-5, p. 299-309, 2000/11/01 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**, v. 8, n. 3, p. 437-502, Sep 2012.

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA (PROPP)  
Rua José Lourenço Kelmer, s/n – Campus Universitário  
Bairro São Pedro – CEP: 36036-900 – Juiz de Fora – MG  
(32) 2102-3785/ propg@ufjf.edu.br

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO  
DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

Nº PROPP: 89.18072016.9-M

Nº PPG: PPGCF 2016/01

Ata da sessão pública referente à defesa da dissertação, intitulada Caracterização da ATP difosfohidrolase de *Solanum tuberosum* como ferramenta biotecnológica no estudo de doenças relacionadas às NTPDases de *Homo sapiens*, para fins de obtenção do título de mestra em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais Bioativos, pelo(a) discente PRISCILA SILVA GRIJÓ FARANI (matrícula: 102330062), sob orientação do(a) Prof.(<sup>a</sup>) Dr.(<sup>a</sup>) Priscila de Faria Pinto .

Aos 18 dias do mês de julho do ano de 2016, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), reuniu-se a Banca Examinadora da Dissertação em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação conforme a seguinte composição:

Prof.(a) Dr.(a) Priscila de Faria Pinto - Orientador(a) e Presidente da Banca  
Prof.(a) Dr.(a) Theo Luiz Ferraz de Souza - Membro titular externo  
Prof.(a) Dr.(a) Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt - Membro titular interno  
Prof.(a) Dr.(a) Octacílio da Cruz Moreira - Suplente externo  
Prof.(a) Dr.(a) Ademar Alves da Silva Filho - Suplente interno  
-- -  
-- -  
-- -  
-- -  
-- -

Tendo o(a) senhor(a) Presidente declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o(a) discente procedeu a apresentação de sua dissertação e foi submetido(a) à arguição pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

- APROVADO (Conceito A).**
- APROVADO CONDICIONALMENTE (Conceito B)**, mediante o atendimento das alterações sugeridas pela Banca Examinadora, constantes do parecer em anexo.
- REPROVADO (Conceito C)**, conforme parecer circunstanciado, em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora.

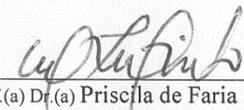
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA (PROPP)

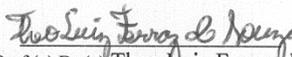
Rua José Lourenço Kelmer, s/n – Campus Universitário  
Bairro São Pedro – CEP: 36036-900 – Juiz de Fora – MG  
(32) 2102-3785/ propp@ufjf.edu.br

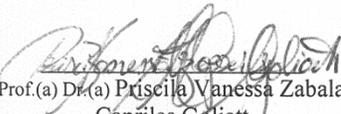
Observações da Banca Examinadora (caso inexista, anular o campo):

A banca sugere que o título da dissertação seja alterado para "Caracterização da ATP de *Solanum tuberosum* como ferramenta biotecnológica no estudo de NTPDases."

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

  
Prof.(a) Dr.(a) Priscila de Faria Pinto

  
Prof.(a) Dr.(a) Theo Luiz Ferraz de Souza

  
Prof.(a) Dr.(a) Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt

Prof.(a) Dr.(a) Octacílio da Cruz  
Moreira

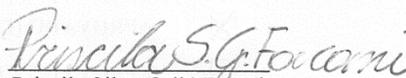
Prof.(a) Dr.(a) Ademar Alves da Silva  
Filho

--

--

--

--

  
Priscila Silva Grijó Focarni  
Discente

INFORMAÇÕES:

- Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Programa de Pós-Graduação, deverá ser tramitada para a PROPP, em Processo de Homologação de Dissertação/Tese, dentro do prazo regulamentar de 90 dias a partir da data da defesa. Após a entrega dos dois exemplares definitivos, o processo deverá receber homologação e, então, ser encaminhado à CDARA.
- Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente.
- Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenadoria de Assuntos e Registros Acadêmicos da UFJF (CDARA) atestando que o processo de confecção e registro do diploma está em andamento.