

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

CIBELI MAY ARÉVALOS VILLALBA

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS: INIBIDOR DE ALFA-AMILASE DE
Secale cereale, GTPase YchF E ENOLASE DE *Trypanosoma cruzi*

PONTA GROSSA
2012

CIBELI MAY ARÉVALOS VILLALBA

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS: INIBIDOR DE ALFA-AMILASE DE
Secale cereale, GTPase YchF E ENOLASE DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada para obtenção
do título de mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de
Química Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek

PONTA GROSSA
2012

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

V714e Villalba, Cibeli May Arévalos
Estudos estruturais de proteínas: inibidor de alfa-amilase de *Secale cereale*, GTPase YchF e enolase de *Trypanosoma cruzi* / Cibeli May Arévalos Villalba. Ponta Grossa, 2012.
121 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) –
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. Jorge Iulek.

1. Estrutura de proteína. 2. Inibidor de alfa-amilase. 3. Enolase. 4
GTPase (YchF). I. Iulek, Jorge. II. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Química Aplicada. III.T

CDD: 572.67

TERMO DE APROVAÇÃO

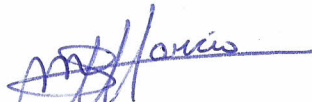
CIBELI MAY ARÉVALOS VILLALBA

"ESTUDOS ESTRUTURAIS DE PROTEÍNAS: INIBIDOR DE ALFA-AMILASE DE *Secale cereale*, GTPase YchF E ENOLASE DE *Trypanosoma cruzi*."

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

Orientador :


Prof. Dr. Jorge Iulek
UEPG/PR


Prof. Dr. Márcio Silva
UTFPR – Ponta Grossa/PR


Profa. Dra. Valma Martins Barbosa
UTFPR - Curitiba/PR

Ponta Grossa, 12 de março de 2012.

Ao meu marido Ramón Damián e a
meu filho Victor Rafael dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, conquistas e por sempre estar presente na minha vida.

Ao meu filho Victor Rafael, por ser a luz da minha vida, meu presentinho de Deus e me dar forças para continuar apesar das dificuldades.

Ao meu marido Ramón Damián, por me amar, compreender minha ausência, me apoiar e ajudar em todos os momentos.

A minha mãe Seli e ao pai do meu marido Victor Zacarias, por sempre orarem por mim.

A Samara, pela amizade e ajuda.

As minhas irmãs Eliane e Jaque, e colegas de laboratório por sempre torcerem por mim.

Ao Prof. Dr. Jorge Iulek, pela contribuição de seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

A Embrapa Trigo de Passo Fundo - RS, por fornecer as sementes de centeio (amostras) que possibilitaram o desenvolvimento do trabalho, principalmente ao Dr. Luiz Eichelberger.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso da Fundação Osvaldo Cruz em Curitiba - PR (IBMP) por fornecer os clones das enzimas enolase e GTPase YchF.

Ao INBEQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas) / CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

*"Envelhecer é como escalar uma
grande montanha: enquanto se sobe
as forças diminuem, mas o olhar é mais
livre, a visão mais ampla e serena."
(Ingmar Bergman)*

RESUMO

As proteínas são as biomoléculas mais abundantes nos seres vivos, estando presentes em todas as partes de uma célula. Elas possuem diferentes funções no organismo; seu estudo estrutural é importante, pois traz maior conhecimento sobre suas funções e possibilita entender como interagem entre elas e com outras moléculas. A estrutura de proteínas pode ser estudada experimentalmente principalmente por meio da técnica de difração de raios X e computacionalmente por meio da modelagem por homologia. Sendo assim, realizaram-se neste trabalho estudos estruturais com o inibidor de alfa-amilase do centeio (*Secale cereale*), que inibem a atividade amilásica e que podem ser utilizados em tratamento de *Diabetes mellitus*, obesidade, controle de pragas, entre outros usos. Por meio de cromatografias, puderam-se separar dois diferentes inibidores, denominados A2 e B2, que foram cristalizados, mas não apresentaram mínima qualidade de difração de raios X. Assim, realizou-se um estudo estrutural com dados de difração obtidos anteriormente para um cristal geminado, dada a possibilidade atual dos programas de refinamento de tratar este problema. A estrutura foi refinada e comparada com o inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo. Em sequência, estudos estruturais também foram realizados para a proteína YchF da família das GTPases e para a enolase de *Trypanosoma cruzi*; ambas vêm sendo estudadas com a possibilidade de serem usadas como alvo no tratamento da doença de Chagas. Inicialmente tentou-se expressá-las de maneira heteróloga e purificá-las para a realização de ensaios de cristalização; com o insucesso disto, partiu-se para um trabalho computacional em que se fizeram alinhamentos e modelos por homologia para as duas proteínas. O trabalho computacional foi continuado para a enolase de *Trypanosoma cruzi*, comparando-a com a enolase de *Homo sapiens* para se buscar e planejar inibidores para a primeira, por meio de pesquisa na literatura e em bancos de dados; assim, fez-se a alocação ("docking") destes, obtendo-se energias de ligação mais favoráveis para os substratos, fosfoenolpiruvato (PEP) e 2-fosfoglicerato (PG2), para o inibidor fosfonacetohidroxamato (PAH) e para o composto codificado ZINC25695689 do banco de dados ZINC (ZINC Is Not Commercial). Também, a partir da posição experimental do inibidor PAH (depositada no PDB, código 2PTZ) estimaram-se as energias de interação para as moléculas pesquisadas e planejadas, através do programa de dinâmica molecular AMBER e, aparentemente, a presença de um átomo de cloro convenientemente ligado ao inibidor poderia promover melhoria da energia de interação.

Palavras-chave: Estruturas de proteína. Inibidor de alfa-amilase. Enolase. GTPase (YchF). *Trypanosoma cruzi*. Desenho racional de drogas terapêuticas.

ABSTRACT

Proteins are the most abundant biomolecules in living organisms; they are present in all parts of a cell. They have different functions; their structural study is important because it brings greater insight into its functions and allows us to understand how they interact to each other and with the other molecules. Protein structures can be studied experimentally especially by the X-ray diffraction technique and computationally by homology modeling. Thus, in this work, structural studies were made with the alpha-amylase inhibitor from rye (*Secale cereale*), which inhibits the activity of amylase and then can be used in the treatment of *Diabetes mellitus*, obesity, pest control, amongst other applications. Through chromatographies, two different inhibitors could be separated, namely A2 and B2, which were crystallized, but did not show a minimum X-ray diffraction quality. Thus, a structural study was performed with data from a twinned crystal previously obtained, yet current refinement programs can now deal with such data. The structure was refined and compared with the alpha-amylase inhibitor 0.19 from wheat. Then, structural studies were also performed for the YchF GTPase and enolase from *Trypanosoma cruzi*; both have been studied with the possibility of being used as a target in the treatment of Chagas' disease. Initially, trials to express heterologously and to purify them for crystallization trials were performed; yet those were unsuccessful, a computational work was pursued, in which alignments and homology modelling for both proteins were made. The computational work was continued for *Trypanosoma cruzi* enolase, in which comparisons with the *Homo sapiens* enolase to seek and plan inhibitors for the former, through literature and data bank searches, were made; thus, docking of these was performed, which pointed more favorable binding energies for the substrates, phosphoenolpyruvate (PEP) and 2-phosphoglycerate (PG2), for the inhibitor phosphonacetohydroxamate (PAH) and for the compound coded ZINC25695689 from the ZINC (ZINC Is Not Commercial) data bank. Also, from the experimental position of the PAH inhibitor (deposited in the PDB, code 2PTZ), the interaction energies for these searched and planned molecules were estimated, through the AMBER molecular dynamics program, and, apparently, the presence of a chlorine atom conveniently bound to the inhibitor could promote an improvement of the interaction energy.

Keywords: Protein structures. Alpha-amylase inhibitor. Enolase. GTPase (YchF). *Trypanosoma cruzi*. Rational design of therapeutic drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Ligação peptídica	17
Figura 2	- Representação dos diferentes níveis de organização estrutural protéica da molécula de hemoglobina	18
Figura 3	- a) Proteína protease de HIV e b) Viracept	19
Figura 4	- Componentes da estrutura do amido. a) estrutura química da amilose b) amilopectina	20
Figura 5	- a) Broca do feijão mexicano <i>Zabrotes subfasciatus</i> e b) bicudo do algodoeiro <i>Anthonomus grandis</i>	21
Figura 6	- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 7	- Estrutura de drogas usadas para o tratamento da doença de Chagas	26
Figura 8	- Eletroforese em gel.....	33
Figura 9	- Absorção dependente do pH de Coomassie Brilliant Blue G 250...	33
Figura 10	- Montagem para cristalização de proteína por difusão de vapor da gota suspensa	35
Figura 11	- Difração de raios X por um cristal e Lei de Bragg	36
Figura 12	- Alocação de um ligante na proteína, formando um complexo	43
Figura 13	- Método direto	45
Figura 14	- Método de divisão do cálculo em um ciclo termodinâmico	45
Figura 15	- Conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio realizado duas vezes para o conjunto A2.....	56
Figura 16	- Conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio realizado para o conjunto A2.....	56
Figura 17	- Conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio realizado para o conjunto B2.....	57
Figura 18	- Gel de eletroforese das amostras de proteínas de centeio obtidas após algumas etapas de purificação.....	63
Figura 19	- Eletroforese (método Ornstein-Davis).....	64
Figura 20	- Cromatograma obtido para o precipitado da precipitação fracionada 20-50%, redissolvido em tampão fosfato	65
Figura 21	- Cromatograma obtido para o precipitado da precipitação fracionada 20-50%, redissolvido em tampão fosfato	65
Figura 22	- Cromatograma obtido para o precipitado da precipitação fracionada 20-50%, redissolvido em tampão fosfato	66
Figura 23	- Gel de eletroforese para amostras obtidas após a cromatografia aniônica	67
Figura 24	- Cromatograma obtido para a cromatografia catiônica do conjunto A	68
Figura 25	- Cromatograma obtido para a cromatografia catiônica do conjunto B	68
Figura 26	- Cromatograma obtido para a cromatografia catiônica do conjunto C	69
Figura 27	- Gel de eletroforese para amostras obtidas após a cromatografia catiônica	69
Figura 28	- Precipitados de proteína observados nos poços a) D4 e b) D6	74
Figura 29	- Cristais formados no poço A1 para a segunda placa de cristalização	74

Figura 30	- Cristais formados nos poços a) A1 e b) A2 para a terceira placa de cristalização	75
Figura 31	- Placa obtida para o terceiro ensaio de cristalização realizado	76
Figura 32	- Cristais formados para a fração B2	76
Figura 33	- Alinhamento de sequências de inibidor de alfa-amilase de centeio (<i>Secale cereale</i>) com a sequência do inibidor 0,19 do trigo (1HSS).	79
Figura 34	- Mudança de rotâmetro (a) para um com melhor ajuste na densidade e em conformação mais comum (b)	83
Figura 35	- a) Átomo de oxigênio com interação com a água, invertido com b) átomo de nitrogênio, com interação mais provável com a água	84
Figura 36	- Alinhamento entre as sêquências das proteínas inibidor de alfa-amilase do trigo 0,19 e inibidor de alfa-amilase do centeio, destacando por meio de uma estrela os aminoácidos diferentes.....	84
Figura 37	- Comparação entre as estruturas dos aminoácidos presentes no inibidor de alfa-amilase do trigo 0,19 e inibidor de alfa-amilase do centeio.....	85
Figura 38	- Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio (glicina) mostrando densidades eletrônicas além do carbono alfa	86
Figura 39	- Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio (alanina) mostrando densidades eletrônicas além do carbono alfa	86
Figura 40	- Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio modelado como serina	87
Figura 41	- Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio modelado como cisteína	88
Figura 42	- Modelo de fitas da estrutura do inibidor de alfa-amilase de centeio (<i>Secale cereale</i>)	89
Figura 43	- Gráfico de Ramachandran para o inibidor de alfa-amilase de centeio	89
Figura 44	- Validação da estrutura de inibidor de alfa-amilase de centeio por meio do MOLProbity	90
Figura 45	- Gráfico com valores de RSCC e RSR para cada cadeia da proteína do inibidor de alfa-amilase de centeio refinada	90
Figura 46	- Superposição de um monômero do inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo com um monômero do inibidor de centeio	92
Figura 47	- Gel obtido para as tentativas de expressão da GTPase	93
Figura 48	- a) Primeira cromatografia realizada para a proteína GTPase YchF b) Gel obtido para a cromatografia	94
Figura 49	- a) Segunda cromatografia realizada para a GTPase YchF. b) Gel obtido para a cromatografia	94
Figura 50	- Alinhamento GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
Figura 51	- Modelo obtido por homologia para a GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	96
Figura 52	- Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo da GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	97
Figura 53	- Gel obtido para as tentativas de expressão da enolase	97
Figura 54	- a) Primeira cromatografia realizada para a enolase, b) Gel obtido para a cromatografia	98
Figura 55	- a) Segunda cromatografia obtida para a enolase b) Gel obtido para a cromatografia	99
Figura 56	- a) Terceira cromatografia obtida para a enolase b) Gel obtido	

	para a cromatografia	100
Figura 57	- Alinhamento da enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	102
Figura 58	- Modelo obtido por homologia para a enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	102
Figura 59	- Gráfico de Ramachandran para o modelo da enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	103
Figura 60	- Modelo por homologia construído com MODELLER para a enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i> em sobreposição com a enolase de <i>Homo sapiens</i> (2akz)	104
Figura 61	- Resíduos diferentes entre a estrutura da proteína enolase de <i>Homo sapiens</i> (serina) e a de <i>Trypanosoma cruzi</i> (lisina).....	105
Figura 62	- Ligantes encontrados por meio de busca na literatura e internet ...	105
Figura 63	- Ligantes semelhantes ao PAH encontrados por meio de busca no ZINC	106
Figura 64	- Ligantes sugeridos	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Quantidade de proteína total em cada etapa de purificação	70
TABELA 2	- Atividade inibitória de alfa-amilases pelo método de Bernfeld	71
TABELA 3	- Atividade inibitória de alfa-amilase pelo método de Caraway	72
TABELA 4	- Tabela de purificação para o terceiro lote, inibidor de alfa-amilase de centeio	74
TABELA 5	- Valores de R_{symm} e R_{meas}	77
TABELA 6	- Estudo da faixa de resolução para o grupo de espaço $P3_1$	78
TABELA 7	- Estudo da faixa de resolução para o grupo de espaço $P3_121$	78
TABELA 8	- Comparação das sequências de inibidor de alfa-amilase de centeio (<i>Secale cereale</i>) com a sequência inibidor 0,19 do trigo .	79
TABELA 9	- Grupo de espaço $P3_1$ valores de R_{factor} e R_{free}	80
TABELA 10	- Grupo de espaço $P3_121$ valores de R_{factor} e R_{free}	81
TABELA 11	- Estudo de peso	82
TABELA 12	- Valores obtidos com o teste de modelos para NCS	82
TABELA 13	- Valores obtidos com o teste de modelos para TLS	83
TABELA 14	- Valores globais de RSCC e RSR	91
TABELA 15	- Resumo do processamento dos dados e estatísticas do refinamento.....	91
TABELA 16	- Seleção de ângulos de cadeia laterais muito diferentes	92
TABELA 17	- Proteínas similares à GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
TABELA 18	- Proteínas similares à enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
TABELA 19	- Resultado da Alocação ("Docking") na enolase de <i>Homo sapiens</i>	107
TABELA 20	- Resultado da Alocação ("Docking") na enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	108
TABELA 21	- Energias de ligação estimadas por dinâmica molecular.....	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Angström
AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia
ARP/WARP	Pacote para a construção automatizada do modelo da proteína e refinamento da estrutura
ASH	Amilase salivar humana
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Método do ácido bicinchonínico
BLAST	Ferramenta de comparação de sequências em banco de dados (do inglês Basic Local Alignment search Tool)
BSA	Albumina sérica bovina
CB	Carbono beta
CCP4	Pacote de programas (do inglês Collaborative Computational Project No. 4)
CG	Carbono gama
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Carboximetil
COOT	Programa utilizado para a modelagem de proteínas (do inglês Crystallographic Object-Oriented Toolkit)
DEAE	Dietilaminoetanol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNS	Ácido-3-5-dinitrosalicílico
F_{calc}	Amplitudes calculadas com base no modelo
F_{obs}	Amplitudes de difração experimentalmente observadas
GTP	Guanosina trifosfato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hs	Enolase humana
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo
kDa	QuiloDalton. Unidade de massa molecular. Aproximadamente 1 Dalton equivale a massa do átomo de hidrogênio ($1,66 \times 10^{-24}$ g).
LB	Meio Luria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MIR	Método da Substituição Isomórfica Múltipla
MMM	Marcador de massa molecular
MM/GBSA	Modelo de Born generalizado acrescido do uso da área superficial acessível ao solvente para cálculo das energias de interação (do inglês molecular mechanics / generalized-Born solvent accessible surface area)
MODELLER	Programa para modelagem comparativa de estrutura de proteínas por satisfação de restrições espaciais
MPa	Megapascal
MR	Substituição Molecular
NCS	Simetria não cristalográfica
PAH	Ácido fosfanoacetohidroxâmico
PBS	Solução salina tamponada (do inglês Phosphate buffered saline)
PDB	Banco de dados tridimensionais estruturais de proteínas (Protein Data Bank)
PEP	Ácido 2-fosfoenolpirúvico

PyMOL	Sistema de visualização molecular
Q	Amônio quaternário
REFMAC	Programa de Refinamento Macromolecular
pH	Potencial de hidrogênio iônico
R	Ramificada
R_{factor}	Índice residual
R_{free}	Índice residual livre
RNA	Ácido ribonucléico
RSCC	Valor do coeficiente de correlação do espaço real
RSR	Valor do residual do espaço real
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SP	Sulfopropil
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TLS	Movimento de translação, libração e parafuso
TRAFAC	translação-fator-relacionados (do inglês translation-factor-related)
UI	Unidade Inibitória
XDS	Programa usado para processar imagens obtidas por difração de raios X (do inglês X-ray Detector Software)
ZINC	Banco de dados livre, de compostos disponíveis comercialmente para a trípem virtual (do inglês ZINC Is Not Commercial)
2PG	Ácido 2-fosfoglicérico
2PGA	D-2-fosfoglicerato
ΔG°	Energia livre de ligação
θ	Ângulo theta
ψ	Ângulo psi
ϕ	Ângulo fi
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	16
1.2	ESTADO DA ARTE (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA).....	17
1.2.1	Determinação de Estruturas de Proteínas.....	17
1.2.2	Inibidor de alfa-amilase do centeio (<i>Secale cereale</i>).....	19
1.2.3	Doença de Chagas.....	24
1.2.4	GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.2.5	Enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.3	TÉCNICAS E SEUS FUNDAMENTOS.....	31
1.3.1	Purificação de Proteínas.....	31
1.3.2	Técnicas Analíticas para Proteínas.....	32
1.3.3	Cristalização de Proteínas.....	34
1.3.4	Difração de Raios X na Determinação de Estruturas de Proteínas..	35
1.3.5	Processamento de Imagens de Difração.....	36
1.3.5.1	Indexação e Integração de Intensidades.....	36
1.3.5.2	Escalonamento.....	37
1.3.6	Preparação de Modelo para Substituição Molecular.....	38
1.3.7	Substituição Molecular.....	38
1.3.8	Refinamento.....	38
1.3.9	Validação.....	40
1.3.10	Expressão de proteínas.....	40
1.3.11	Alinhamento de Sequências de Proteínas.....	41
1.3.12	Modelagem por Comparação (Homologia).....	42
1.3.13	Alocação ("Docking").....	42
1.3.14	Dinâmica Molecular.....	43
1.3.15	Estimativa de Energias de Associação (método MM/GBSA)	44
1.4	DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA.....	46
1.4.1	Inibidor de Alfa-amilase do Centeio (<i>Secale cereale</i>).....	46
1.4.2	GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
1.4.3	Enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
2	OBJETIVOS.....	48
2.1	Gerais.....	48
2.2	Específicos.....	48
3	PARTE EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL.....	49
3.1	Materiais.....	49
3.2	Reagentes.....	49
3.3	Equipamentos.....	50
3.4	Base de dados.....	50
3.5	Programas e Sites Acessados.....	50
3.6	Métodos.....	51
3.6.1	Inibidor de Alfa-amilase do Centeio (<i>Secale Cereale</i>).....	51
3.6.1.1	Métodos de Purificação.....	51
3.6.1.1.1	Obtenção do Extrato Inicial.....	51
3.6.1.1.2	Diálise.....	51
3.6.1.1.3	Precipitação Fracionada.....	52
3.6.1.1.4	Cromatografia.....	52
3.6.1.1.4.1	Cromatografia Aniônica.....	52
3.6.1.1.4.2	Cromatografia Catiônica.....	52

3.6.1.2	Métodos Analíticos dos Inibidores de Alfa-amilase do Centeio (<i>Secale Cereale</i>).....	53
3.6.1.2.1	Eletroforese.....	53
3.6.1.2.2	Dosagem Protéica.....	53
3.6.1.2.3	Determinação da Atividade Inibitória da Alfa-amilase.....	54
3.6.1.2.3.1	Método de Bernfeld.....	54
3.6.1.2.3.2	Método de Caraway adaptado.....	55
3.6.1.3	Cristalização de Proteína através de Difusão de Vapor por Gota Suspensa.....	55
3.6.1.4	Difração de Raios X para os Inibidores de Alfa-amilase.....	57
3.6.1.5	Processamento de Imagens de Difração.....	57
3.6.1.5.1	Indexação e Integração de Intensidades.....	57
3.6.1.5.2	Escalonamento.....	57
3.6.1.6	Preparação de Modelos para Substituição Molecular.....	58
3.6.1.7	Substituição Molecular.....	58
3.6.1.8	Refinamento.....	58
3.6.1.9	Validação.....	58
3.6.2	GTPase (YchF) e enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
3.6.2.1	Expressão de Proteínas e Estudos Computacionais.....	58
3.6.2.1.1	Expressão da proteína GTPase YchF.....	59
3.6.2.1.2	Expressão da Proteína Enolase.....	60
3.6.2.2	Alinhamento de Sequências de Aminoácidos de Proteínas para Modelagem por Homologia.....	61
3.6.2.3	Modelagem por Comparação (Homologia) e Validação.....	61
3.6.2.4	Alocação ("Docking").....	61
3.6.2.5	Dinâmica Molecular.....	62
3.6.2.6	Estimativa de Energias de Associação (MM/GBSA).....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1	Inibidor de Alfa-amilase do Centeio (<i>Secale cereale</i>).....	63
4.2	GTPase YchF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	92
4.3	Enolase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	97
5	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	110
	REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

As proteínas são muito importantes, pois possuem diversas funções nos organismos. Elas vêm sendo amplamente estudadas; no tocante às suas estruturas tridimensionais, de forma experimental principalmente através da técnica de difração de raios X, embora a modelagem por homologia venha cada vez mais sendo aprimorada. A difração de raios X permite determinar as estruturas tridimensionais de proteínas experimentalmente, enquanto que a modelagem por homologia o faz computacionalmente, o que leva à aquisição de um maior conhecimento sobre a função da mesma, como elas interagem com outras proteínas e, desta forma, identificam-se sítios de interação alvos e pode-se descobrir mais rapidamente novos inibidores, passo inicial para o desenvolvimento de novas drogas que podem ser usadas no tratamento de várias doenças.

Parte deste trabalho dedicou-se a dar continuidade ao estudo já realizado por Iulek et al., (2000) sobre inibidores de alfa-amilase de centeio. Muitas proteínas encontradas em cereais, tubérculos e outros organismos, são capazes de inibir a atividade amilásica; a importância destes estudos deve-se ao fato de que potencialmente os inibidores podem ser utilizados em tratamento de *Diabetes mellitus*, obesidade, controle de pragas, entre outros. Portanto, a busca de novos inibidores de alfa-amilase e sua caracterização, com a determinação da estrutura tridimensional, é uma contribuição útil no conhecimento destas proteínas e análise de seu potencial de aplicação em tratamento de saúde ou agronomia.

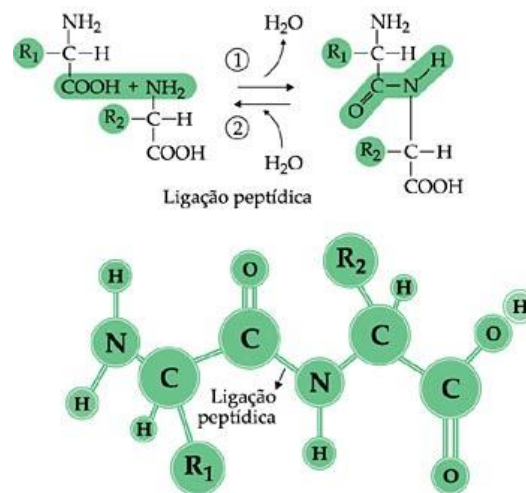
Outras proteínas estudadas foram as YchF da família das GTPases e a enolase; ambas vêm sendo estudadas com a possibilidade de serem usadas como alvo no tratamento da doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É necessário o estudo de moléculas únicas ou altamente diferentes que possam atuar como inibidores dessas enzimas. Por isso, a importância do estudo estrutural destas e como se comportam frente a diferentes ligantes.

1.2 ESTADO DA ARTE (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

1.2.1 Determinação de Estruturas de Proteínas

As proteínas são as biomoléculas mais abundantes nos seres vivos, estando presentes em todas as partes de uma célula. Elas são constituídas por aminoácidos, que possuem ligados ao mesmo átomo de carbono um átomo de hidrogênio, um grupo amina, um grupo carboxílico e uma cadeia lateral “R” (ramificada). Os aminoácidos ligam-se covalentemente através de uma ligação peptídica (figura 1). As proteínas, independentemente de sua função ou espécie de origem, são construídas a partir de um conjunto básico de vinte aminoácidos, arranjados em várias seqüências específicas; além destes aminoácidos principais, há outros aminoácidos que só aparecem em alguns tipos de proteínas (STRYER, 1996).

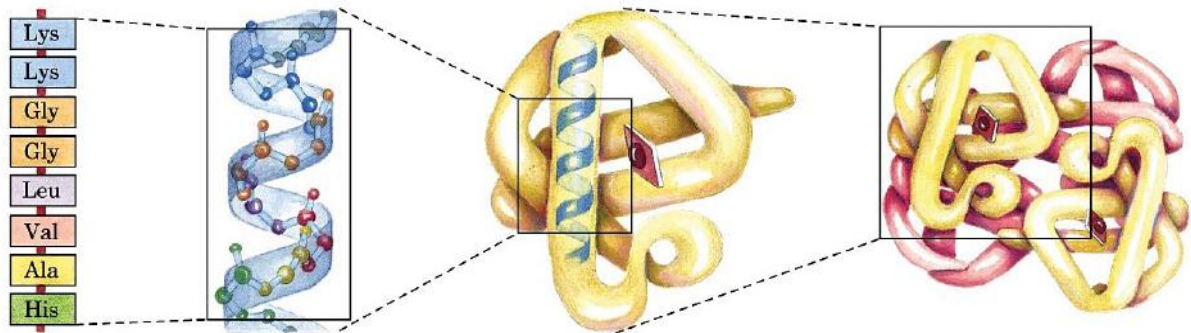
Figura 1: Ligação peptídica, cada aminoácido está ligado a outro por uma ligação peptídica, por meio dessa ligação, o grupo amina de um aminoácido une-se ao grupo carboxila do outro, havendo a liberação de uma molécula de água, os dois aminoácidos unidos formam um dipeptídio. (Ligação..., 2012).



As proteínas podem ter até quatro níveis de organização estrutural, como ilustrado na figura 2: i) estrutura primária (sequência de aminoácidos unidos por meio das ligações peptídicas), ii) estrutura secundária (é dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína), iii) estrutura terciária (resulta do enrolamento da alfa-hélice, da folha pregueada e *loops*, sendo

estabilizada por pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto) e iv) estrutura quaternária (junção de cadeias polipeptídicas) (NELSON; COX, 2002).

Figura 2: Representação dos diferentes níveis (estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária) de organização estrutural protéica da molécula de hemoglobina (NELSON; COX, 2002).



As proteínas possuem diferentes funções no organismo. Por exemplo: função estrutural ou plástica (colágeno, queratina); hormonal (insulina); defesa (fibrinogênio); enzimática, reduzindo a energia de ativação de reações químicas (lipases); condutoras de gases (hemoglobina); comunicação celular; contração muscular (miosina); reserva energética (ovoalbumina), entre outras. As proteínas são as moléculas mais abundantes nas células e correspondem a cerca de 50% ou mais do peso seco do ser humano, tendo funções fundamentais na lógica celular; é devido a essa grande importância qualitativa e quantitativa o motivo pelo qual as proteínas vêm sendo amplamente estudadas (VIEIRA, 2003).

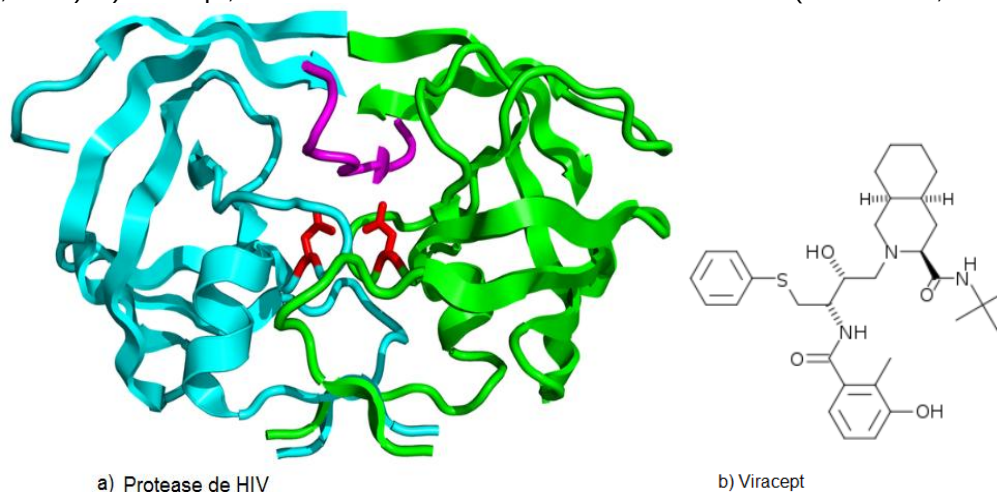
Uma das técnicas que mais tem contribuído com esse estudo é a cristalografia por raios X; através dela, estruturas cristalinas de proteínas começaram a ser determinadas no final da década de 50.

As primeiras estruturas de proteína solucionadas por essa técnica foram a mioglobina e hemoglobina, por John Cowdery Kendrew e Max Ferdinand Perutz, respectivamente, com o objetivo de guiar a síntese de ligantes de hemoglobina para diminuir a falcização ou para melhorar o armazenamento de sangue (KENDREW et al., 1958; PERUTZ et al., 1960). Desde então, muitas outras estruturas de proteínas foram determinadas (CONGREVE et al., 2005).

Dada a solução de estruturas de proteínas, tem-se um maior conhecimento sobre a função da mesma e é possível entender como as proteínas interagem com outras proteínas e moléculas diversas; esta é a forma para que os pesquisadores

identifiquem o sítio de ligação e descubram mais rapidamente novas drogas que podem ser usadas no tratamento de várias doenças (CONGREVE, et al, 2005). Por exemplo, foi através do estudo da protease de HIV (vírus da imunodeficiência humana) que foram desenvolvidos os medicamentos Viracept (figura 3) e Agenerase utilizados no tratamento da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (MILLER et al., 1989). Também, com o estudo cristalográfico da proteína neuraminidase foi elaborada a droga Relenza, utilizada no tratamento da gripe (VARGHESE, 1999).

Figura 3: a) Proteína protease de HIV, estudada para o desenvolvimento de tratamento para AIDS (HIV-1..., 2012). b) Viracept, medicamento utilizado no tratamento da AIDS (Nelfinavir..., 2012).



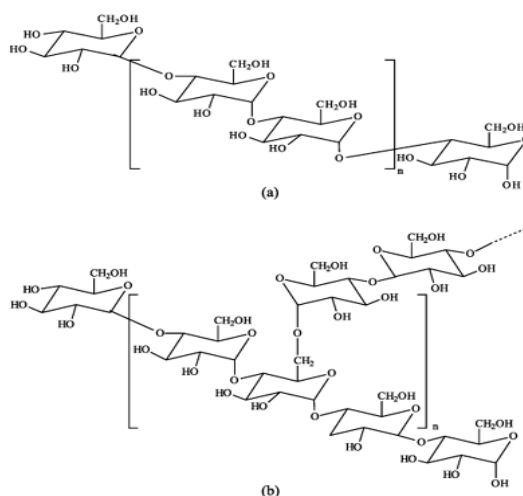
Além dessas, muitas outras proteínas já foram estudadas, o que possibilitou o desenvolvimento de tratamentos para várias outras doenças, daí a importância da elucidação estrutural das proteínas. Por exemplo, o conhecimento da estrutura de enzimas que regulam as vias metabólicas em organismos causadores de doenças auxilia na sugestão de inibidores de sua ação catalítica, que bloqueiem o desenvolvimento destes em outros seres vivos.

1.2.2 Inibidor de alfa-amilase do centeio (*Secale cereale*)

O centeio (*Secale cereale*) começou a ser produzido no Brasil por imigrantes alemães e poloneses há dois séculos. Ele pertence à Família *Poaceae* ("Gramineae"), Subfamília *Pooideae*, Tribo *Triticeae*, Subtribo *Triticineae*, Gênero *Secale* e espécie *Secale cereale* (JUNIOR et al., 2006).

Da semente de centeio pode-se extrair inibidor de alfa-amilase, enzima capaz de inibir a ação da alfa-amilase. As amilases são enzimas que possuem a função de degradar a molécula de amido e estão extensivamente distribuídas na natureza. O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal; ele pode ser encontrado em sementes de cereais como milho, cevada, trigo, arroz e em tubérculos, como batata ou raízes como mandioca (FERNANDES et al., 2007). Em sua constituição, contém dois tipos de polímeros da glicose (figura 4), a amilose (que consiste de cadeias longas, não-ramificadas de unidades de D-glicose conectadas por ligações alfa-1→4, com massa molecular de uns poucos milhares até mais de um milhão) e a amilopectina (que é altamente ramificada e com uma massa molecular que pode chegar até 100 milhões, possui ligações glicosídicas alfa-1→4 entre as unidades de glicose, mais os pontos de ramificação, encontrados a cada 24 a 30 unidades e são ligações do tipo alfa-1→6) (NELSON; COX, 2002).

Figura 4: Componentes da estrutura do amido. a) estrutura química da amilose e b) amilopectina (CORRADINI, et al., 2005).



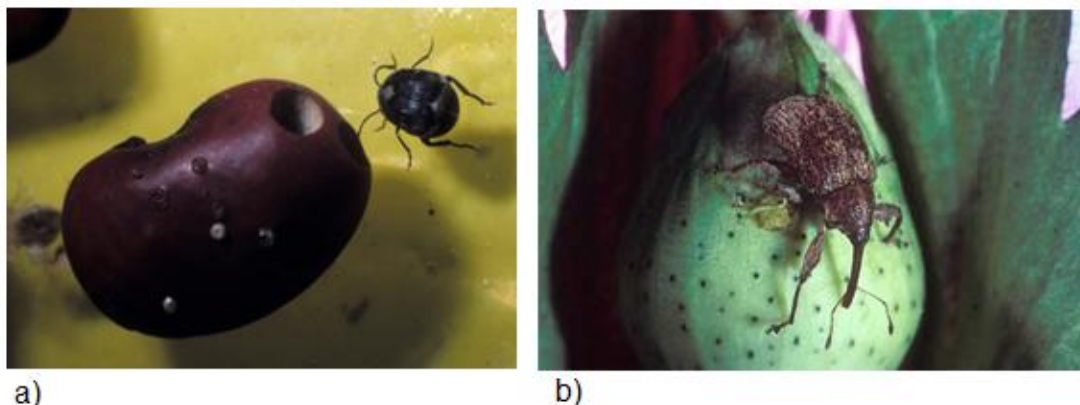
As amilases hidrolisam o amido e o glicogênio, elas são enzimas que catalisam a quebra das ligações alfa-1-4-glicosídicas. Durante a germinação dos cereais ocorre a produção da alfa-amilase; ela também pode ser produzida por vários organismos, por exemplo, pelo pâncreas e pelas glândulas salivares de diversos animais. No caso de cadeias lineares (amilose), quando a reação está completa obtém-se a hidrólise total em unidades de maltose. Já no caso de amilopectina e do glicogênio, a hidrólise das ligações alfa-1-4-glicosídicas é processada com dificuldade próxima aos pontos de ramificação e as ligações alfa-1-6-glicosídicas que constituem estes pontos de ramificação não são atacadas; o que

se obtém é uma mistura de maltose-alfa: alfa-Glc-(1→4)-alfa-Glc e de dextrinas residuais formadas por oligo- e poliosídios ramificados (WEIL, 2000).

As amilases são muito importantes para as plantas na germinação e na maturação de sementes. Muitas enzimas são necessárias para a despolimerização completa do amido e para que ele seja absorvido e utilizado pelos seres vivos como fonte energética. De acordo com seu mecanismo de ação, as enzimas podem ser divididas em três grupos principais: as endo-amilases, exo-amilases e enzimas de desramificação (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

Há insetos que graças às suas amilases causam sérios prejuízos às lavouras agrícolas, pois eles se alimentam das sementes e raízes das plantas que são ricas em amido. Cita-se como exemplos, a broca do feijão mexicano *Zabrotes subfasciatus*, que se alimenta das sementes de feijão (DAYLER et al., 2005) e o bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* (figura 5) (DIAS, et al., 2005).

Figura 5: a) Broca do feijão mexicano *Zabrotes subfasciatus* (Mexican bean..., 2012) e b) bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* (Bicudo-do..., 2012).



Os inibidores de amilases são produzidos por diversas plantas, principalmente sementes e tubérculos (WANG et al., 2006), muitos deles já foram purificados e identificados (PAYAN, 2004).

A existência de inibidores em sementes pode ser explicada por três hipóteses: eles podem estar envolvidos na regulação de mecanismo de germinação das sementes, podem ser proteínas de armazenamento (existem em grande quantidade nas sementes, podem ser uma reserva protéica para o desenvolvimento da planta) ou estão relacionados com o mecanismo natural de defesa da planta (revisto por IULEK et al., 2000).

Inibidores de alfa-amilase protéicos já foram encontrados em cereais, como a cevada *Hordeum sativum* (ABE et al., 1993), o arroz, *Oryza sativa* (YAMAGATA et al., 1998), o centeio *Secale cereale* (IULEK et al., 2000), o trigo *Triticum aestivum* (GARCIA-MOROTO et al., 1991; FENG et al., 1996; FRANCO et al., 2000), o sorgo, *Sorghum bicolor* (BLOCH; RICHARDSON, 1991), também foram encontrados em leguminosas como o feijão de corda (MELO et al., 1999) e o feijão comum (MARSHALL; LAUDA, 1975; ISHIMOTO et al., 1996; GROSSI DE SÁ et al., 1997) e até mesmo em outras famílias vegetais (MARSHALL; LAUDA, 1975).

Existem plantas que possuem inibidores de alfa-amilases capazes de atuar contra amilases no intestino de insetos. Eles formam um complexo estável no qual a proteólise (degradação da proteína por enzimas) é limitada e extremamente lenta (TIFFIN; GAUT, 2001), o que causa deficiência de aminoácidos, influenciando o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, levando-os à morte (POMPERMAYER et al., 2001).

Devido ao fato de os insetos serem dependentes das amilases para sua sobrevivência, pois se alimentam de amido, os genes de inibidores de alfa-amilase podem ser utilizados para a produção de plantas transgênicas resistentes aos insetos (WANG et al., 2006).

Os inibidores de alfa-amilase podem ter diversas utilidades, como é o caso do controle do bicudo do algodoeiro, onde a utilização do inibidor de alfa-amilase de centeio (*Secale cereale*) foi tóxico para o bicudo do algodoeiro, ocorrendo uma grande mortalidade e redução no peso larval em testes *in vitro*; a importância disso deve-se a redução dos danos gerados a cultura do algodão (DIAS et al., 2005).

As plantas transgênicas que expressam inibidores de enzimas hidrolíticas controlam ou alteram o desenvolvimento de insetos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002), pois estes se utilizam de enzimas hidrolíticas para penetrarem nos tecidos vegetais ou para digerirem o que ingerem (CASTRO; FONTES, 2005).

O inibidor de alfa-amilase purificado a partir do feijão *Phaseolus vulgaris* (feijão branco), chamado faseolamina, só inibe alfa-amilase de animais, não inibindo de plantas, bactérias e fungos (MARSHALL; LAUDA, 1975).

Vários inibidores de alfa-amilase já foram purificados e caracterizados, como por exemplo, os inibidores de sementes de trigo (*T. aestivum*), denominados 0,19 e 0,53, que, ao serem testados *in vitro*, tiveram suas atividades inibitórias diferentes contra a alfa-amilase pancreática de porco e alfa-amilases dos insetos *A. obtectus*,

Z. subfasciatus e *C. maculatus*. Enquanto o 0,19 apresentou atividade contra todas as alfa-amilases testadas, o 0,53 só apresentou contra as amilases dos insetos *A. obtectus*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* e muito pouco contra a alfa-amilase pancreática de porco. Sendo assim, quem apresentou melhor potencial para uso biotecnológico foi o 0,53, que tinha maior especificidade com relação às amilases dos insetos (FRANCO et al., 2000).

Muitos estudos relacionados à inibição da alfa-amilase e potencial hipoglicemiante de extratos vegetais *in vitro* e em modelos animais estão sendo realizados, comprovando o potencial de ação de plantas antidiabéticas, o que é muito importante, pois devido aos efeitos colaterais causados pelo uso de insulina e agentes hipoglicemiantes orais, muito se tem procurado um tratamento alternativo (ALI et al., 2006).

Os inibidores de alfa-amilase podem contribuir no tratamento de *Diabetes mellitus*, que é uma desordem do metabolismo de carboidratos, resultando em um aumento anormal da glicose no sangue (NELSON; COX, 2002). A ação dos inibidores de alfa-amilase consiste em retardar a digestão e a absorção geral de amido, aumentam a tolerância à glicose em pacientes diabéticos e aumentam a sensação de saciedade (PAYAN, 2004; LAYER et al., 1986).

Além do tratamento de *Diabetes mellitus*, os inibidores de alfa-amilase também poderiam ser usados no tratamento de obesidade, já que aumentam a sensação de saciedade, por meio do retardamento do esvaziamento gástrico (LAYER et al., 1986). Estudos vêm sendo feitos na área em busca de um inibidor de alfa-amilase clinicamente efetivo (LOIZZO et al., 2007).

Para contribuir com o desenvolvimento da aplicação de inibidores de alfa-amilase no tratamento de doenças, muitos estudos estruturais destes vêm sendo realizados; pode-se citar como exemplos: i) o estudo do inibidor de alfa-amilase do arroz *Oryza sativa*, que possui um peso molecular de 8,9 kDa e foi cristalizado pelo método da gota suspensa por difusão de vapor, e através dos dados de difração de raios X, a estrutura foi determinada com uma resolução de 1,81 Å (LIN, 2006); ii) o estudo do inibidor de alfa-amilase da cevada *Hordeum vulgare*, que possui 403 aminoácidos, teve sua estrutura determinada por substituição isomórfica múltipla, com resolução de 2,8 Å (KADZIOLA, 1994); iii) o estudo do inibidor de alfa-amilase do trigo 0,19 *Triticum aestivum*, que teve sua estrutura determinada pelo método de

substituição isomórfica, usando dados de difração com uma resolução de 2,06 Å (ODA, 1997).

1.2.3 Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), descoberto por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909, é um protozoário, agente etiológico da doença de Chagas. As doenças parasitárias que têm uma alta incidência tem um impacto econômico negativo nos países em desenvolvimento (SOUZA, 2009). Estima-se que cerca de dez milhões de indivíduos estejam infectados em todo o mundo principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica, e que mais de 25 milhões morem em áreas de risco de infecção. Em 2008 a doença de Chagas matou mais de 10.000 pessoas (Chagas disease..., 2012.) no mundo. Ela ocorre, principalmente, na América Latina, no entanto, ultimamente tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental, devido à mobilidade populacional entre América Latina e o resto do mundo.

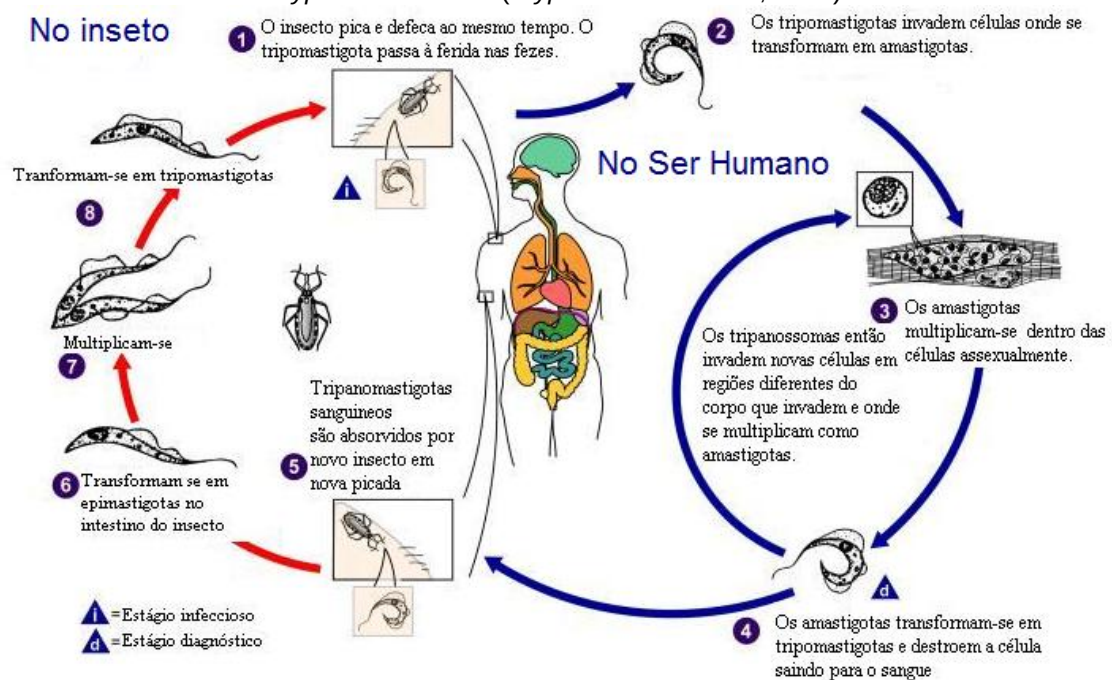
O *Trypanosoma cruzi* possui mais de um hospedeiro: o hospedeiro invertebrado, que são insetos da família Triatominae, principalmente *Rhodinus prolixus* e *Triatoma infestans*, conhecidos como barbeiros, e o hospedeiro vertebrado, que são diversos mamíferos, incluindo seres humanos.

O ciclo se inicia no hospedeiro vertebrado quando esse é infectado pela forma tripomastigota metacíclica, presente nos dejetos (fezes e urina) do vetor que são eliminados durante ou pouco após o repasto sangüíneo. A forma infectiva entra através de descontinuidades na epiderme (lesão causada pela picada do inseto hematófago) ou por penetração pelas membranas mucosas e então ocorre a infecção (SOUZA, 2002). Formas epimastigotas também podem penetrar, porém são destruídas por células fagocíticas, não influenciando no restante do processo. Quando os tripomastigotas metacíclicos aderem à superfície celular, no sítio de entrada do protozoário, os lisossomos se fusionam envolvendo o parasita e formando o vacúolo parasitóforo. Dentro da célula, os parasitas diferenciam-se em amastigotas, que possuem uma forma arredondada e um flagelo muito curto (SOUZA, 2009). A forma amastigota se divide por fissão binária e, após diversos ciclos de divisão, começa a se transformar em tripomastigotas sangüíneos, formas

infectivas e não-replicativas, que com o movimento intenso dos flagelos rompem as células hospedeiras liberando os parasitas na corrente sanguínea. As formas liberadas nas áreas extracelulares podem ser ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo ou infectar outras células do organismo (SOUZA, 2002).

Já o ciclo no hospedeiro invertebrado começa quando os insetos ingerem os tripomastigotas sanguíneos durante o repasto sanguíneo. No estômago, o parasita se instala iniciando o processo de diferenciação para a forma epimastigota, que é a forma replicativa e não infectiva. Após muitas divisões, essa forma migra para a porção posterior do intestino onde se transforma de epimastigota para tripomastigota metacíclico, que é a forma infectante, fechando/começando assim o ciclo (figura 6) (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; SOUZA, 2002).

Figura 6: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Trypanosoma cruzi..., 2012).

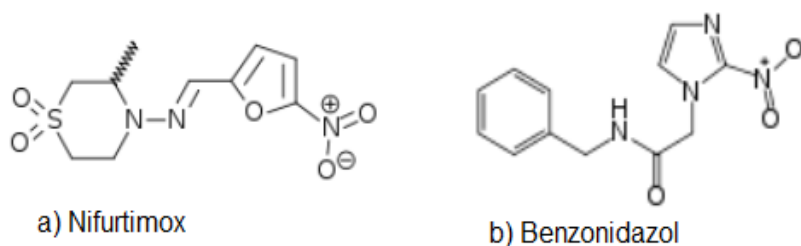


A doença de Chagas é caracterizada por duas fases: a aguda e a crônica. Na fase aguda (que dura até dois meses após a infecção), os sintomas algumas vezes são ausentes, mas em alguns casos podem ocorrer febre, cefaléia, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou no peito. Em menos da metade das pessoas picadas surge uma lesão de pele ou um inchaço das pálpebras arroxeadas em um olho (Sinal de Romaña). Nesta fase, uma grande quantidade de parasitas circulam no sangue. As maiores

dos casos agudos evoluem para a fase crônica, a qual durante muito tempo não apresenta sintomas, porém, causa danos irreversíveis; nessa fase, os parasitas estão escondidos, principalmente, no músculo cardíaco e digestivo. Os sintomas/sinais surgirão somente depois de um período de 10 a 20 anos. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos e até 10% sofrem de distúrbios digestivos (geralmente alargamento do esôfago ou do cólon), alterações neurológicas ou distúrbios mistos. Nos anos seguintes à infecção, pode ocorrer a morte súbita ou insuficiência cardíaca causada por destruição progressiva do músculo cardíaco (COURA; CASTRO, 2002; MARIN-NETO *et al.*, 2002).

Existem drogas para o tratamento da doença de Chagas: o Nifurtimox, lançado em 1967, e o Benzonidazol, que começou a ser estudado em 1971 (figura 7). O tratamento com os fármacos Nifurtimox e Benzanidazol tem sido muito eficaz na fase aguda da doença com índice de cura superior a 80%; na fase crônica tardia, a taxa de cura varia de 8% a 30%, porém, em crianças menores de 15 anos, na fase crônica recente, a taxa é de 50% a 60%. Na fase crônica tardia em adultos a cura é mais rara. As dificuldades provavelmente são relacionadas com o tempo de seguimento do tratamento ou com o tempo de infecção do paciente. Mesmo assim, recomenda-se o uso desses fármacos nesta fase, já que podem reduzir o número de parasitas e impedir a evolução da doença, proporcionando melhor qualidade de vida ao paciente. Porém, o tratamento com esses medicamentos podem causar efeitos colaterais nos pacientes, como dermatopatia alérgica generalizada (atinge 20 % dos pacientes), neuropatia periférica e depressão da medula óssea, o que muitas vezes leva à interrupção do tratamento. Devido ao efeito menor em algumas regiões endêmicas, o Nifurtimox teve sua comercialização interrompida no Brasil na década de 80 (OLIVEIRA, M., 2008).

Figura 7: Estrutura de drogas usadas para o tratamento da doença de Chagas. a) Nifurtimox (Nifurtimox..., 2012); b) Benzonidazol (Benzonidazol..., 2012).



A forma de controle da doença ainda é através da erradicação do inseto vetor através do uso de pesticidas. Porém, dessa forma não é possível eliminar totalmente a doença, já que existem muitas espécies silvestres que são reservatórios naturais do *Trypanosoma cruzi*. Além disso, o custo econômico do combate do inseto vetor é alto e não são todos os lugares que participam do programa. A melhor maneira de desenvolver novas medidas de controle é o entendimento das interações parasita-vetor, como os fatores que induzem o desenvolvimento dos vários estágios do ciclo de vida (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). São necessárias estratégias que foquem no bloqueio da infecção ou no tratamento dos pacientes cronicamente afetados.

A doença de Chagas é transmitida principalmente pelas fezes infectadas dos insetos sugadores de sangue, por transfusão sanguínea (COURA et al., 2002), pela passagem de uma mãe infectada para o recém-nascido durante a gravidez ou o parto e através da ingestão de alimentos contaminados. Em proporção menor, há a contaminação através de transplantes de órgãos e acidentes de laboratório (Mecanismos principais..., 2012).

É de necessidade urgente desenvolver novos medicamentos, que causem efeitos colaterais mínimos e que inibam a viabilidade dos parasitas, além disso, que sejam de fácil acesso às pessoas, que geralmente vivem em lugares pobres. Por isso que vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de identificar nos parasitas vias metabólicas ou estruturas celulares com características diferentes daqueles no hospedeiro, para explorá-las como alvo quimioterápicos (AVILÁN, 2011).

Uma característica que tem chamado a atenção dos pesquisadores é que os protozoários Kinetoplastida possuem em comum uma organela metabólica importante que se localiza em seus peroxissomos chamados glicossomos (organelas que contêm a maior parte das enzimas glicolíticas). Os glicossomos são susceptíveis de desempenhar um papel importante na adaptação metabólica para cada um dos ambientes aos quais os organismos parasitários estão expostos, pois o conteúdo enzimático dos glicossomos é rapidamente alterado quando os mesmos estão na corrente sanguínea dos mamíferos ou quando estão no intestino do inseto. O processo de glicólise e/ou gliconeogênese é fundamental para o fornecimento de energia ao parasita (MICHELS, 2006).

Por isso que estudos sobre as vias metabólicas essenciais à sobrevivência do parasita e mecanismos pelos quais os tipanossomatídeos infectam hospedeiros

humanos são essenciais para a descoberta de novas drogas e vacinas. Esses estudos podem identificar moléculas únicas ou altamente diferentes que podem atuar como inibidores de enzimas importantes nesses processos, ou até mesmo descobrir antígenos que podem ser explorados como vacinas.

Alguns destes estudos são realizados pelo Dr. Stenio Perdigão Fragoso da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), no Instituto Carlos Chagas em Curitiba -Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) (FRAGOSO, 2003), professor que cedeu os clones das proteínas GTPase YchF e Enolase.

1.2.4 GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*

A subfamília YchF pertence à superfamília P-loop NTPases, à classe TRAFAC (translation-factor-related) e à família Obg. A superfamília chamada P-loop NTPases desempenha em todos os organismos um papel central na regulação de diversos processos celulares, como a tradução de proteínas, transporte intracelular, transdução de sinais, mobilidade celular, divisão celular, crescimento e outros (GRADIA, 2008 apud SARASTE et al., 1991).

A ligação entre os fosfatos β e γ do ATP/GTP é hidrolisada pelas P-loop NTPases. Essas proteínas são do tipo alfa/beta, ou seja, contêm um arranjo recorrente de alfa-hélices que alternam com fitas- β ao longo de toda cadeia polipeptídica. As fitas β formam uma estrutura central na forma de folhas β antiparalelas, envolvidas por alfa-hélices (GRADIA, 2008 apud WALKER et al., 1982).

A superclasse P-loop GTPases se divide em duas classes: TRAFAC e SIMIBI (nome devido aos seus três maiores grupos: GTPases de reconhecimento de sinal, a superfamília MinD e a superfamília BioD). Essas duas classes podem se dividir em mais de 20 famílias distintas e cerca de 60 subfamílias (LEIPE et al., 2002).

Bactérias com genomas pequenos (por exemplo, *Mycoplasma genitalium*) apresentam 11 GTPases representantes (FRASER et al., 1995). A maioria dessas GTPases são universalmente conservadas e podem ser atribuídos a quatro principais grupos ancestrais principais: o grupo dos fatores de tradução (EF-G, EF-Tu, e IF2), o grupo Era (Era, Enga, e ThdF / TrmE), o grupo FtsY/Ffh e o grupo Obg (CALDON; YOONG; MARCH, 2001).

A família Obg se divide em cinco subfamílias denominadas Obg, DRG, YyaF/YchF, Ygr210 e NOG1. Muitos genes que codificam GTPases desta família têm sido estudados (ALESSANDRO, 2010).

A proteína codificada pelo gene YchF é uma das 11 GTPases altamente conservadas e a única destas com função desconhecida (GRADIA, 2008 apud LEIPE et al., 2002).

Para compreender um pouco mais a função da proteína YchF algumas estruturas cristalográficas foram determinadas. Por exemplo, a estrutura de *Haemophilus influenzae*, determinada em 2003 por Teplyakov et al, com uma resolução de 2,4 Å. Já em 2007, Koller-Eichhorn et al determinaram a estrutura da YchF ortóloga humana, com uma resolução de 1,9 Å. Comparando-se as duas estruturas de organismos diferentes, é possível notar a sua conservação (GRADIA, 2008).

Em *Trypanosoma cruzi*, que é um protozoário, foi observado um ortólogo da proteína YchF, porém ainda não se conhece a função desta proteína (RAU, 2004). No estudo realizado por Gradia, 2008, chegou-se à conclusão de que TcYchF estava associada tanto com subunidades ribossomais quanto com polissomos, sugerindo o seu envolvimento com a maquinaria de tradução de *Trypanosoma cruzi*, a proteína YchF hidroliza preferencialmente ATP em relação ao GTP. Sendo assim, vê-se a importância do estudo de sua estrutura tridimensional, para entender se esta proteína poderia ser usada como um alvo no tratamento da doença de Chagas.

1.2.5 Enolase de *Trypanosoma cruzi*

A enolase, também chamada de fosfopiruvato hidratase, é uma metaloenzima responsável pela conversão reversível entre D-2-fosfoglicerato (2PGA) e fosfoenolpiruvato (PEP) em vias metabólicas que muitas vezes são vitais para a função celular: glicólise e gliconeogênese (PANCHOLI, 2001). A reação direta é a nona etapa da glicólise e a reação inversa é a primeira da gliconeogênese.

A enolase é encontrada em diferentes organismos, já foi isolada de bactérias, eucariotos, humanos e outros. Elas são altamente conservadas e possuem propriedades cinéticas semelhantes. Normalmente, a enolase é encontrada como homodímero, embora enolases octaméricas de bactérias tenham sido relatadas também (CHAI, 2004). Dependendo do organismo, a enolase se apresentará com

isoformas diferentes, favorecendo um fluxo no sentido glicolítico ou gliconeogênico (BOLTEN et al., 2008).

A enzima enolase não está envolvida somente no metabolismo glicolítico; estudos têm mostrado ela é uma proteína multifuncional. Em células de mamíferos, já foram encontradas três isoformas de enolase, α -(ENO1), β -(ENO3) e γ -(ENO2). ENO1 é vastamente distribuída em uma variedade de tecidos, já ENO2 é encontrada somente nos tecidos neuroendócrinos e ENO3 é encontrada somente em tecidos musculares (CHANG et al., 2006).

É no citosol de todas as células eucarióticas que a enolase está localizada, e além de desempenhar sua função na glicólise e gliconeogênese, ela também está envolvida com a regulação da morfologia da célula e transporte de material, interagindo com o citoesqueleto do sistema. Já nas células de mamíferos ela também participa da transcrição e regulação de genes envolvidos nas transformações morfológicas e proliferação celular. As alfa-enolases encontradas em mamíferos são um componente principal estrutural do cristalino do olho, onde é encontrada como um monômero inativo (revisto por AVILÁN, 2011).

A enolase também pode ser expressa na superfície de organismos patogênicos e não-patogênicos, por exemplo, a enzima foi encontrada na parede celular de *Saccharices cerevisiae*, em levedura *Candida albicans*, em bactérias com *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans* (JONES & HOLTS, 2007), em parasitas como *Plasmodium spp.*, *Entamoeba invadens*, do gênero *Schistosoma* (SEGOVIA-GAMBOA et al., 2010; Yang et al., 2010), em *Streptococcus pyogenes* e o inseto parasita *Aphidius ervi* (Walker, 2005).

O *Trypanosoma cruzi* é muito dependente da glicólise para sua sobrevivência, pois é através da qual o ATP é sintetizado pelo parasita, se a glicólise for inibida, rapidamente os parasitas morrem (ENGEL, 1987).

Estudos confirmaram que a atividade da enolase é exclusivamente presente no citosol de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Em *Trypanosoma cruzi* foi observada a expressão de maior quantidade de enolase em tripomastigotas e amastigotas do que em epimastigotas (AVILÁN, 2011).

Dada a importância de enolase no metabolismo deste parasita, ela apresenta-se com potencial alvo para o desenvolvimento de novos inibidores visando causar dano ao mesmo.

1.3 TÉCNICAS E SEUS FUNDAMENTOS

1.3.1 Purificação de Proteínas

As técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas são: diálise, precipitação fracionada e cromatografias.

A diálise é usada para separar íons inorgânicos (por exemplo, cloreto de sódio), pequenas moléculas orgânicas (por exemplo, glicose) ou mesmo moléculas maiores, de espécies de alto peso molecular, como proteínas. As moléculas grandes não se difundem através de membranas hidrofílicas finas de nitrato ou acetato de celulose, já as moléculas menores ou íons rapidamente se difundem (SKOOG, 2002). A diálise ocorre da seguinte forma: o extrato parcialmente purificado é colocado em um saco ou tubo feito de uma membrana semipermeável, que é colocada em um grande volume de líquido dialisante, a membrana permitirá a troca do sal, tampão e outras moléculas que conseguem transpassá-la (dado por seu valor de corte), mas não das proteínas maiores (em que normalmente se inclui a de interesse). Sendo assim, através da diálise as proteínas maiores ficarão retidas no interior da membrana, enquanto que a concentração dos outros solutos da preparação da proteína se alterará até que se atinja o equilíbrio com a solução do meio externo. Um exemplo de uso de diálise é a remoção de sulfato de amônio na precipitação de proteínas (NELSON; COX, 2002).

A precipitação fracionada é normalmente uma das etapas iniciais da purificação. Neste método são exploradas as diferenças nas solubilidades das proteínas quanto ao pH, temperatura, concentração salina e outros fatores. O mais utilizado na purificação de proteínas é o fracionamento em função da concentração salina, pois a adição de um sal na quantidade correta pode seletivamente precipitar algumas proteínas, enquanto outras ficam em solução. O sal frequentemente usado é o sulfato de amônio, pois possui alta solubilidade em água (NELSON; COX, 2002).

Após algumas etapas de purificação, com a proteína de interesse já um tanto purificada, continua-se o processo através de cromatografias.

Na cromatografia, a separação ocorre devido às diferenças de carga, tamanho, afinidade de ligação ou outras propriedades das proteínas. Na coluna há a fase estacionária, que é constituída de um material sólido poroso, com propriedades químicas apropriadas, através do qual passa a fase móvel, que é normalmente uma

solução tamponada contendo a mistura. A solução que contém a mistura é posta no topo da coluna e, dependendo das propriedades das proteínas na mesma, elas irão migrar mais rápidas ou mais lentamente. Um exemplo é a cromatografia de troca de cátions, onde a matriz sólida contida no interior da coluna possui grupos carregados negativamente. Sendo assim, proteínas carregadas positivamente migrarão mais lentamente do que as carregadas negativamente. Os tipos de proteínas existentes são separados em diferentes frações. Uma coluna maior melhora a separação entre os picos, porém o tempo gasto na cromatografia é maior (NELSON; COX, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês HPLC) representa um refinamento da técnica, já que reduz o tempo de trânsito da mistura na coluna, pois usa bombas de alta-pressão que aceleram a velocidade da movimentação das moléculas de proteína pela mesma; usa também materiais cromatográficos de qualidade maior, que podem suportar a força do fluxo pressurizado. A resolução é bastante melhorada, pois também limita o espalhamento por difusão das bandas de proteína (NELSON; COX, 2002).

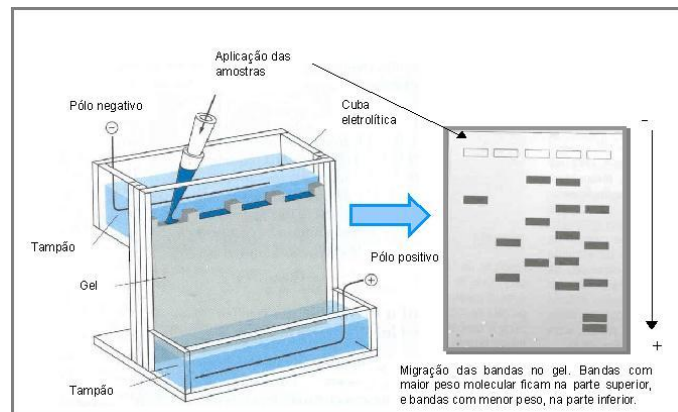
1.3.2 Técnicas Analíticas para Proteínas

Quanto às técnicas analíticas, as mais utilizadas são: eletroforese, dosagem protéica e atividade enzimática/inibitória.

A eletroforese é uma técnica de separação e foi desenvolvida na década de 1930 pelo químico sueco Arne Tiselius, com o objetivo de estudar proteínas de soro sanguíneo. Por este trabalho, em 1948 ele recebeu o Prêmio Nobel. Essa técnica é baseada na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em uma solução-tampão através da qual tenha sido aplicado um campo elétrico de corrente contínua (figura 8) (SKOOG, 2002).

A eletroforese é útil como método analítico, pois permite determinar o ponto isoelétrico (pH em que a proteína tem carga neutra) e o peso molecular aproximado das proteínas (NELSON; COX, 2002). Pode ser feita com em condições desnaturantes (método de LAEMMLI, 1970), tricina (SCHÄGGER; JANGOW, 1987) ou para proteínas nativas (DAVIS, 1964; REISFELD, 1962). Quanto ao suporte, para proteínas usa-se comumente em gel de poliacrilamida enquanto que para DNA usa-se gel de agarose.

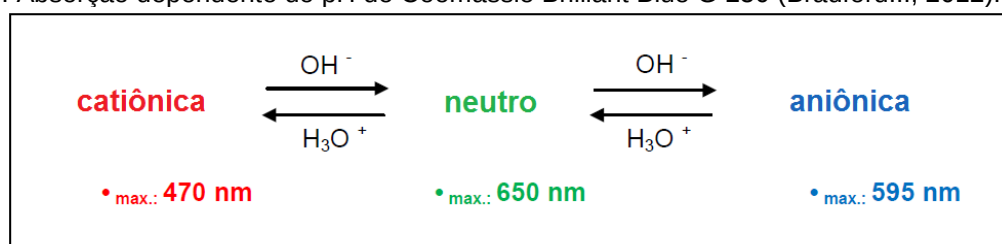
Figura 8: Eletroforese em gel, técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial, as moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa (Representação..., 2012).



Além de detectar a presença de proteína em um processo de purificação, também é importante saber a quantidade desta. Vários são os métodos que possibilitam dosar a quantidade de proteínas existentes: método de Biureto, método de Lowry, método de Bradford, método de Smith ou BCA (método do ácido bicinchonínico), método de absorção no ultravioleta, entre outros.

Um dos mais utilizados é o método de Bradford, ele foi descrito pela primeira vez em 1976, é usado para a determinação de proteínas totais e se baseia na interação entre o corante de "Coomassie Brilliant Blue" G-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína e o corante no pH (potencial de hidrogênio iônico) de reação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm (ZAIA, et al. 1998). Ele é baseado na observação de que o "Coomassie Brilliant Blue" G-250 existe em duas cores diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida à forma azul pela ligação do corante à proteína (BRADFORD, 1976), figura 9.

Figura 9: Absorção dependente do pH de Coomassie Brilliant Blue G 250 (Bradford..., 2012).



Ele é utilizado na determinação de proteínas totais em diversos meios: plasma ou soro sanguíneo, líquido, saliva humana, produtos alimentícios, leite humano, tecidos de plantas, suspensões de células, avidina e estreptavidina, urina e detergentes (ZAIA, et al. 1998). Há pouca ou nenhuma interferência de cátions como o sódio ou o potássio e também de hidratos de carbono como a sacarose. O que pode interferir no ensaio é uma grande quantidade de detergentes, como dodecil sulfato de sódio, Triton X-100 e detergentes de uso comercial (BRADFORD, 1976).

Outra técnica de análise bem importante é a atividade enzimática/inibitória, que permite saber se a proteína de interesse está realmente presente e desempenhando sua função.

Para a determinação da atividade inibitória da alfa-amilase, um dos métodos mais utilizados é o que se utiliza do reagente DNS (ácido-3-5-dinitrosalicílico). Este método foi descrito pela primeira vez em 1955 por Bernfeld (BERNFELD, 1955). Ele baseia-se na hidrólise do amido pela alfa-amilase, que o transforma em maltose, glicose e dextrina. Esses açúcares redutores são quantificados por uma reação colorimétrica com o DNS, que é reduzido e forma o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um grupo cromóforo, cuja intensidade de coloração é medida em espectrofotômetro (540nm) (ALI, et al. 2006).

Outro método que pode ser utilizado para identificar a presença de inibidores de alfa-amilase é o método de Caraway (adaptado neste trabalho). Este método se baseia no princípio de que a ASH (amilase salivar humana) hidrolisa o amido a polissacarídeos, maltose, dextrinas e glicose. Adicionando-se uma solução de iodo, há formação de cor-azul-esverdeada que indica a presença de amido não hidrolisado, cuja intensidade é analisada com um espectrofotômetro e comparada com um controle de substratos (CARAWAY, 1959).

1.3.3 Cristalização de Proteínas

Com este método objetiva-se obter um cristal de proteína, para posteriormente submetê-lo à difração de raios X. Com os dados coletados e programas computacionais, finalmente pode-se chegar à estrutura experimental da proteína cristalizada.

Na cristalização, as moléculas assumem posições regulares no estado sólido, ou seja, se ordenam. O processo de cristalização pode ser visto como um equilíbrio

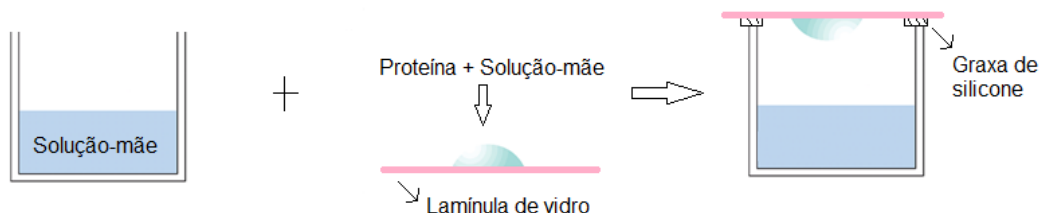
dinâmico entre as partículas no estado líquido e no estado sólido; quando o equilíbrio é deslocado no sentido da solidificação, o cristal cresce. Para isso, é necessário um estado de supersaturação, que pode ser alcançado pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns parâmetros como temperatura, pH e força iônica. Assim, a solução de proteína alcança a zona de nucleação, formando os primeiros agregados ordenados de proteína. Com a diminuição da supersaturação da proteína, a zona metaestável é atingida e é onde os cristais crescem (VACARI, 2010).

Existem três arranjos de cristalização por difusão de vapor: gota suspensa (*hanging drop*), gota sentada (*sitting drop*) e gota sanduíche (*sandwich drop*); o que muda de um método para o outro é a posição da gota. Com estes, pretende-se atingir o equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado. A solução menos concentrada perderá seu solvente volátil até que os potenciais químicos das duas sejam iguais. Se o equilíbrio ocorrer por meio de troca de água, o volume da gota é diminuído, e ocorre um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização (VACARI, 2010).

Dessa forma, a proteína pode chegar ao estado supersaturado e formar cristais (McPHERSON, 1999). Para a utilização destes cristais em uma análise estrutural, vai depender da qualidade com que difratam os raios X. Os cristais precisam ter boa qualidade e dimensões apreciáveis (maior ou igual a 0,2mm) (ROMÃO, 1996).

Neste trabalho utilizou-se o ensaio de cristalização através da difusão de vapor da gota suspensa, como mostrado na figura 10.

Figura 10: Montagem para cristalização de proteína por difusão de vapor da gota suspensa.

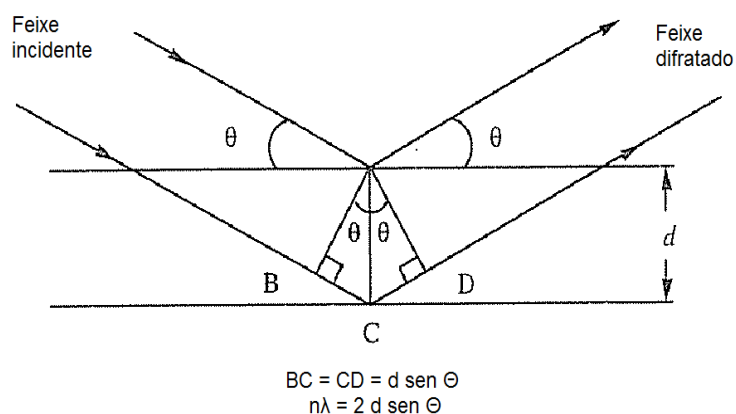


1.3.4 Difração de Raios X na Determinação de Estruturas de Proteínas

Quando raios X atingem uma amostra cristalina, ocorre o fenômeno chamado difração, pois como as distâncias interatômicas dos cristais são da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda da radiação X, os átomos atuam como obstáculos ou centros espalhadores (CULLITY, 1978).

As dimensões da cela elementar do cristal podem ser calculadas a partir do padrão de difração obtido, uma vez que o espaçamento da rede real é inversamente proporcional ao das reflexões. Foi Lawrence L. Bragg que explicou o fenômeno de difração (figura 11). As direções e intensidades dos raios X difratados pelos cristais de proteínas são medidas, os dados obtidos são trabalhados e a “imagem do conteúdo do cristal” é produzida em termos de um mapa de densidade eletrônica. Por meio de vários métodos de cálculos e uso de estações gráficas, é possível interpretar a imagem e vê-la tridimensionalmente; assim constrói-se um modelo molecular correspondente a imagem inicialmente obtida. A bioquímica estrutural tem sido muito influenciada pela técnica difração de raios X aplicada à análise de cristais de macromoléculas biológicas, o que contribui para o conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas, ácidos nucleicos, vírus e outras macromoléculas (ROMÃO, 1996).

Figura 11: Difração de raios X por um cristal e Lei de Bragg. Os raios X refletidos por planos adjacentes percorrem diferentes distâncias, a difração só ocorre quando a diferença da distância (dependente do ângulo de reflexão θ) percorrida é igual a um múltiplo do comprimento de onda do feixe de raios X, a relação entre este ângulo e o comprimento de onda é a "lei de Bragg" (ROMÃO, 1996).



1.3.5 Processamento de Imagens de Difração

1.3.5.1 Indexação e Integração de Intensidades

Cada ponto da imagem é resultado de um feixe difratado, devido a uma interferência construtiva entre a radiação espalhada pelos átomos do cristal; os pontos representam o espaço recíproco da rede cristalina. Um conjunto de dados completo pode ser constituído por centenas de imagens separadas tomadas em diferentes orientações do cristal.

As imagens de difração, medidas individualmente de forma bidimensional, são convertidas em um modelo tridimensional de densidade eletrônica através da transformada de Fourier. O processamento de dados começa com a indexação das reflexões, em que são identificadas as dimensões da célula unitária e que ponto da imagem corresponde a determinada posição no espaço recíproco. Faz parte da indexação a determinação da simetria do cristal, avançando na determinação de seu grupo de espaço.

Apenas 65 grupos de espaço de 230 possibilidades são permitidos para moléculas de proteína, que são quase sempre quirais, não se observando simetrias de reflexão ou inversão nessas moléculas (GIACOVAZZO et al., 2002).

Após a atribuição da simetria, as intensidades são integradas. Isso produz das centenas de imagens que contêm milhares de reflexões um único arquivo, que consiste de registros do índice de Miller de cada reflexão com sua intensidade e estimativa de erro.

1.3.5.2 Escalonamento

Após a integração, as reflexões não estão na mesma escala devido ao decaimento da intensidade do feixe difratado de raios X com o passar do tempo, diferentes volumes do cristal terem sido expostos em diferentes imagens, danos ao cristal durante a coleta pela própria radiação, absorção de radiação pelo cristal que varia de acordo com a região exposta, entre outros motivos.

O escalonamento colocaria todas as reflexões na mesma escala, soma as reflexões parciais e a promediação das reflexões relacionadas por operações simétricas e que porventura foram medidas várias vezes durante a coleta; o processo leva a um conjunto de reflexões únicas por simetria, além da intensidade promediada final o erro associado a cada reflexão também é estimado (SHERWOOD; COOPER, 2010).

1.3.6 Preparação de Modelo para Substituição Molecular

Para cada reflexão, a amplitude pode ser obtida experimentalmente, a partir da intensidade medida com a difração de raios X; já as fases não são obtidas com o experimento, por isso que outros métodos são necessários para encontrar o valor destas. Tais métodos podem ser: Substituição Isomórfica Múltipla (MIR), Dispersão Anômala e Substituição Molecular (MR).

Neste trabalho, a técnica utilizada foi a substituição molecular, pois já se tem a estrutura de uma proteína homóloga. Inicialmente, fez-se uma preparação do modelo para a substituição molecular através de programas que alinham a sequência que se possui com a da estrutura que será usada na substituição molecular.

1.3.7 Substituição Molecular

Quando se conhece a estrutura de uma molécula homóloga ou análoga àquela que se pretende determinar estrutura, pode-se usar esta para se obter a estimativa inicial das fases. O problema consiste em posicionar corretamente a estrutura conhecida na cela unitária da estrutura desconhecida. Após este problema ser resolvido, é possível calcular os fatores de estrutura da molécula conhecida, estimando as fases da proteína desconhecida (ROMÃO, 1996).

Após obter as melhores fases possíveis, o próximo passo é interpretar o mapa de densidade eletrônica, fazendo rastreamento da cadeia de polipeptídeo e os reajustes necessários. Os programas utilizados para isso são COOT ("Crystallographic Object Orientated Toolkit" - CCP4, programa gráfico usado para exibir e manipular modelos atômicos de macromoléculas, normalmente de proteínas, utilizando computação gráfica tridimensional) (Collaborative..., 2011) e PyMOL - sistema de visualização molecular, que pode produzir imagens tridimensionais de alta qualidade de pequenas moléculas e macromoléculas biológicas, tais como proteínas (Pymol..., 2011).

1.3.8 Refinamento

Com a substituição molecular é possível calcular um mapa de densidade eletrônica, que permite observar o ajuste da cadeia polipeptídica para uma dada sequência dos aminoácidos. Os erros que os modelos iniciais contêm podem ser removidos por refinamento cristalográfico. Seguindo o refinamento o modelo vai sendo modificado, pelo método dos mínimos quadrados, de modo a minimizar o quadrado das diferenças entre as amplitudes de difração experimentalmente observadas (F_{obs}) e as calculadas com base no modelo (F_{calc}). Uma alternativa para refinamento dos mínimos quadrados é minimizar erros com base em idéias de máxima verossimilhança, onde o melhor modelo é mais consistente com as observações (traz-se medidas reais e vê-se o quão bem eles concordam com o modelo) (SHERWOOD; COOPER, 2010). Um índice bastante usado para quantificar as diferenças entre as amplitudes de difração experimentalmente observadas (F_{obs}) e as calculadas com base no modelo (F_{calc}) é o fator R_{factor} (equação 1) (ROMÃO, 1996).

$$R_{factor} = \frac{\sum(|F_{obs}| - |F_{calc}|)}{\sum|F_{obs}|} \quad \text{Equação 1.}$$

O valor deste vai normalmente diminuindo à medida que o modelo é reajustado e construído, o que é feito utilizando um programa gráfico, adicionando-se manualmente novos resíduos de aminoácidos ou ajustando sequências fora da densidade eletrônica e corrigindo-se erros conformacionais (ROMÃO, 1996).

Um critério de qualidade semelhante é R_{free} , que é calculado a partir de um subconjunto (normalmente entre 5 e 10%) de reflexões que não foram incluídos no refinamento da estrutura. Ambos os fatores R dependem da resolução dos dados.

O modelo de partida que vem da substituição molecular pode conter vários erros sistemáticos nas coordenadas. Para reduzir a maioria dos erros nas coordenadas faz-se um refinamento inicial de corpo rígido, onde o modelo é dividido em uma série de restrições, com um número pequeno de parâmetros refinados, para que se possa refinar usando dados de baixa resolução, aumentando assim o raio de convergência. O refinamento por mínimos quadrados restrito tem um raio relativamente pequeno de convergência, isto porque ele usa uma aproximação linear para um problema fortemente não-linear. Discrepâncias são minimizadas entre os fatores de estrutura observados e os calculados a partir do modelo. As posições dos átomos são deslocados, mantendo restrições geométricas sobre o comprimentos de ligação conhecida, ângulos e contatos Van der Waals. Geralmente são necessários

muitos ciclos de refinamento, assim como várias rodadas de mapa de inspeção e reajustes manuais do modelo (GIACOVAZZO et al., 2002).

1.3.9 Validação

Após a estrutura refinada, os resultados da análise estrutural podem ser avaliados por diversos critérios: qualidade e resolução dos dados de difração; qualidade em relação às fases experimentais; os fatores R_{factor} e R_{free} ; desvios dos ângulos e distâncias de ligação em relação a valores padrão (ROMÃO, 1996).

Essa avaliação é feita através de programas computacionais, que avalia parâmetros estereoquímicos: comprimento de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não-ligados.

Por exemplo, cita-se o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) que faz uma verificação da qualidade estereoquímica da estrutura da proteína, analisando a estrutura global e por resíduo. Um dos gráficos gerados por ele é o de Ramachandran (RAMACHANDRAN et al., 1963), que define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis no tocante aos ângulos ψ e ϕ e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas. Outro exemplo é o MolProbity, que é um serviço web que fornece amplo espectro de avaliação baseado na qualidade do modelo (CHEN et al., 2009).

1.3.10 Expressão de proteínas

Os sistemas de expressão heteróloga em proteínas são muito utilizados nos dias de hoje, principalmente na produção de proteínas de interesse do ponto de vista biotecnológico e medicinal. É a tecnologia do DNA recombinante que permite a clonagem de genes; fragmentos de DNA são inseridos em plasmídeos, com auxílio de enzimas de restrição e introduzidos em células hospedeiras que se multiplicam, obtendo-se assim milhões de cópias de um gene (JONASSAN et al., 2002).

O sistema de expressão heteróloga em *E.coli* foi o primeiro a ser utilizado, ele é baseado no operon lac, onde o DNA de interesse é clonado em fago, usando-se cDNA, ou em plasmídeo contendo o lacI, repressor, lacP, promotor, e lacZ, gene transcrito para mRNA da β -galactosidase. Após a clonagem, a etapa seguinte é a indução da transcrição, que é feita através da adição do IPTG (análogo sintético não degradável) (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo), que se associa ao repressor inibindo-o, permitindo assim que o promotor fique livre para interagir com a RNA polimerase, havendo então a transcrição do gene. Este sistema é muito utilizado, devido à facilidade e baixo custo de obtenção de *E.coli*, em termos de cultivo; também, devido a grande reprodutibilidade desta e abundância de proteína produzida. Também se tem a possibilidade de efetuar modificações nos vetores de *E. coli*, no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original (BANEYX, 1999).

1.3.11 Alinhamento de Sequências de Proteínas

Alinhar sequências é uma forma de organizar e comparar duas ou mais sequências de proteínas para identificar as regiões de similaridade entre elas. Assim, resíduos estruturalmente equivalentes são alinhados levando-se em conta características estruturais comuns (elementos de estrutura secundária e resíduos catalíticos) (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Para uma estrutura ser aceitável como molde, normalmente tem-se que o valor de similaridade deve ser acima de 30%, da sequência entre proteína-molde e proteína-alvo, na modelagem por homologia (D'ALFONSO et al., 2001). O "e-value", expressa a dificuldade para encontrar uma sequência perfeitamente idêntica, ele é um parâmetro estimado pelo programa BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), (BLAST..., 2012), que é extremamente utilizado para o alinhamento de sequências de proteínas, DNA e RNA.

Quando se possui uma sequência problema, é recomendável se fazer um alinhamento múltiplo, que será mais confiável se comparado com um alinhamento simples que envolve apenas duas sequências. Ele permitirá identificar mais facilmente as características estruturais comuns de proteínas homólogas. A maior parte dos métodos de alinhamento baseia-se em técnicas de programação dinâmica (SMITH, 1981).

Em um alinhamento é possível identificar regiões estruturalmente conservadas (com conformações muito semelhantes) e regiões variáveis (sem correspondência estrutural, normalmente alças).

1.3.12 Modelagem por Comparação (Homologia)

A modelagem de uma proteína leva em conta o conceito de evolução molecular (princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas implica em similaridade estrutural entre elas). Com isso, o modelo de uma proteína com estrutura desconhecida (alvo) pode ser construído com base em um alinhamento contra uma proteína com estrutura conhecida (modelo) (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

A construção do modelo geralmente envolve quatro etapas: (1) identificação e seleção dos homólogos que podem ser utilizados como modelos para modelagem; (2) o alinhamento da sequência de resíduos alvos para os modelos; (3) construção de um modelo para o alvo com base nas informações a partir do alinhamento e (4) avaliação do modelo (validação). Para a realização de todos os passos da modelagem existe um grande número de métodos, programas e servidores específicos na rede mundial de computadores (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

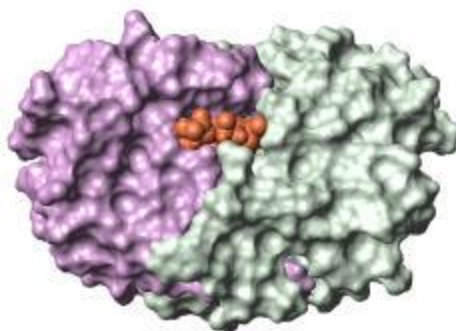
O MODELLER (programa para modelagem comparativa de estrutura de proteínas por satisfação de restrições espaciais) (ESWAR, N. et al, 2006) é um programa utilizado para modelagem por homologia de estrutura de proteínas tridimensionais. Um alinhamento de uma sequência a ser modelada com estruturas relacionadas determinadas, é fornecida ao programa que calcula automaticamente um modelo por satisfação das restrições espaciais (ESWAR, 2006; MARTI-RENOM, 2000).

1.3.13 Alocação ("Docking")

A alocação é um método que busca prever a orientação preferencial de uma molécula quando esta se liga a uma proteína, por exemplo, formando um complexo estável (figura 12). Pode-se utilizar o conhecimento da orientação preferencial para prever a força de associação ou afinidade de ligação entre duas moléculas usando

funções de pontuação. Por isso, a alocação desempenha um papel importante na busca de novos inibidores, que posteriormente podem se tornar medicamentos (KITCHEN, 2004).

Figura 12: Alocação de um ligante na proteína, formando um complexo. O conhecimento da orientação preferencial pode ser usado para prever a força de associação ou afinidade de ligação entre duas moléculas (TEODORO; PHILLIPS; KAVRAKI, 2001).



Existem bibliotecas moleculares onde é possível pesquisar muitos compostos até que se encontre um adequado para testes biológicos; após isso, os testes de alocação têm que ser verificados por estudos *in vitro* (PLEWCZYNSKI, 2010).

As dificuldades da alocação estão no fato de algumas vezes os alvos cristalográficos possuírem resolução limitada, ocorrer mudanças conformacionais com a ligação e haver a participação de moléculas de água na interação da proteína com o ligante (KITCHEN, 2004). Alguns programas abordam de forma limitada a questão das mudanças conformacionais.

O programa AutoDock é um conjunto de ferramentas utilizadas para alocação, opcionalmente, pode modelar de forma limitada a flexibilidade na proteína alvo, o que pode ser importante já que a introdução de um ligante pode modificar o sítio de ligação da proteína receptora, através de modificações conformacionais (GOODSELL, 1996).

1.3.14 Dinâmica Molecular

Dinâmica molecular é um método computacional que simula movimentos físicos de átomos e moléculas. Simulações de dinâmica molecular são ferramentas importantes para a compreensão da base física da estrutura e função de macromoléculas biológicas. A visão inicial de proteínas como estruturas relativamente rígidas foi substituída por um modelo dinâmico em que os movimentos

internos e alterações conformacionais desempenham um papel essencial na função dessas macromoléculas (KARPLUS; McCAMMON, 2002).

Os átomos e moléculas interagem por um determinado tempo, dando uma visão do movimento dos átomos. As trajetórias da moléculas e átomos são determinadas resolvendo-se numericamente as equações de Newton para o movimento de partículas que integram um sistema; as forças entre as partículas e energia potencial são definidas pela campo de força. Os resultados de simulações de dinâmica molecular podem ser utilizados para determinar as propriedades termodinâmicas macroscópicas do sistema. A mecânica molecular permitiu uma visão do movimento molecular em escala atômica (ALDER; WAINWRIGHT, 1959).

O desenvolvimento que vem ocorrendo nos últimos anos, na área da dinâmica molecular, deve-se à elaboração de métodos rápidos e eficientes para tratar as interações eletrostáticas de longo alcance e à disponibilidade de computadores mais rápidos.

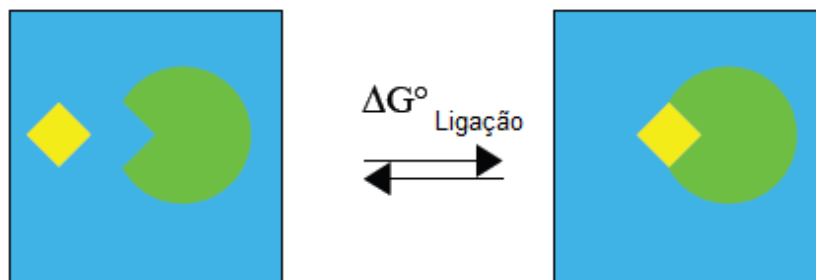
O programa utilizado neste trabalho para a dinâmica molecular é o AMBER (do inglês *Assisted Model Building with Energy Refinement*, Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia) (Assisted Model..., 2011), um programa de mecânica molecular bastante conhecido para cálculos de proteínas e de ácidos nucleicos, que traz um conjunto de campos de força moleculares para a simulação de interação e ligação de biomoléculas (CHEATHAM; YOUNG, 2001).

1.3.15 Estimativa de Energias de Associação (método MM/GBSA)

MM/GBSA (molecular mechanics / generalized-Born solvent accessible surface area) é termo em inglês para o uso do modelo de Born generalizado acrescido do uso da área superficial acessível ao solvente para cálculo das energias de interação, quando utilizado no contexto da mecânica molecular. O método MM/GBSA é usado para calcular a diferença de energia livre entre dois estados, ligado e não ligado, de duas moléculas solvatadas, ou para comparar a energia livre entre duas moléculas iguais solvatadas com diferentes conformações.

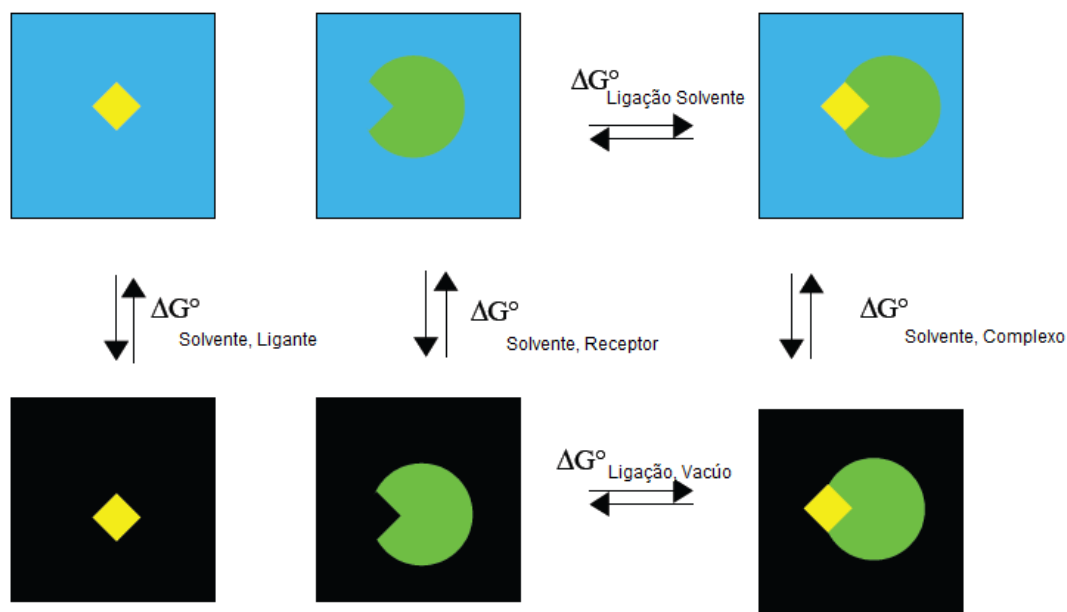
Calculando-se a energia livre diretamente como mostrado na figura 13, as interações e as flutuações na energia total seriam de uma ordem de magnitude maior do que a energia de ligação, pois a maioria das contribuições energéticas varia de solvente para solvente (WALKER; STEINBRECHER, 2006).

Figura 13: Método direto (WALKER, R. & STEINBRECHER, T, 2011).



Por isso, um dos métodos mais eficazes é dividir-se o cálculo de acordo com o ciclo termodinâmico da figura 14.

Figura 14: Método de divisão do cálculo em um ciclo termodinâmico (WALKER, R. & STEINBRECHER, T, 2011).



Através da equação 02 e usando-se o diagrama mostrado na figura 14, pode-se calcular a energia livre de ligação ($\Delta G^{\circ}_{\text{Ligação, solvente}}$):

$$\Delta G^{\circ}_{\text{Lig., Solv}} = \Delta G^{\circ}_{\text{Lig., Vácuo}} + \Delta G^{\circ}_{\text{Lig., Complexo}} - (\Delta G^{\circ}_{\text{Solv., Ligante}} + \Delta G^{\circ}_{\text{Solv., Receptor}})$$

Equação 02.

Os programas utilizados neste trabalho para estes cálculos estão no pacote o AMBER (Assisted Model..., 2011) e Ambertools (WALKER; STEINBRECHER, 2006).

1.4 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

1.4.1 Inibidor de Alfa-amilase do Centeio (*Secale cereale*)

Os inibidores de alfa-amilase do centeio já tinham sido estudados por Iulek e colaboradores (2000), este trabalho relata que um inibidor foi encontrado, mas, devido ao fato de não ter sido elucidado se havia somente um, uma das propostas deste trabalho é verificar a possibilidade de se purificar através de cromatografias convencionais mais que um inibidor de alfa-amilase, estabelecendo um novo protocolo de purificação dada à disponibilidade corrente de resinas mais modernas e do cromatógrafo Äkta Purifier, visando inclusive posterior cristalização e resolução de estrutura.

1.4.2 GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*

Foram obtidos clones da proteína GTPase da subfamília YchF de *Trypanosoma cruzi*. É necessário um estudo mais aprofundado dessa proteína para entender se ela poderia ou não ser usada como alvo no tratamento da doença de Chagas. Sendo assim, pretende-se expressar e purificar essa proteína para realizar ensaios de cristalização, visando determinação da estrutura experimental, além da realização de modelagem por homologia para estudos estruturais.

A comparação da estrutura desta proteína com as das proteínas homólogas estudadas até então pode ajudar na identificação de características que possam ser exploradas para o tratamento da doença de Chagas, no caso de validação desta, como alvo para desenvolvimento de novas drogas.

1.4.3 Enolase de *Trypanosoma cruzi*

Outra enzima também presente no *Trypanosoma cruzi* é a enolase, dela também se obtiveram clones para a realização dos estudos. Sendo assim, pretende-se realizar ensaios de expressão e tentativas de purificação da mesma, estudos estruturais, modelagem por homologia, estudos de alocação ("docking") e por dinâmica molecular.

O estudo da estrutura desta proteína em comparação com a enolase presente em humanos pode ser importante na descoberta de alguma molécula capaz de inibir a ação da enolase presente em parasitas, mas tendo efeito mínimo em humanos, sendo assim, ela pode ser estudada como alvo para a descoberta de novas drogas.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Determinar experimentalmente e modelar estruturas de proteínas, bem como ligantes com potencial de interação com estas.

2.2 Específicos

- Verificar a presença de mais que um inibidor de alfa-amilase no centeio (*Secale cereale*);
- Realizar ensaios de cristalização com o(s) inibidor(es) de centeio encontrado(s);
- Determinar a estrutura de um inibidor de alfa-amilase do centeio;
- Expressar e purificar a proteína GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*;
- Modelar por homologia a estrutura de GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*;
- Expressar e purificar a enzima enolase de *Trypanosoma cruzi*;
- Modelar por homologia a estrutura da enolase de *Trypanosoma cruzi*;
- Realizar estudos estruturais por alocação e dinâmica molecular para esta proteína.

3 PARTE EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL

3.1 Materiais

Na purificação e análises das proteínas utilizaram-se: membrana de diálise (obtida de Sigma - Aldrich D9777-100FT), concentradores (Centricon), colunas (HiTrap™ IEX Selection Kit, DEAE (dietilaminoetanol) FF, 1 mL; HiTrap™ IEX Selection Kit, Q (amônio quaternário) FF, 1 mL; HiTrap™ IEX Selection Kit, CM (carboximetil) FF, 1mL; HiTrap™ IEX Selection Kit, SP (sulfopropil) FF, 1mL; Chelating HiTrap™ IEX Selection Kit; HiTrap FF Crude™ IEX Selection Kit), filtros (simples, faixa azul, membranas de ultrafiltração DIAFLO), cubeta, seringa, filtro seringa (HEXIS, 17761K), membrana de acetato celulose (HEXIS, 11107-074N) e tubos de ensaio. Já na expressão de proteínas, utilizaram-se: placas de Petri (Prolab) e erlenmeyers. Em ensaios de cristalização, foram utilizados: placas para ensaios de cristalização, lamínulas siliconizadas, graxa de silicone, pipetas (EPPENDORF) e microtubos.

3.2 Reagentes

Reagentes utilizados no preparo de soluções: a) geral: ácido fosfórico (Nuclear P.A.), ácido clorídrico (Merck P.A.), ácido acético glacial (Synth P.A.), tris-base (Fundação SARDI), sulfato de níquel (Merck P.A.), álcool etílico (Biotec P.A.), acetona (Synth P.A.), NaCl (cloreto de sódio) (Merck P. A.), CaCl₂ (cloreto de cálcio) (Nuclear), NaN₃ (azida sódica), imidazol (Vetec), Na₂HPO₄ (fosfato de sódio dibásico) (Vetec P.A.), KH₂PO₄ (fosfato de potássio monobásico) (Vetec P.A.), KCl (cloreto de potássio) (F. Maia P.A); b) Conjunto de soluções ("Grid Screen"): C₆H₈O₇ (ácido cítrico) (Merck P.A.), C₆H₁₃NO₄S.H₂O (MES - ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado) (Sigma), C₈H₁₈N₂O₄S (HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico) (Fisher Chemicals), C₆H₁₃NO₄ (BICINE (2-(Bis(2-hidroxietil)amino) ácido acético), Sigma), tris-base (Fundação SARDI); c) análises: Comassie Brilliant Blue G-250 (Acros Organics), Comassie Brilliant Blue R-250 (Isofar), C₇H₁₀N₂O₂ (bisacrilamida) (Sigma), amido (Reagen P. A.), C₁₂H₂₅NaO₄S (SDS - sulfato dodecil de sódio) (Reagen), azul de bromotimol (Vetec), Glicerol (Rea-Tech P.A.), acrilamida (Vetec), N₂H₈S₂O₈ (persulfato de amônio) (Fisher Biotech),

DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico) (Vetec), NaOH (hidróxido de sódio) (Nuclear P.A.), $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) (Dinâmica), $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$ (TEMED - 1,2-bis-etano (dimetilamino)) (Sigma), $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (glicina) (Vetec), tricina (Sigma); d) expressão de proteínas: extrato de levedura (Biobrás), triptona e NaCl (cloreto de sódio) (Merck P. A.), IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo), ampicilina e e) purificação de proteínas: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio) (Merck P. A.).

3.3 Equipamentos

Utilizados em: a) purificação de proteínas: multiprocessador ARNO, centrífuga (HITACHI, himac CR21GII), câmara de ultrafiltração, cromatógrafo líquido (GE, Äkta Purifier); b) expressão de proteínas: sonicador, shaker (MARCONI); c) análise: cuba de eletroforese (Bio-Rad), espectrofotômetro (Cary50/Varian); d) cálculos computacionais: cluster (Silicon Graphics, Altix XE 1300), computador pessoal.

3.4 Base de dados

Utilizados em: a) busca de potenciais ligantes: ZINC (ZINC..., 2011); b) Alinhamento de sequências: NCBI (NCBI..., 2011); c) estrutura de proteínas: PDB "Protein Data Bank" (PROTEIN..., 2011).

3.5 Programas e Sites Acessados

Utilizados em: a) precipitação fracionada: "Ammonium Sulfate Calculator" (Ammonium..., 2011); b) Alinhamento de sequências: ClustalW2 - "Multiple Sequence Alignment" (ClustalW2..., 2011); MHOLline (GMMSB..., 2011), BLAST (BLAST..., 2012); "EMBOSS Stretcher - Alignment" (EMBOSS Stretcher..., 2011); Aline (Aline: An..., 2011) c) Modelagem por homologia: MODELLER (ESWAR, N. et al, 2006); d) Trabalho cristalográfico: pacote CCP4 (Collaborative..., 2011) com seus componentes Phaser, REFMAC (Programa de Refinamento Macromolecular), chainsaw, coot, procheck (LASKOWSKI et al., 1993); XDS (X-ray Detector Software) (XDS Program..., 2011); PyMOL (Pymol..., 2011); MolProbity (CHEN et al., 2009); e) Alocação: AutoDock (GOODSELL, 1996), VEGA zz (VEGA ZZ..., 2011) e f) dinâmica molecular: Amber (Assisted Model..., 2011), AutoDock (GOODSELL, 1996).

3.6 Métodos

3.6.1 Inibidor de Alfa-amilase do Centeio (*Secale Cereale*)

3.6.1.1 Métodos de Purificação

3.6.1.1.1 Obtenção do Extrato Inicial

Foram purificados três lotes de inibidores de alfa-amilase, sendo que no primeiro e no segundo lote a massa de sementes utilizadas foi de 496 g e 542 g, respectivamente. Como o método geral utilizado foi o mesmo, abaixo tem-se a descrição de como se obtiveram os inibidores somente para o terceiro lote de purificação realizado, que é o mais representativo.

As sementes de centeio do cultivar CENT BR 1, BL 5 F, lote 361/09, foram obtidas da EMBRAPA TRIGO, Passo Fundo/RS (Embrapa..., 2010). Para a preparação inicial do extrato bruto foram moídos 992 gramas de sementes de centeio até se obter uma farinha utilizando-se um multiprocessador. Adicionaram-se aos 992 gramas obtidos de farinha de centeio, 1503 mL de uma solução de etanol 70% (v/v). A mistura foi agitada por um agitador magnético por três horas, após isso foi levada para centrifugação. A centrifugação ocorreu por 1 hora a 4 °C, a 10000 g.

Separou-se o sobrenadante do precipitado e guardaram-se alíquotas de ambos para análises posteriores. O sobrenadante foi aquecido por 1 hora a 70 °C utilizando-se um aquecedor. Foi novamente submetido à centrifugação por 1 hora a 4 °C, a 10000 g, guardando-se alíquotas do sobrenadante e da fase coagulada.

3.6.1.1.2 Diálise

O extrato obtido foi submetido à diálise para que houvesse a troca do etanol 70% para o tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 6,9. Cada troca de solvente, no total de 3, ocorreu a 4 °C por uma noite. Ao final, a solução de dentro da membrana contendo os inibidores de alfa-amilase era submetida a uma centrifugação por 1 hora a 9400 g, para eliminar o precipitado formado. Alíquotas foram guardadas para análises posteriores.

3.6.1.1.3 Precipitação Fracionada

Utilizando-se o "Ammonium Sulfate Calculator" (EnCor Biotechnology Inc.), calculou-se a quantidade de sulfato de amônio necessária para a realização de uma precipitação fracionada de 0-20% de saturação a 4 °C; deixou-se uma noite em repouso. No dia seguinte, centrifugou-se a solução por 30 minutos a 9400 g, guardaram-se alíquotas para análises posteriores e prosseguiu-se a precipitação, agora entre 20-50% de saturação, com o sobrenadante recolhido, repetindo-se o procedimento anterior.

O precipitado obtido nessa faixa de saturação, contendo os inibidores de alfa-amilase do centeio, foi redissolvido em tampão fosfato e submetido a diálises para a retirada do sal, obtendo-se, assim, uma solução para a realização de mais uma etapa de purificação: a cromatografia aniônica.

3.6.1.1.4 Cromatografia

3.6.1.1.4.1 Cromatografia Aniônica

O extrato obtido após a precipitação fracionada foi submetido a cromatografias. Para a realização das cromatografias de troca aniônica, usaram-se as colunas carregadas positivamente, contendo as resinas DEAE Sepharose Fast Flow e Q Sepharose Fast Flow, até mesmo para se comparar a capacidade de separação das duas. A cromatografia era iniciada aplicando-se o eluente tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, depois aplicava-se o tampão fosfato 200 mmol L⁻¹ e por último um gradiente envolvendo o tampão fosfato 200 mmol L⁻¹ e este acrescido de 2 mol L⁻¹ de NaCl. A pressão utilizada foi 0,1 MPa e o fluxo 1 mL min⁻¹. Foram realizadas um total de 68 cromatografias de troca aniônica, utilizando-se um volume de amostra de 1 mL em cada uma. A fração recolhida em cada tubo foi de 1 mL.

3.6.1.1.4.2 Cromatografia Catiônica

Os três conjuntos obtidos com a mistura das frações na cromatografia aniônica foram concentrados usando-se uma câmara de concentração aonde também se trocou o tampão fosfato para tampão acetato 50 mmol L⁻¹, pH 5,0. A

troca de tampão foi necessária para que os conjuntos obtidos fossem submetidos a cromatografias de troca catiônica e assim se tivesse melhor perspectiva de separação.

Já com os conjuntos concentrados e em tampão acetato 50 mmol L⁻¹, realizaram-se as novas cromatografias. As resinas contidas nas colunas utilizadas para a realização destas foram a SP Sepharose Fast Flow e a CM Sepharose Fast Flow, carregadas negativamente. Na realização das cromatografias usou-se a pressão de 0,1 MPa, um fluxo de 1 mL min⁻¹ e o volume de amostra aplicado foi de 1 mL. A cromatografia era iniciada aplicando-se inicialmente o eluente tampão acetato 50 mmol L⁻¹, depois tampão acetato 500 mmol L⁻¹ e por último um gradiente envolvendo este tampão acrescido de 2 mol L⁻¹ de NaCl.

Para o conjunto A realizaram-se 9 cromatografias, para o conjunto B 4 e para o conjunto C 5 cromatografias.

3.6.1.2 Métodos Analíticos dos Inibidores de Alfa-amilase do Centeio (*Secale Cereale*)

3.6.1.2.1 Eletroforese

Realizaram-se eletroforeses de todas as soluções e precipitados obtidos em cada etapa para ver como estava a purificação do inibidor de alfa-amilase do centeio (*Secale Cereale*), usando-se gel de tricina 16% com uma tensão constante de 170 V por aproximadamente 1 hora e 20 minutos. Também, fez-se uma eletroforese usando-se o método não desnaturante de Ornstein-Davis (ORNSTEIN-DAVIS, 1964), isto é, com as proteínas nativas.

Para a coloração do gel usou a solução de corante Comassie Blue R-250, onde o gel foi deixado por 30 minutos; já para descolorir, usou-se uma solução de ácido acético 7%, até que o gel estivesse praticamente transparente no fundo.

3.6.1.2.2 Dosagem Protéica

Para a dosagem protéica utilizou-se o método de Bradford (1976), que foi realizado com todas as amostras obtidas durante o procedimento. O ensaio foi

realizado em triplicata e algumas amostras precisaram ser diluídas para que seus valores fossem coerentes com a curva padrão.

As absorbâncias foram medidas com o espectrofotômetro após 15 minutos da preparação. Com os resultados obtidos construiu-se a curva padrão e calculou-se a melhor reta por mínimos quadrados, para assim se estimar a concentração de proteína. Por meio dos resultados obtidos, construiu-se uma tabela de purificação.

3.6.1.2.3 Determinação da Atividade Inibitória da Alfa-amilase

3.6.1.2.3.1 Método de Bernfeld

Para testar a presença de inibidores de alfa-amilase nas amostras obtidas durante a extração e purificação, o método de Bernfeld foi utilizado, com as seguintes soluções: ASH (amilase salivar humana, preparada segundo o método descrito no artigo de Bernfeld, 1955), tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 6,9 contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2 e 38 mol L^{-1} de NaCl, amido de uso diário 1% e DNS 1% (ácido-3-5-dinitrosalicílico).

Inicialmente incubaram-se por 20 minutos a 37°C , em tubos de ensaio, $100 \mu\text{L}$ de cada amostra juntamente com $100 \mu\text{L}$ de uma solução de ASH e $800 \mu\text{L}$ de tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH 6,9. Os tubos que continham o controle tinham $900 \mu\text{L}$ de tampão fosfato e $100 \mu\text{L}$ de ASH, enquanto que o branco apenas $1000 \mu\text{L}$ de tampão fosfato. Decorridos 20 minutos, adicionaram-se aos tubos 1 mL de solução de amido e após 5 minutos parou-se a reação com 2 mL de solução de DNS. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100°C por 5 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata e as absorbâncias a 540 nm foram lidas.

O controle serviu como parâmetro para o cálculo da porcentagem de inibição. Foi considerado que o controle possuía 100% de atividade de alfa-amilase. Os resultados foram expressos em unidades inibitórias de alfa-amilase (1UIA), que correspondeu a 50 % de inibição de alfa-amilase nas condições do ensaio (KONDO, 1991) em relação ao controle.

A atividade específica de inibição foi definida como a razão entre atividade inibitória total e a massa de proteína total.

Os resultados obtidos compuseram a tabela de purificação.

3.6.1.2.3.2 Método de Caraway adaptado

Outro método utilizado para a determinação da atividade inibitória de algumas amostras obtidas foi o método de Caraway adaptado, as soluções necessárias para a realização deste foram: substrato de amido (contendo fosfato monoácido de sódio, ácido benzóico e amido), solução estoque de iodo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (contendo iodato de potássio, iodeto de potássio e ácido clorídrico) para a preparação da solução de uso diário de iodo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (contendo fluoreto de potássio e a solução de estoque de iodo).

Em um béquer o substrato de amido foi colocado em banho-maria por 5 minutos para a estabilização da temperatura. Adicionaram-se $10 \mu\text{L}$ de cada amostra nos tubos, $10 \mu\text{L}$ de ASH 1:100 (volume de solução estoque ASH : volume final de ASH juntamente com tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH 6,9) e $500 \mu\text{L}$ do substrato do amido, deixou-se em banho-maria por 7 minutos e 30 segundos. Após esse tempo, adicionaram-se $500 \mu\text{L}$ de solução de uso de iodo, posteriormente, adicionaram-se 4 mL de água em cada tubo e as absorbâncias foram medidas a 660 nm . Dois tubos foram feitos para posterior comparação, um sem amostra e sem ASH (branco) e o outro sem amostra e com $10 \mu\text{L}$ de ASH (controle). Compararam-se os valores obtidos para as amostras com os controles.

3.6.1.3 Cristalização de Proteína através de Difusão de Vapor por Gota Suspensa

Concentraram-se as amostras de inibidores de alfa-amilase do centeio que apresentaram atividade inibitória e montaram-se sistemas de cristalização do tipo gota suspensa. Preparou-se um conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio, cujas soluções estoques utilizadas foram: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ácido cítrico pH 4,0; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ácido cítrico pH 5,0; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ MES monohidratado pH 6,0; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HEPES pH 7,0; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Tris pH 8,0; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ BICINE pH 9,0; água ultra pura e cloreto de sódio $4,45 \text{ mol L}^{-1}$.

Após distribuir cada solução em seus respectivos poços que constituem a placa de cristalização, conforme as figuras 15 (esta placa foi repetida duas vezes, a primeira vez com a amostra de proteína menos concentrada e a segunda vez com a proteína mais concentrada), 16 e 17, colocou-se uma camada de graxa de silicone nas bordas dos poços. Em cada lamínula siliconizada, foram pipetados $4 \mu\text{L}$ da

solução de proteína e sobre esta foram acrescentados 4 μL da solução presente em cada reservatório (solução-mãe). Os poços (contendo 1 mL) foram fechados com suas respectivas lamínulas, proporcionando assim o sistema fechado para dar início ao processo de difusão de vapor. A temperatura em que foi realizado o ensaio de cristalização foi de 18 °C.

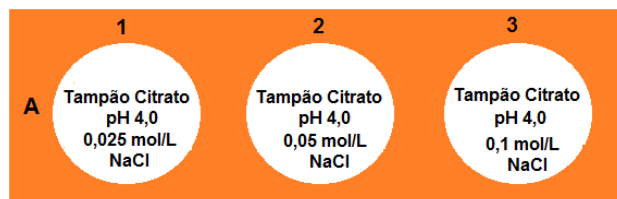
Figura 15: Conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio realizado duas vezes para o conjunto A2 contendo os inibidores de alfa-amilase do centeio (3 mg mL⁻¹), 101 μL no primeiro ensaio e (9 mg mL⁻¹), 140 μL no segundo ensaio.

	1	2	3	4	5	6
A	Tampão Citrato pH 4,0 0,2 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 1 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 5,0 1 mol/L NaCl	Tampão MES pH 6,0 1 mol/L NaCl	Tampão HEPES pH 7,0 1 mol/L NaCl	Tampão Tris pH 8,0 1 mol/L NaCl
B	Tampão Citrato pH 4,0 0,4 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 2 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 5,0 2 mol/L NaCl	Tampão MES pH 6,0 2 mol/L NaCl	Tampão HEPES pH 7,0 2 mol/L NaCl	Tampão Tris pH 8,0 2 mol/L NaCl
C	Tampão Citrato pH 4,0 0,6 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 3 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 5,0 3 mol/L NaCl	Tampão MES pH 6,0 3 mol/L NaCl	Tampão HEPES pH 7,0 3 mol/L NaCl	Tampão Tris pH 8,0 3 mol/L NaCl
D	Tampão Citrato pH 4,0 0,8 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 4 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 5,0 4 mol/L NaCl	Tampão MES pH 6,0 4 mol/L NaCl	Tampão HEPES pH 7,0 4 mol/L NaCl	Tampão Tris pH 8,0 4 mol/L NaCl

Figura 16: Conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio realizado para o conjunto A2 contendo os inibidores de alfa-amilase do centeio (9 mg mL⁻¹), 30 μL .

	1	2	3	4
A	Tampão Citrato pH 4,0 0,05 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 0,1 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 0,15 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 0,2 mol/L NaCl
B	Tampão Citrato pH 4,0 0,25 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 0,3 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 4,0 1 mol/L NaCl	Tampão Citrato pH 5,0 1 mol/L NaCl

Figura 17: Conjunto de soluções ("grid screen") com cloreto de sódio realizado para o conjunto B2 contendo os inibidores de alfa-amilase do centeio (3 mg mL^{-1}), $17 \mu\text{L}$.



3.6.1.4 Difração de Raios X para os Inibidores de Alfa-amilase

A difração de raios X dos cristais obtidos foi realizada no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas - SP), na estação W01B-MX2 (5-15 keV, 0.8-2.5 Å), fonte Wiggler multipolar de 2T, com espelho colimador vertical, monocromador de cristal duplo de Si (111) e espelho focalizador toroidal, detector MarMosaic 225 (CCD com área de 225x225 mm²) em uma mesa MadDTB com 2θ variando de 0 a 30° e sistema criogênico Oxford Nitrogen Cryojet XL.

As imagens do cristal geminado posteriormente utilizadas também foram obtidas no LNLS, mas na antiga estação CPr com o detector MAR345 e comprimento de onda 1,535 Å.

3.6.1.5 Processamento de Imagens de Difração

3.6.1.5.1 Indexação e Integração de Intensidades

Como não se obtiveram bons padrões de difração para os cristais obtidos, utilizaram-se as imagens obtidas em 2004, porém de cristais geminados. O programa xds do pacote XDS (XDS Program..., 2011) foi utilizado com auxílio dos scripts feitos por Iulek (Uepg's protein..., 2011).

3.6.1.5.2 Escalonamento

O escalonamento foi realizado usando o programa xscale do pacote XDS (XDS Program..., 2011). Também se contou com auxílio dos scripts feitos por Iulek (Uepg's protein..., 2011).

3.6.1.6 Preparação de Modelos para Substituição Molecular

Para busca de sequências similares ao inibidor de alfa-amilase e cuja estrutura estivesse resolvida, utilizou-se a ferramenta BLAST (BLAST..., 2012) selecionando-se como banco de dados o PDB. Através do programa Chainsaw prepararam-se modelos para a substituição molecular, utilizando-se várias sequências prováveis (obtidas no NCBI), inclusive uma obtida anteriormente em colaboração com a Unviersidad Morelos de Cuernavaca (México) baseada no próprio inibidor purificado num lote anterior fornecido pelo laboratório.

3.6.1.7 Substituição Molecular

O software cristalográfico utilizado na substituição molecular foi o Phaser.

3.6.1.8 Refinamento

Após definir os mais prováveis grupos espaciais ($P3_1$ e $P3_121$), realizaram-se refinamentos nestes utilizando-se o programa REFMAC e avaliou-se qual grupo espacial e sequência de aminoácidos mais prováveis mediante o valor do índice R.

Procurou-se complementar os modelos com o programa ARP/WARP, no que não se foi bem sucedido em nenhum caso.

Os modelos foram refinados num processo iterativo, utilizando-se o programa gráfico COOT e o próprio REFMAC.

3.6.1.9 Validação

Validou-se a estrutura através do programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e do website MOLPROBITY (CHEN et al., 2009).

3.6.2 GTPase (YchF) e enolase de *Trypanosoma cruzi*

3.6.2.1 Expressão de Proteínas e Estudos Computacionais

Os plasmídeos contendo as proteínas GTPase YchF e enolase de *Trypanosoma cruzi* foram obtidas através do Dr. Stenio Perdigão Fragoso, da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), no Instituto Carlos Chagas em Curitiba - Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

3.6.2.1.1 Expressão da proteína GTPase YchF

A GTPase YchF foi inserida em um plasmídeo pTrcHIS-TOPO (Invitrogen, Inc.). Através deste, a proteína é produzida apresentando uma cauda de seis resíduos de histidina na porção amino terminal, o que facilita a purificação através da cromatografia de afinidade.

Fez-se um pré-inóculo cultivando os clones recombinantes em 10 mL de LB (meio de cultura Luria-Bertani), durante 18 horas a 37 °C. Em seguida, diluiu-se 0,7 mL do pré-inóculo em um volume de 70 mL de LB (1:100), adicionado-se também 35 µL de ampicilina. Incubou-se novamente até que a D.O (densidade ótica) a 660 nm atingisse 0,6 (cerca de três horas), para posteriormente induzir a expressão adicionando 1 mmol L⁻¹ de IPTG à cultura, mantendo-a sob agitação e a temperatura de 37 °C por três horas. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos; para a coleta das bactérias, estas foram ressuspensas no tampão Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,0 e NaCl 0,5 mol L⁻¹ e lisadas por sonicação (10 vezes por 30 segundos), em banho de gelo, para o rompimento das mesmas. Após isso, realizou-se uma nova centrifugação a 10000 g por 15 minutos e coletou-se o sobrenadante.

Para testar-se se haveria uma maior produção de proteína, utilizou-se uma temperatura mais baixa (20 °C) para expressar a proteína, repetindo praticamente o mesmo procedimento descrito acima, mudando somente o tempo de expressão para 16 horas. Para verificar a expressão da GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*, usou-se eletroforese em gel de tricina 10%, com uma tensão constante de 170 V por aproximadamente 50 minutos.

Os sobrenadantes coletados foram dialisados e submetidos a cromatografias na coluna carregada com níquel, (Chelating HiTrap), usando-se o tampão tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,0 e a solução de imidazol 0,5 M para as misturas necessárias e gradiente. Inicialmente passou-se um volume de 9 mL de tampão tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,0, posteriormente, esta com 0,1 mmol L⁻¹ de imidazol foi aplicado por 5 minutos, em seguida, 40 mmol L⁻¹ de imidazol por mais 5 minutos; após isso, iniciou-

se um gradiente até chegar a imidazol $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, recolhendo-se 1 mL por tubo. A segunda cromatografia realizada seguiu praticamente os mesmos parâmetros da primeira, mudando somente o tempo de aplicação de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de imidazol, que nesta foi de 10 minutos.

Géis de eletroforese foram feitos para se verificar a purificação.

3.6.2.1.2 Expressão da Proteína Enolase

A enolase foi inserida no vetor pQE-30 (Quiagen), através do qual a proteína é produzida com uma cauda de 6 resíduos de histidina na porção amino terminal, facilitando a purificação através da cromatografia de afinidade.

Fez-se um pré-inóculo cultivando os clones recombinantes em 10 mL de LB (meio de cultura Luria-Bertani), durante 18 horas a 37°C . Em seguida, diluiu-se 0,7 mL do pré-inóculo em um volume de 70 mL de LB (1:100), adicionado-se também 35 μL de ampicilina. Incubou-se novamente até que a D.O (densidade ótica) a 660 nm atingisse 0,6 (cerca de três horas), para posteriormente induzir a expressão adicionando 2 mmol L^{-1} de IPTG à cultura, mantendo-a sob agitação e a temperatura de 37°C por três horas. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos; para a coleta das bactérias, estas foram ressuspensas no tampão PBS pH 7,4 e lisadas por sonicação (10 vezes por 30 segundos), para o rompimento das mesmas. Após isso, realizou-se uma nova centrifugação a 10000 g por 15 minutos e coletou-se o sobrenadante.

Para testar-se se haveria uma maior produção de proteína, utilizou-se uma temperatura mais baixa (20°C) para expressar a proteína, repetindo praticamente o mesmo procedimento descrito acima, mudando somente o tempo de expressão para 16 horas. Para verificar a expressão da enolase de *Trypanosoma cruzi*, usou-se eletroforese em gel de tricina 10%, com uma tensão constante de 170 V por aproximadamente 50 minutos.

Os sobrenadantes coletados foram dialisados e submetidos a cromatografias na coluna carregada com níquel, Chelating HiTrap TM, 1mL, e na coluna HiTrap FF Crude, usando-se o tampão PBS pH 7,4 e a solução de imidazol 0,5 M para as necessárias misturas e gradiente. Inicialmente passou-se um volume de 9 mL de tampão PBS pH 7,4, posteriormente, o mesmo com $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de imidazol foi aplicado por 5 mL, em seguida, aplicou-se 40 mmol L^{-1} de imidazol por mais 5 mL,

após isso, iniciou-se um gradiente até chegar a imidazol $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, recolhendo-se 1 mL por tubo. A segunda cromatografia foi seguida utilizando-se os mesmos parâmetros da primeira, mudando somente a coluna para a Crude FF. Já terceira cromatografia foi realizada com a coluna da primeira cromatografia com a aplicação das soluções de forma mais lenta, e recolhendo-se 0,25 mL de solução por tubo.

Géis de eletroforese foram feitos para se verificar a purificação.

3.6.2.2 Alinhamento de Seqüências de Aminóácidos de Proteínas para Modelagem por Homologia

Selecionaram-se as seqüências similares às que seriam modeladas, por meio da ferramenta BLAST (BLAST..., 2012) e do MHOLline. As seqüências selecionadas foram alinhadas através do programa clustal W.

3.6.2.3 Modelagem por Comparação (Homologia) e Validação

A modelagem foi feita através do programa MODELLER (ESWAR, N. et al, 2006). A validação dos modelos obtidos para GTPase YchF e enolase de *Trypanosoma cruzi* foi feita através do programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993).

3.6.2.4 Alocação ("Docking")

Fez-se uma busca de ligantes para a proteína enolase de *Homo sapiens* e *Trypanosoma cruzi* usando a base de dados PDB. Buscaram-se similares ao PAH (ácido fosfanoacetohidroxâmico) com a base de dados ZINC e também se planejaram alguns ligantes, que poderiam interagir mais especificamente com a enolase de *Trypanosoma cruzi* do que com a enolase de *Homo sapiens*. A alocação desses ligantes no sítio ativo das proteínas deu-se através do programa AutoDock (GOODSELL, 1996). Os ligantes foram projetados no programa VEGA ZZ, gravados no formato sybyl mol2 e tiveram sua carga atribuída pelo método bcc como implementado no módulo antechamber do ambertools. Posteriormente, tiveram sua energia minimizada pelo AMBER (Assisted Model..., 2011), antes de serem submetidos à alocação.

3.6.2.5 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular foi feita para as proteínas enolase de *Homo sapiens* e enolase de *Trypanosoma cruzi*, por meio do programa AMBER (Assisted Model..., 2011) usando-se seus acessórios que fazem parte do pacote Ambertools. O campo de força ff99SB foi utilizado para a parte protéica (ABEL, et al 2006) enquanto que o campo de força gaff foi utilizado para os ligantes. O modelo foi colocado numa caixa de água octogonal com borda mínima de 8 Å. Após, contra-íons foram adicionados para tornar o sistema eletricamente neutro. Inicialmente, o modelo teve energia minimizada com fortes restrições dos átomos protéico e do ligante por 10000 ciclos a temperatura reduzida, o que foi seguido por uma minimização de energia global. O sistema foi então aquecido de 0 a 300 K por 50 ps, o que foi seguido por 50 ps de dinâmica a 300 K com restrições posicionais fracas. Finalmente, uma dinâmica produtiva por 2 ns foi realizada, dividida em 4000 passos.

3.6.2.6 Estimativa de Energias de Associação (MM/GBSA)

A estimativa de energias de associação (MM/GBSA) foi feita por meio do AMBER (Assisted Model..., 2011) e ambertools. Da dinâmica produtiva, a energia de ligação (ΔG°) foi calculada a cada 10 passos, ou seja, um total de 400 estimativas de energia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

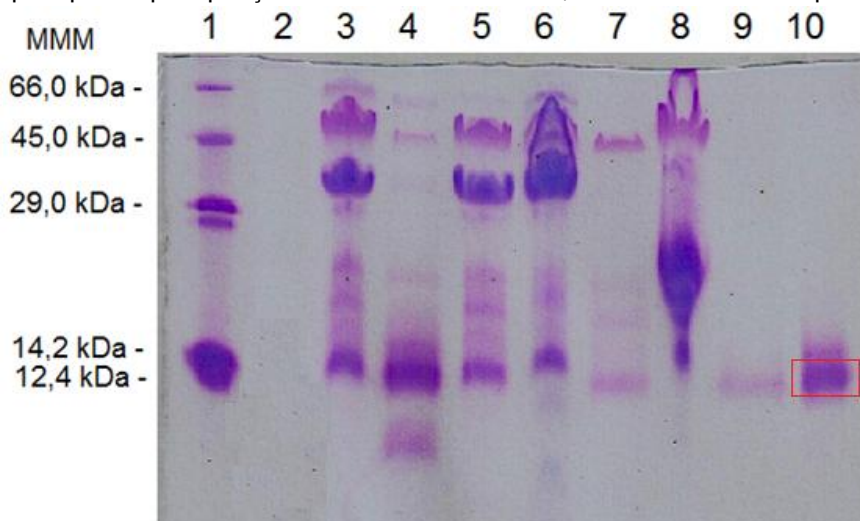
4.1 Inibidor de Alfa-amilase do Centeio (*Secale cereale*)

Com o objetivo de obter inibidores de alfa-amilase de centeio isolados, após a moagem das sementes e obtenção do extrato bruto, várias etapas de purificação foram realizadas; os resultados são apresentados na sequência para o terceiro lote de purificação realizado por este ser o mais representativo, com maior quantidade de amostra utilizada para a obtenção do extrato bruto e com resultados mais coerentes.

Após moagem das sementes, extração bruta e centrifugação, obteve-se 645 mL de extrato bruto. Após aquecimento e nova centrifugação, obteve-se 470 mL de uma solução mais clarificada. Depois da diálise para a troca de tampão, a próxima etapa foi à precipitação fracionada, inicialmente de 0-20%, resultando em volume de 573 mL e posteriormente de 20-50%, resultando em um volume de 620 mL. O precipitado obtido nessa etapa é que continha os inibidores de alfa-amilase do centeio, ele foi redissolvido em tampão fosfato, resultando em um volume de 95 mL.

Para a caracterização das amostras obtidas até o momento, realizou-se uma primeira eletroforese (figura 18).

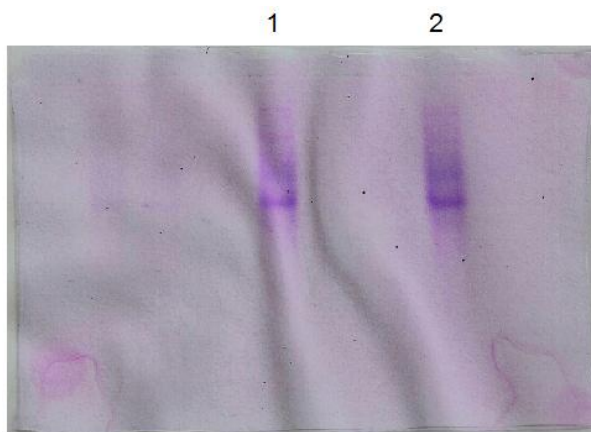
Figura 18: Gel de eletroforese das amostras de proteínas de centeio obtidas após algumas etapas de purificação, destacando-se o poço 10 com a proteína já relativamente purificada. Poço 1: padrão de massa molecular, poço 2: não utilizado, poço 3: extrato bruto após centrifugação, poço 4: precipitado após aquecimento e centrifugação, poço 5: sobrenadante após aquecimento e centrifugação, poço 6: sobrenadante após diálise 1, poço 7: precipitado após precipitação fracionada de 0-20%, poço 8: sobrenadante precipitação fracionada de 0-20%, poço 9: sobrenadante precipitação fracionada de 20-50%, poço 10: precipitado precipitação fracionada de 20-50%, redissolvido em tampão fosfato.



O gel mostra que inicialmente havia várias proteínas diferentes, que foram sendo eliminadas em cada etapa de purificação, restando ao final, como mostra a banda no poço 10 do gel da figura 18, a proteína de interesse já relativamente purificada, com massa molecular de aproximadamente 13 kDa.

O gel seguinte, figura 19, mostra uma eletroforese em gel nativo pelo método de Ornstein-Davis (Ornstein-Davis, 1996), no qual foi aplicado o precipitado obtido com a precipitação fracionada de 20-50% redissolvido em tampão fosfato. Através deste, que também separa por cargas, observa-se que não há somente uma proteína presente nesta amostra, assim, concluiu-se que mais etapas de purificação seriam necessárias.

Figura 19: Eletroforese (método Ornstein-Davis), realizada para o precipitado obtido com a precipitação fracionada de 20-50%, redissolvido em tampão fosfato, evidenciando que a separação por cargas pode indicar a presença de mais de uma proteína com peso molecular de aproximadamente 13 kDa.



Baseado nesta informação, os 95 mL de amostra parcialmente purificada foram submetidos às cromatografias de troca aniônica.

Foram realizadas 68 cromatografias com esta amostra, todas com resultados muito parecidos, mesmo quando a resina que estava sendo utilizada, DEAE (dietilaminoetanol) Sepharose Fast Flow (trocador fraco), foi trocada pela Q Sepharose Fast Flow (trocador forte). As figuras 20, 21 e 22 apresentam os três cromatogramas de troca aniônica, que são representativos de todas as 68 cromatografias feitas, com ligeiras diferenças quanto a um ou outro pico por apresentar uma separação maior.

Figura 20: Cromatograma obtido para o precipitado da precipitação fracionada 20-50%, redissolvido em tampão fosfato.

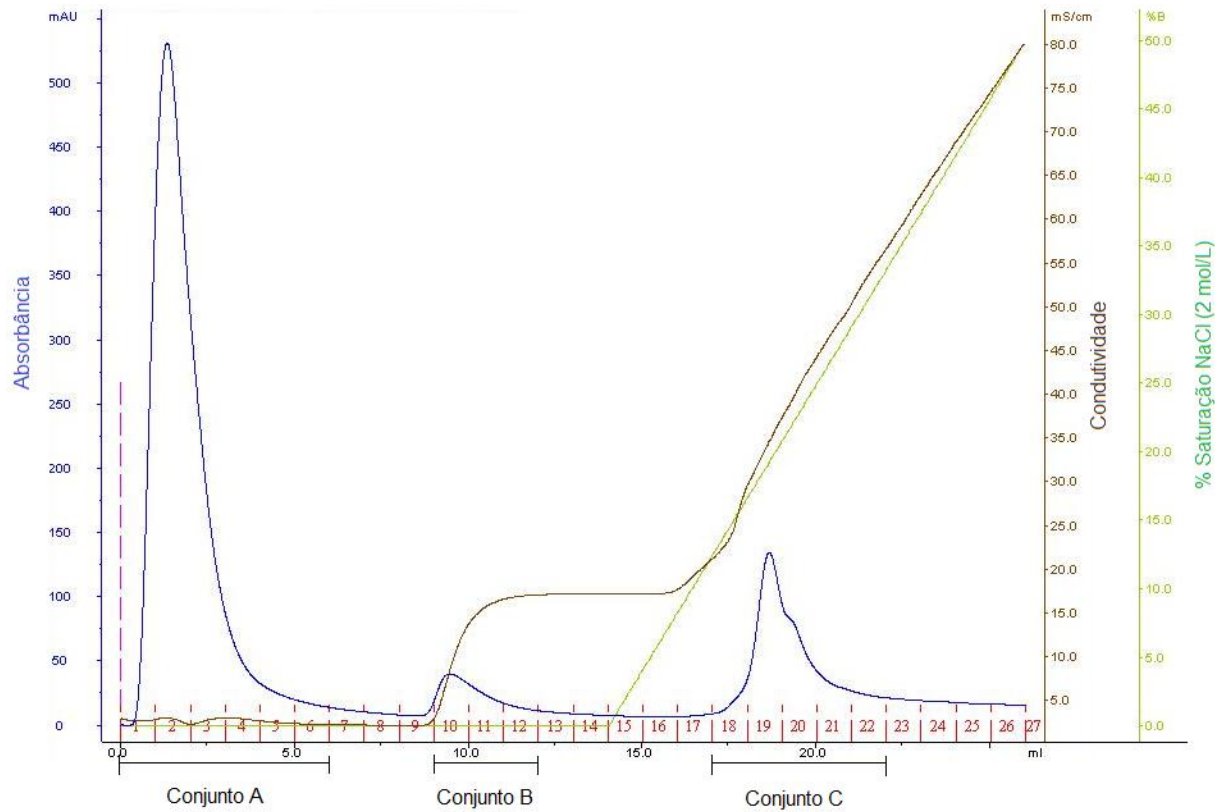


Figura 21: Cromatograma obtido para o precipitado da precipitação fracionada 20-50%, redissolvido em tampão fosfato.

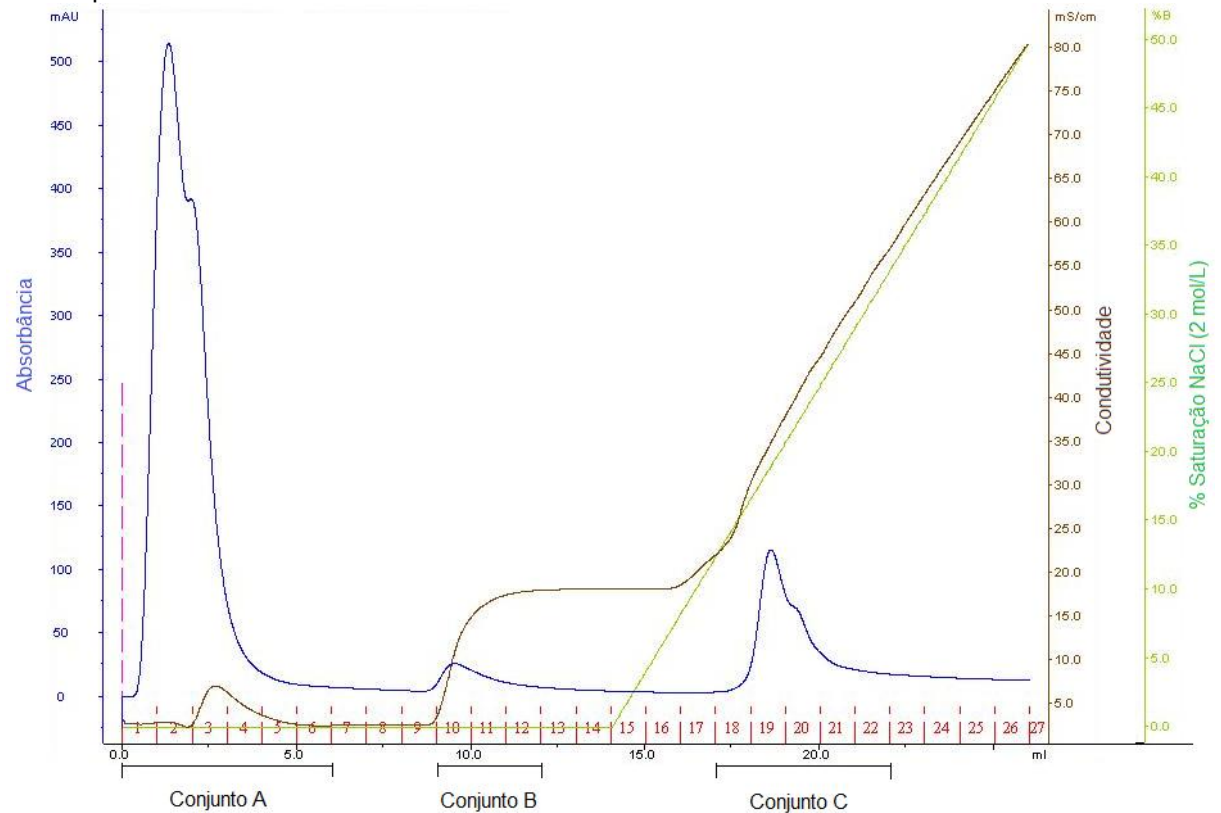
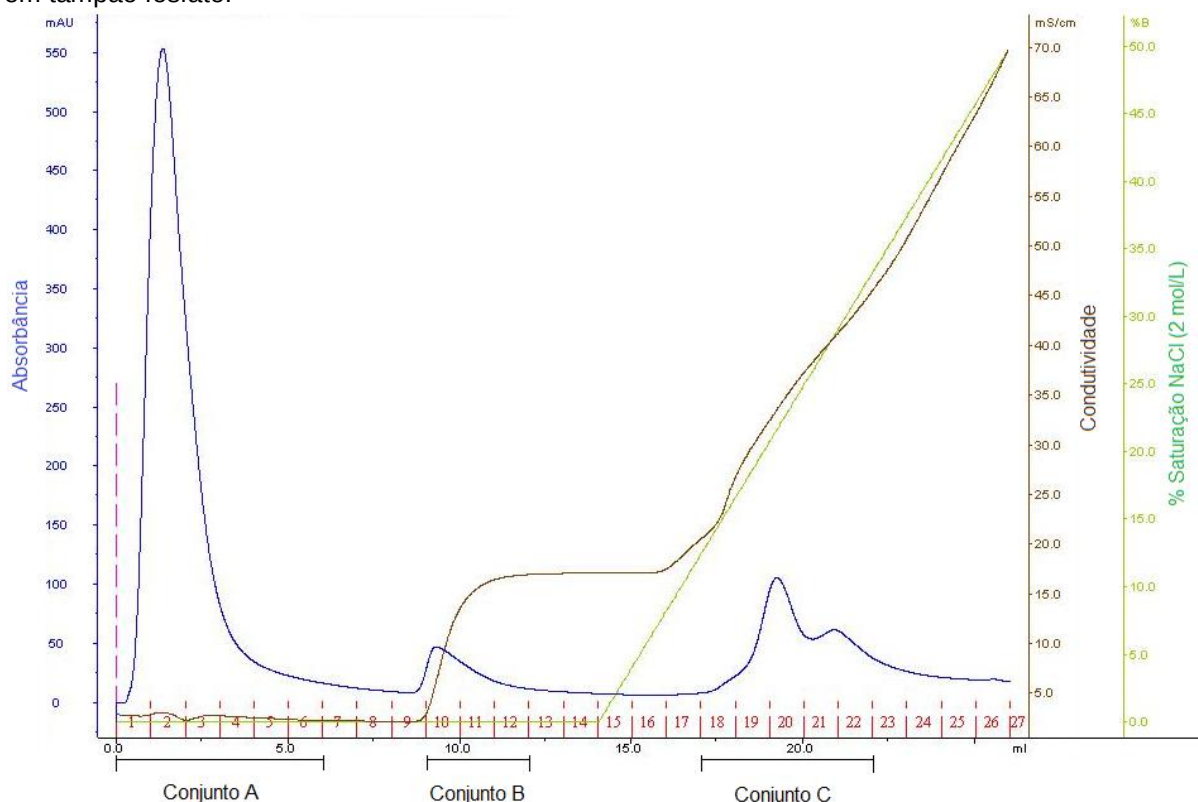


Figura 22: Cromatograma obtido para o precipitado da precipitação fracionada 20-50%, redissolvido em tampão fosfato.

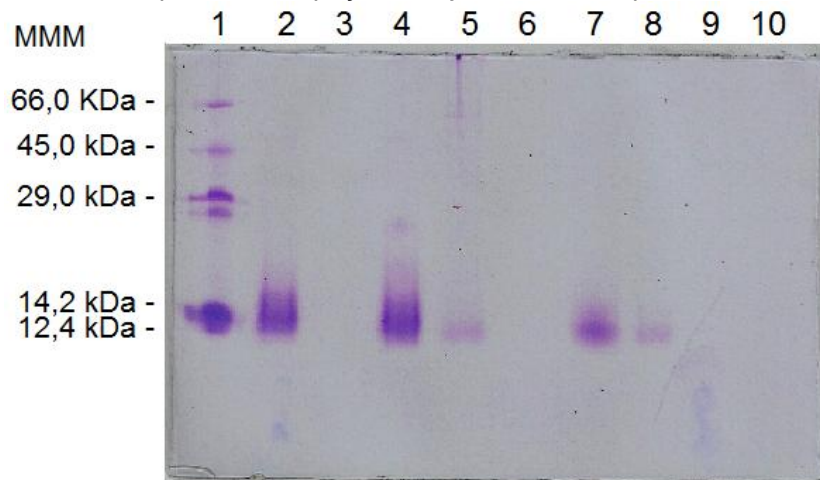


Cada pico do cromatograma representou um conjunto obtido, sendo assim, obteve-se então o conjunto A (402 mL), o conjunto B (199 mL) e o conjunto C (330 mL), soma de volumes de todas as 68 cromatografias. Observando-se os cromatogramas (figuras 20, 21 e 22), pode-se notar que alguns desses conjuntos, se dividiam parcialmente em dois picos indicando que não estavam totalmente puros. Isso já indica que outra cromatografia precisa ser realizada.

Concentrou-se e trocou-se o tampão das frações obtidas com a cromatografia de troca aniônica para tampão acetato 50 mmol L⁻¹. O volume do conjunto A foi reduzido a 15 mL, do conjunto B a 7 mL e do conjunto C a 8 mL.

Realizou-se o gel observado na figura 23, para verificar a purificação das amostras obtidas até o momento. Nota-se nos poços 7 e 8 que os conjuntos A e B (que estão em tampão acetato), respectivamente, têm massas moleculares de aproximadamente 13 kDa. Estes conjuntos foram os submetidos a cromatografias catiônicas.

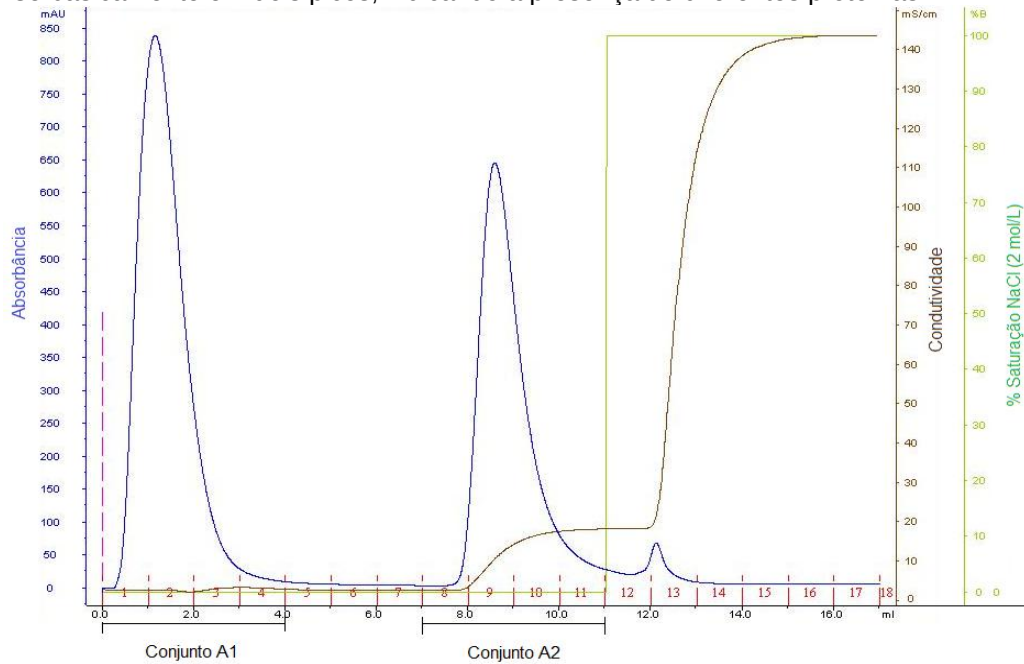
Figura 23: Gel de eletroforese para amostras obtidas após a cromatografia aniônica, com bandas em aproximadamente 13 kDa. Poço 1: marcador de massa molecular (MMM), poço 2 e 3: precipitado e sobrenadante precipitação fracionada de 20-50%, redissolvido em tampão fosfato, respectivamente, poço 4: conjunto A concentrado em tampão fosfato, poço 5: conjunto B concentrado em tampão fosfato, poço 6: conjunto C concentrado em tampão fosfato, poço 7: conjunto A em tampão acetato, poço 8: conjunto B em tampão acetato, poço 9: conjunto C em tampão acetato.



Assim, realizou-se a cromatografia de troca catiônica, para verificar se seria possível mais alguma separação.

Os cromatogramas obtidos para o conjunto A, mesmo quando a coluna contendo a resina SP Sepharose Fast Flow (HiTrap IEX Selection Kit, SP FF, 1mL) foi trocada pela CM Sepharose Fast Flow (HiTrap IEX Selection Kit, CM FF, 1mL), foram todos muito semelhantes, por isso um único cromatograma representativo para todas as 9 cromatografias está ilustrado na figura 24. Percebe-se que o conjunto A dividiu-se em dois picos, cada pico representa um conjunto, sendo assim obteve-se o conjunto A1 e o conjunto A2.

Figura 24: Cromatograma obtido para a cromatografia catiônica do conjunto A, (o gradiente final foi abandonado após a primeira cromatografia, já que não produzia nenhuma separação). O conjunto A separou-se basicamente em dois picos, indicando a presença de diferentes proteínas.



O conjunto B e o conjunto C também foram submetidos às cromatografias de troca catiônica (figura 25 e figura 26, respectivamente), separando-se em três picos, chamados B1, B2, e C1.

Figura 25: Cromatograma obtido para a cromatografia catiônica do conjunto B (o gradiente final foi abandonado após a primeira cromatografia, já que não produzia nenhuma separação). O Conjunto B separou-se em dois picos. As frações 12 e 13 não foram consideradas devido à pequena quantidade de proteína.

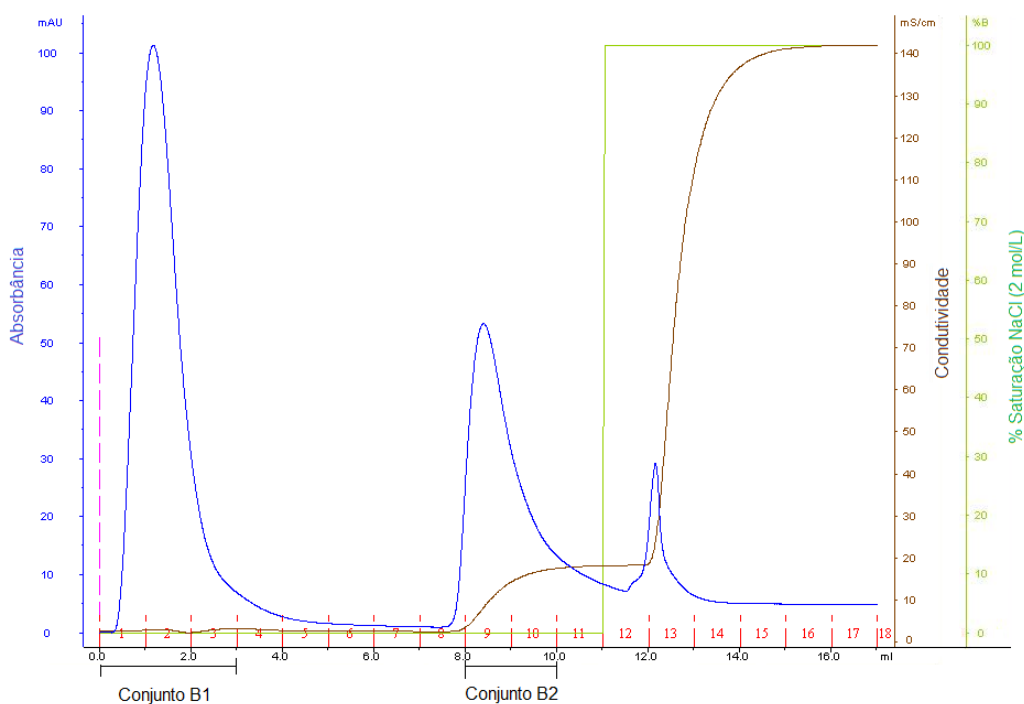
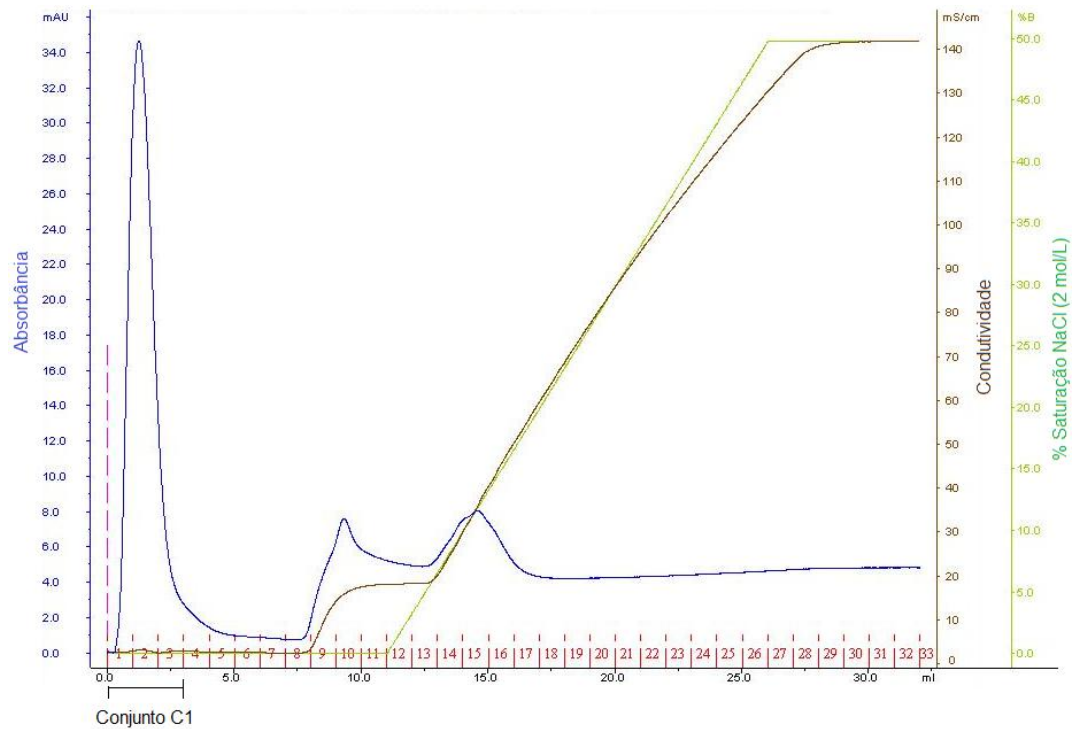
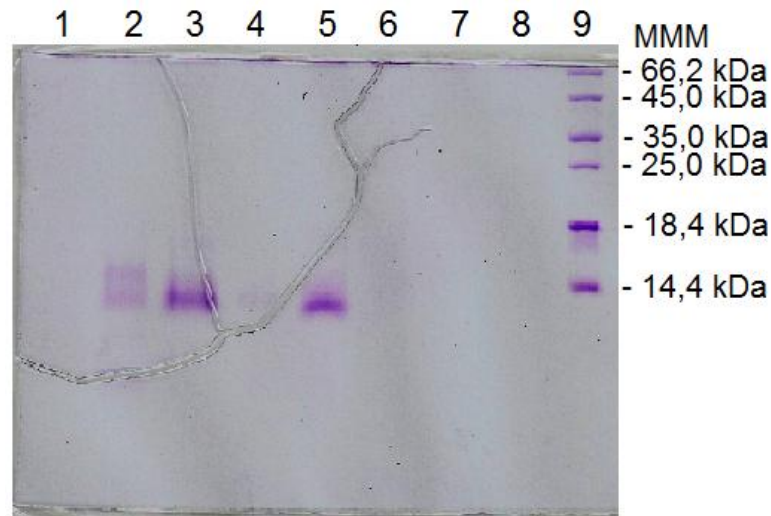


Figura 26: Cromatograma obtido para a cromatografia catiônica do conjunto C. Considerou-se somente o primeiro pico. Outras frações não foram consideradas devido à pequena quantidade de proteína.



Após a realização das cromatografias outra eletroforese, figura 27, foi realizada, para verificar a pureza das amostras obtidas. Observou-se que algumas amostras estavam muito diluídas, pois nem apareceram no gel.

Figura 27: Gel de eletroforese para amostras obtidas após a cromatografia catiônica. Poço 1: não utilizado, poço 2: conjunto A1, poço 3: conjunto A2, poço 4: conjunto B1, poço 5: conjunto B2, poço 6: conjunto C1, poço 9: MMM (padrão de massa molar).



Após a cromatografia catiônica, o conjunto que apresentou maior quantidade de proteína foi o conjunto A2. Pelo método de Bradford, encontrou-se a quantidade de proteína total em cada etapa de purificação (tabela 1).

TABELA 1: Quantidade de proteína total em cada etapa de purificação

Etapa da purificação	Volume / mL	Conc. De proteína / mg mL ⁻¹	Proteína total / mg
Extrato bruto	645	1,766	1139,07
Extrato bruto aquecimento	470	1,748	821,56
Sobrenadante diálise	555	0,205	113,77
Sobrenadante precipitação fracionada 0-20 %	573	0,102	58,45
Sobrenadante precipitação fracionada 20-50 %	620	0,025	15,5
Precipitado precipitação fracionada 20-50 % redissolvido em tampão fosfato	95	0,332	31,54
Conjunto A concentrado em tampão fosfato	18	0,694	12,49
Conjunto B concentrado em tampão fosfato	9	0,138	1,24
Conjunto C concentrado em tampão fosfato	9	*	*
Conjunto A concentrado em tampão acetato	15	0,663	9,95
Conjunto B concentrado em tampão acetato	7	0,102	0,71
Conjunto C concentrado em tampão acetato	8	*	*
Conjunto A1	32	*	*
Conjunto A2	30	0,158	7,74
Conjunto B1	12	*	*
Conjunto B2	8	0,023	0,18
Conjunto C1	15	*	*

* Quantidade de proteína muito baixa, não detectável através do método de Bradford

Observando-se a tabela 1, vê-se que o conjunto A2 foi o que apresentou a maior quantidade de proteína. O próximo passo é a determinação da atividade inibitória da alfa-amilase. Os conjuntos obtidos com estas cromatografias de troca catiônica foram submetidos a ensaios de atividade de inibição da alfa-amilase para descobrir em qual delas há o inibidor, para posteriormente com estes realizar ensaios de cristalização.

Os resultados obtidos com a realização do experimento para determinação da atividade inibitória da alfa-amilase encontram-se na tabela 2, onde se mostram também a quantidade de atividade inibitória (UI mL⁻¹) e atividade inibitória total (UI) para cada amostra. Observando-se a tabela é possível perceber que algumas amostras, já bastante purificadas, apresentaram inibição de alfa-amilase. As amostras do extrato bruto e extrato bruto após aquecimento e centrifugação não apresentaram atividade, pois estavam em etanol 70 %, que interfere no ensaio, por isso os resultados de atividades só se apresentam após a diálise.

TABELA 2: Atividade inibitória de alfa-amilases pelo método de Bernfeld.

Etapa da purificação	Volume / mL	Atividade Inibitória / UI mL ⁻¹	Atividade Inibitória Total / UI
Extrato bruto	645	*	*
Extrato bruto aquecimento	470	*	*
Sobrenadante diálise	555	18,10	10.048,68†
Sobrenadante precipitação fracionada 0-20 %	573	15,74	9.019,02
Sobrenadante precipitação fracionada 20-50 %	620	1,62	1.004,40
Precipitado precipitação fracionada 20-50 % redissolvido em tampão fosfato	95	19,35	1.838,25
Conjunto A concentrado em tampão fosfato	18	17,51	315,18
Conjunto B concentrado em tampão fosfato	9	19,28	173,52
Conjunto C concentrado em tampão fosfato	9	5,09	45,81
Conjunto A concentrado em tampão acetato	15	18,76	281,40†
Conjunto B concentrado em tampão acetato	7	16,21	113,48
Conjunto C concentrado em tampão acetato	8	2,58	20,64†
Conjunto A1	32	1,49	47,79
Conjunto A2	30	8,66	259,84
Conjunto B1	12	1,35	16,20
Conjunto B2	8	11,08	88,67
Conjunto C1	15	1,81	27,21

* Em etanol 70 % as amostras não apresentaram atividade. † Resultados provavelmente algo abaixo do real

As amostras que apresentaram maior atividade inibitória foram o extrato de centeio após a diálise, o precipitado de 20-50 % de saturação redissolvido em tampão fosfato, o conjunto A e o conjunto B da cromatografia aniônica. Já as amostras que após a cromatografia catiônica apresentaram atividade inibitória foram os conjuntos A2 e B2, o que pode ser um indicativo de dois inibidores diferentes, pois com as cromatografias se separaram através de condições diferentes. Já os conjuntos A1 e B1 praticamente não apresentaram. Alguns resultados na tabela de purificação estão provavelmente algo abaixo do valor real, pois acabaram indicando um pouco menos de quantidade de atividade inibitória em uma fase anterior do que na posterior de purificação.

Para confirmar os resultados de atividade inibitória obtidos de algumas amostras descritas na tabela 2, o método de Caraway foi realizado para algumas amostras; a tabela 3 apresenta os resultados. O controle não contém ASH.

TABELA 3: Atividade inibitória de alfa-amilase pelo método de Caraway

Etapa da purificação	Média absorbância / 660 nm
Controle	0,3316
ASH 1:100	0,1947
Extrato bruto	0,2678
Extrato bruto aquecimento	0,2627
Sobrenadante diálise	0,3035
Sobrenadante precipitação fracionada 0-20 %	0,2811
Sobrenadante precipitação fracionada 20-50 %	0,2047
Precipitado precipitação fracionada 20-50 % redissolvido em tampão fosfato	0,3257
Conjunto A concentrado em tampão fosfato	0,3307
Conjunto B concentrado em tampão fosfato	0,2843
Conjunto C concentrado em tampão fosfato	0,1806

Percebe-se que os ensaios de Bernfeld e Caraway são concordantes, pois as mesmas amostras que apresentaram atividade inibitória apresentaram para ambos os ensaios.

Com os resultados de proteína total, atividade total (pelo método do DNS), construiu-se a tabela de purificação para o terceiro lote purificado (tabela 4), embora alguns valores não se apresentem concordantes.

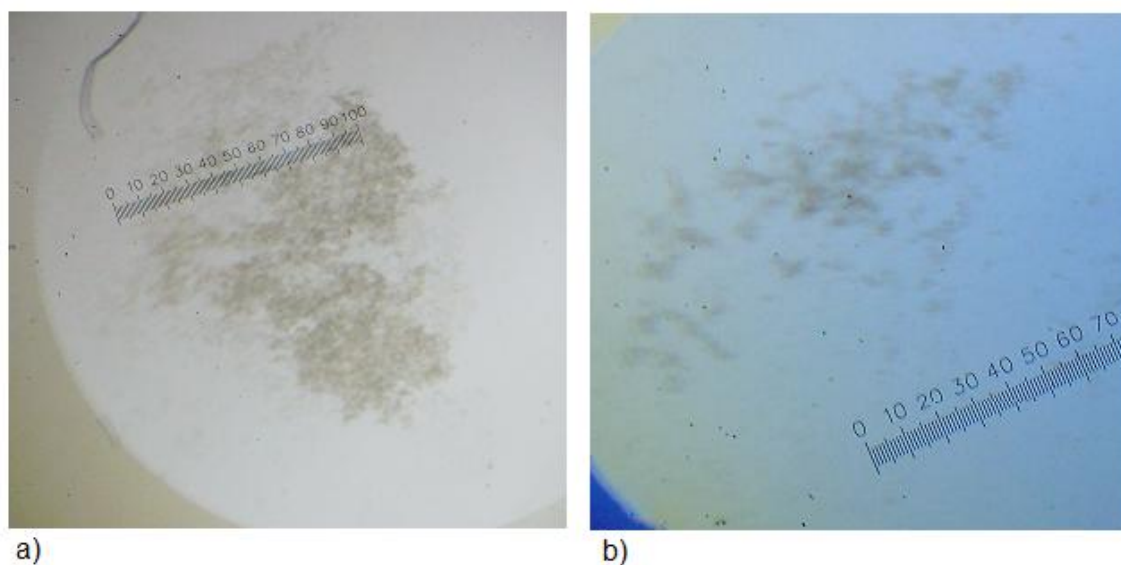
TABELA 4: Tabela de purificação para o terceiro lote de inibidor de alfa-amilase de centeio

Etapa da purificação	Volume / mL	Atividade Inibitória / UI mL ⁻¹	Proteína total / mg	Atividade Inibitória total / UI	Atividade específica / U mg ⁻¹	Rendimento / %	Fator de purificação
Extrato bruto	645	*	1139,07	*	*	*	*
Sobrenadante diálise	555	18,10	113,77	10.048,68	88,32	100,000	1,00
Sobrenadante precipitação fracionada 0-20 %	573	15,74	58,45	9.019,02	154,30	89,75	1,74
Sobrenadante precipitação fracionada 20-50 %	620	1,62	15,5	1.004,40	64,80	9,99	0,73
(PPT) 20-50% **	95	19,35	31,54	1.838,25	58,28	18,29	0,65
Conjunto A concentrado em tampão fosfato	18	17,51	12,49	315,18	25,23	3,14	0,28
Conjunto B concentrado em tampão fosfato	9	19,28	1,24	173,52	139,93	1,73	1,58
Conjunto C concentrado em tampão fosfato	9	5,09	*	45,81	*	0,45	*
Conjunto A concentrado em tampão acetato	15	18,76	9,95	281,40	28,28	2,80	0,32
Conjunto B concentrado em tampão acetato	7	16,21	0,71	113,48	159,83	1,13	1,81
Conjunto C concentrado em tampão acetato	8	2,58	*	20,64	*	0,20	*
Conjunto A1	32	1,49	*	47,79	*	0,47	*
Conjunto A2	30	8,66	7,74	259,84	33,57	2,58	0,38
Conjunto B1	12	1,35	*	16,20	*	0,16	*
Conjunto B2	8	11,08	0,18	88,67	492,61	0,88	5,57
Conjunto C1	15	1,81	*	27,21	*	0,27	*

* Quantidade de proteína muito baixa, não detectável através do método de Bradford. ** Precipitado precipitação fracionada - (PPT) 20-50%.

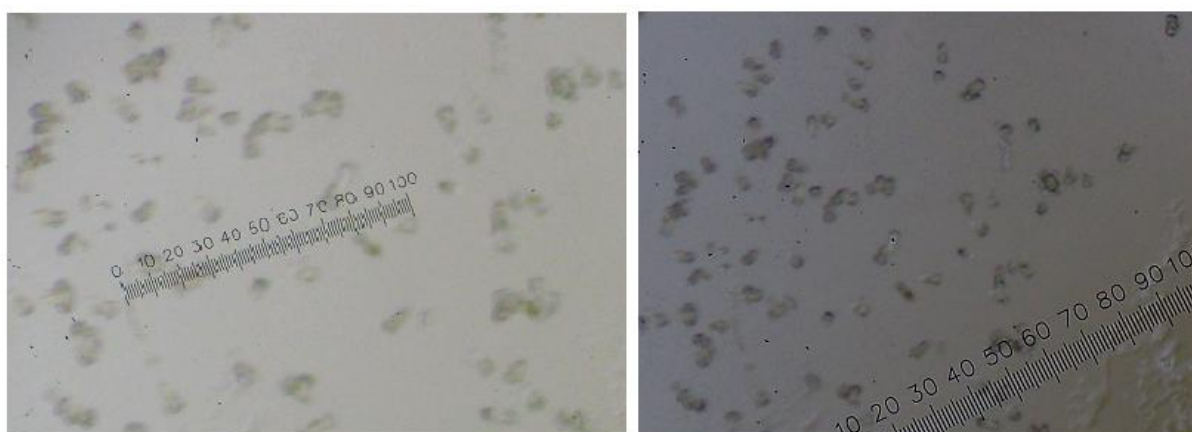
Os conjuntos A2 do primeiro e segundo lotes, que também apresentaram atividade inibitória, foram juntados e concentrados, resultando em 101 µL para o ensaio de cristalização, com concentração de aproximadamente 3 mg mL⁻¹. Não houve a formação de cristais embora em alguns poços pode-se observar precipitação da proteína (figura 28).

Figura 28: Precipitados de proteína observados nos poços a) D4 e b) D6.



Já para o terceiro lote de inibidores de alfa-amilase purificados, dois conjuntos diferentes apresentaram atividade inibitória e estavam em quantidade apreciáveis, foram os conjuntos A2 e B2 que foram levadas aos ensaios de cristalização. Para a amostra A2 (170 μL), que foi mais concentrada (concentração de aproximadamente 9 mg mL^{-1}) neste lote que no anterior, repetiu-se o mesmo conjunto de soluções ("grid screen") da figura 15 apresentada anteriormente nos métodos utilizados. Após uma semana, observou-se que no poço A1 (tampão citrato, pH 4 juntamente com $\text{NaCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) formaram-se alguns precipitados cristalinos (figura 29), o que indicou que a condição mais favorável para a formação de cristais foi a baixa concentração de sal na faixa utilizada. Já praticamente todos os outros poços, com diferentes condições de cristalização, apresentaram formação de precipitado amorfo.

Figura 29: Cristais formados no poço A1 para a segunda placa de cristalização.



Com o que restou da mesma amostra (30 μL), realizou-se mais um ensaio de cristalização, seguindo praticamente a mesma condição em que se formaram alguns precipitados cristalinos (tampão citrato pH 4,0), alterando somente a concentração de sal (figura 16, anteriormente apresentada nos métodos utilizados). Após uma semana, observou-se que houve a formação de cristais com mais qualidade, ou seja, com um aspecto externo mais adequado para a realização do experimento de difração de raios X (figura 30 e 31), em quatro poços, que tinham a concentração de sal menor que $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Isso foi um indicativo de que os cristais formados deveriam ser de proteínas e não de sal. Outro aspecto notado que indicavam que os cristais formados eram de proteínas foi que na solução do fundo do poço não havia cristais de sal.

Figura 30: Cristais formados nos poços a) A1 e b) A2 para a terceira placa de cristalização.

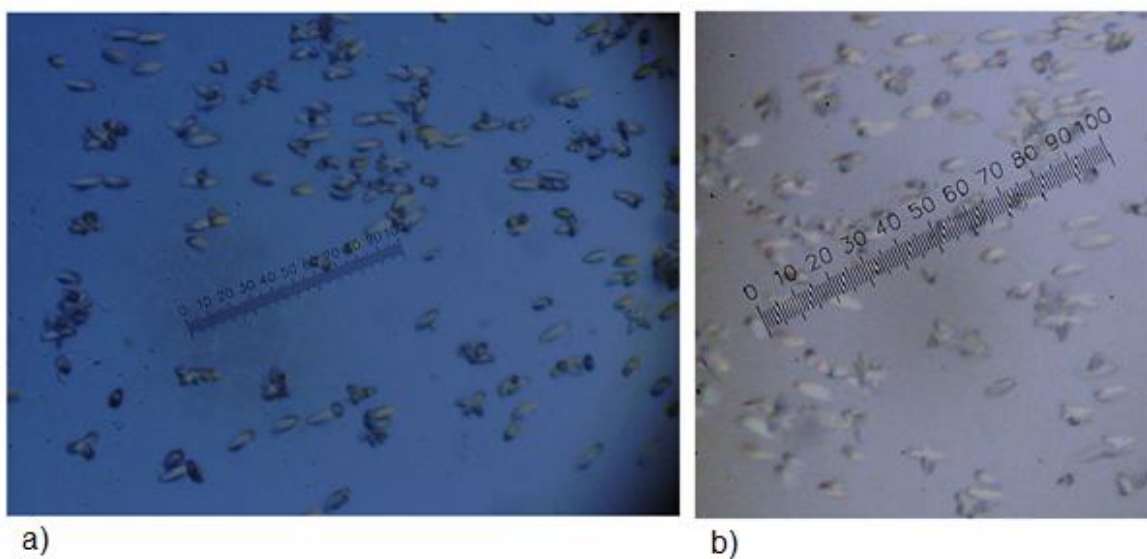
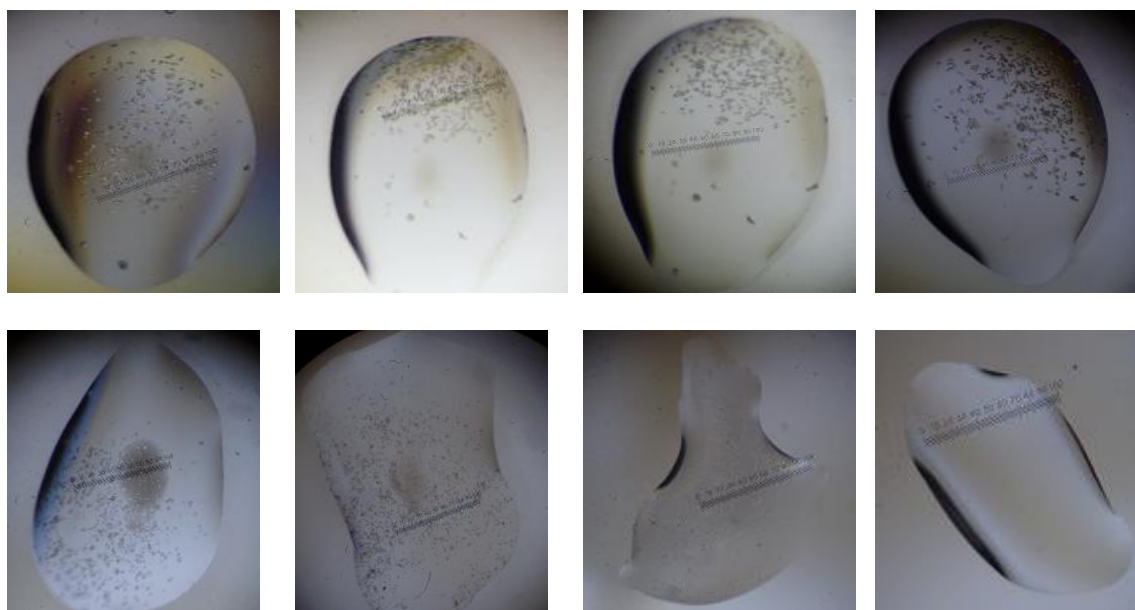
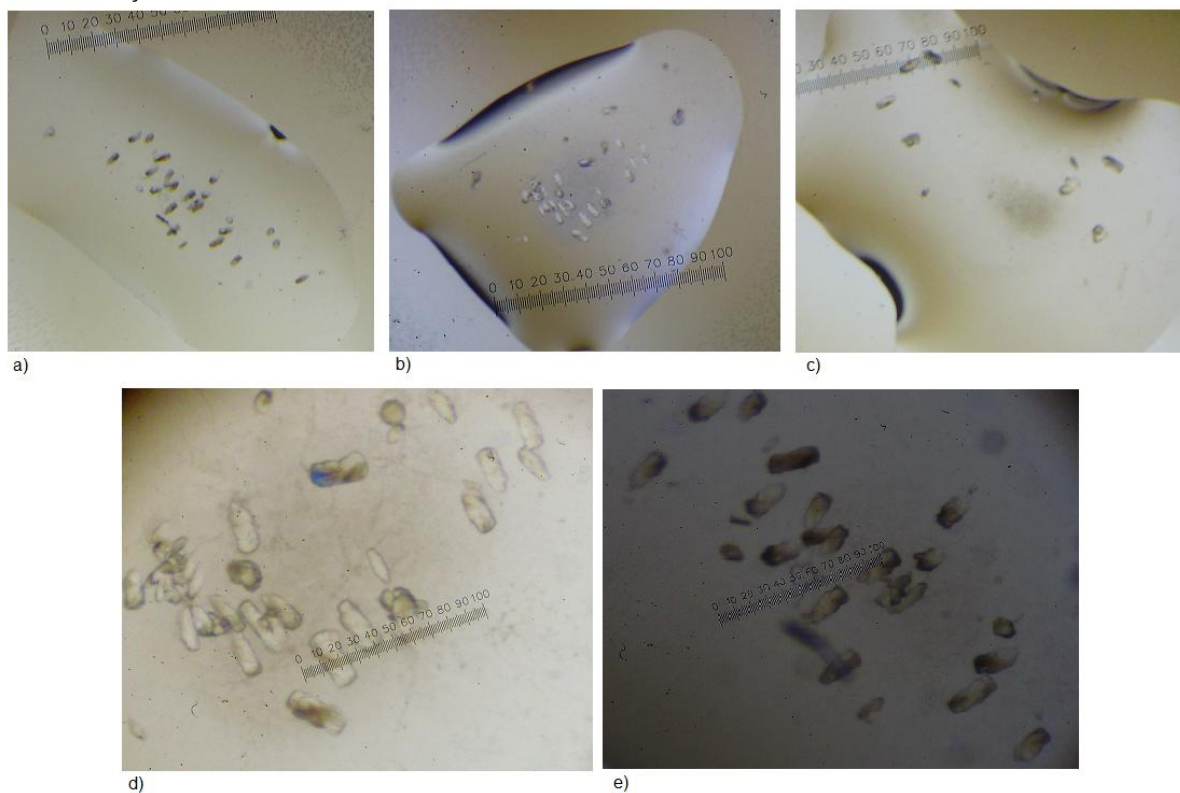


Figura 31: Placa obtida para o terceiro ensaio de cristalização realizado.



Com o volume de amostra obtido do conjunto B2 (17 μL), com concentração de 3,11 mg mL^{-1} , foi possível fazer apenas três gotas, sendo que nestas também houve a formação de pequenos cristais, após uma semana (figura 32).

Figura 32: Cristais formados para a Conjunto B2, poços a) A1, b) A2, c) A3 e poços d) A1 e e) A2 com uma resolução maior.



Todavia, os cristais formados não apresentaram mínima qualidade de difração de raios X. Assim, usaram-se imagens de difração obtidas anteriormente para cristais geminados de inibidor de alfa-amilase do centeio (*Secale cereale*) para faseamento e refinamento. Essas imagens encontravam-se reservadas no laboratório porque na época não havia programa de refinamento capaz de aproveitá-las devido aos vários domínios de geminação que apresentam. Porém, mais recentemente, o programa *refmac* incorporou esta possibilidade, como anunciado (CCP4bb navigation..., 2012).

Assim, essas 54 imagens de difração foram processadas, testando-se 3 possibilidades de grupo de espaço (embora à possibilidade ainda de que o eixo 3_1 fosse um eixo 3_2) da rede de Bravais trigonal: $P3_1$, $P3_121$ e $P3_112$. Para cada uma das possibilidades de rede, as imagens foram indexadas, integradas e escalonadas, chegando-se finalmente ao arquivo de fatores de estrutura (formato *mtz*).

Observando-se os altos valores de R_{symm} e R_{meas} descartou-se a possibilidade do grupo espacial $P3_112$, tabela 5.

TABELA 5: Valores de R_{symm} e R_{meas}

Grupo de espaço	R_{symm} (global - última faixa de resolução, 2,47 a 2,40 Å)	R_{meas} (global - última faixa de resolução, 2,47 a 2,40 Å)
$P3_1$	4,8% - 18,6%	6,7% - 26,2%
$P3_121$	5,1% - 20,3%	6,1% - 24,4%
$P3_112$	31,5% - 40,0%	37,5% - 48,0%

Testaram-se várias faixas de resolução (resolução máxima de 2,42 a 2,10 Å) para o processamento das imagens nos grupos de espaço $P3_1$ e $P3_121$, decidindo-se usar, finalmente, entre a faixa de resolução 80-2,24 Å; as tabelas 6 e 7 mostram parte do estudo realizado para os grupos de espaço $P3_1$ e $P3_121$, respectivamente.

TABELA 6: Estudo da faixa de resolução para o grupo de espaço P3₁

Faixa de resolução global (última faixa)	R _{symm}	R _{meas}	Completeza	I / $\sigma(I)$
80-2,40 (2,47-2,40)	4,7% (18,9%)	6,6% (26,5%)	97,7% (92,0%)	12,54 (3,95)
80-2,38 (2,45-2,38)	4,8% (19,1%)	6,7% (26,7%)	97,6% (90,8%)	12,31 (3,82)
80-2,36 (2,43-2,36)	4,8% (19,8%)	6,8% (27,8%)	97,8% (92,6%)	12,04 (3,72)
80-2,34 (2,41-2,34)	4,9% (21,8%)	6,9% (30,5%)	97,8% (93,2%)	11,81 (3,44)
80-2,32 (2,39-2,32)	5,0% (23,0%)	7,0% (32,2%)	97,8% (92,2%)	11,57 (3,37)
80-2,30 (2,37-2,30)	5,0% (24,5%)	7,1% (34,4%)	97,8% (93,1%)	11,36 (3,18)
80-2,28 (2,35-2,28)	5,1% (26,3%)	7,2% (36,8%)	97,7% (90,5%)	11,09 (2,92)
80-2,26 (2,33-2,26)	5,2% (27,6%)	7,3% (38,6%)	97,8% (93,1%)	10,88 (2,75)
80-2,24 (2,31-2,24)	5,3% (29,6%)	7,4% (41,5%)	97,9% (93,9%)	10,64 (2,54)
80-2,22 (2,29-2,22)	5,4% (27,9%)	7,5% (39,1%)	98,0% (93,5%)	10,37 (2,69)
80-2,20 (2,26-2,20)	5,5% (33,3%)	7,7% (46,7%)	97,6% (88,4%)	10,21 (2,26)

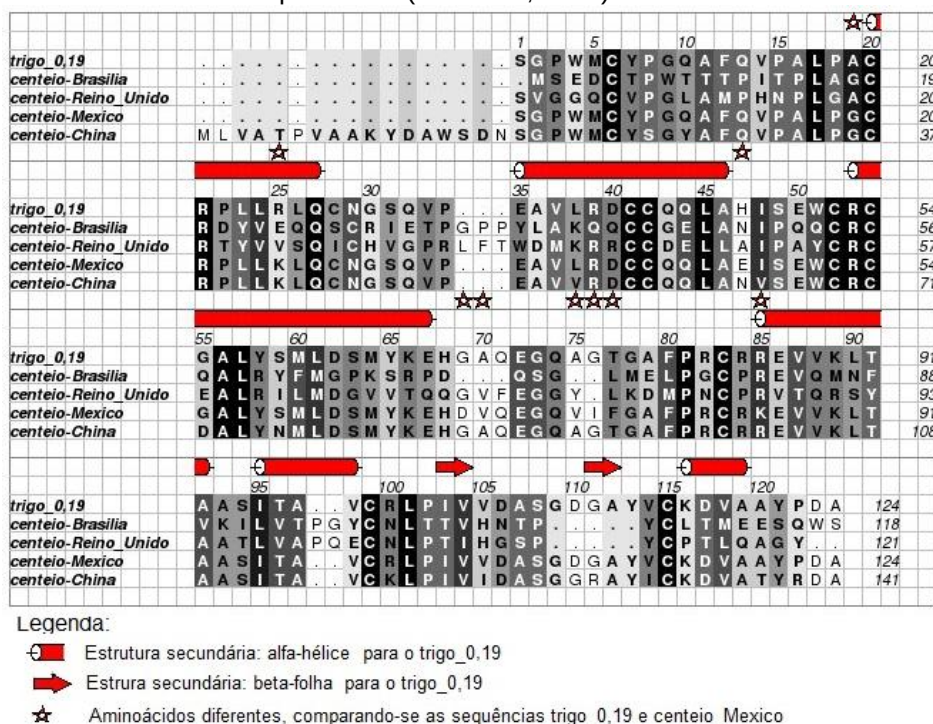
TABELA 7: Estudo da faixa de resolução para o grupo de espaço P3₁21

Faixa de resolução global (última faixa)	R _{symm}	R _{meas}	Completeza	I / $\sigma(I)$
80-2,40 (2,47-2,40)	5,1% (20,3%)	6,1% (24,5%)	99,2% (94,5%)	19,28 (5,98)
80-2,38 (2,45-2,38)	5,1% (20,2%)	6,2% (24,4%)	99,1% (92,7%)	18,98 (6,21)
80-2,36 (2,43-2,36)	5,2% (21,4%)	6,3% (25,8%)	99,3% (94,9%)	18,64 (5,88)
80-2,34 (2,41-2,34)	5,3% (23,9%)	6,4% (28,7%)	99,3% (95,7%)	18,28 (5,41)
80-2,32 (2,39-2,32)	5,4% (25,5%)	6,5% (30,7%)	99,2% (95,0%)	17,87 (5,05)
80-2,30 (2,37-2,30)	5,5% (27,2%)	6,6% (32,7%)	99,2% (95,5%)	17,63 (4,65)
80-2,28 (2,35-2,28)	5,5% (28,0%)	6,7% (33,7%)	99,1% (93,4%)	17,29 (4,49)
80-2,26 (2,33-2,26)	5,6% (29,5%)	6,8% (35,4%)	99,2% (94,7%)	16,94 (4,28)
80-2,24 (2,31-2,24)	5,7% (32,9%)	6,9% (39,6%)	99,3% (95,5%)	16,45 (3,88)
80-2,22 (2,29-2,22)	5,8% (30,6%)	7,0% (36,7%)	99,2% (95,5%)	16,22 (4,24)
80-2,20 (2,26-2,20)	5,9% (36,3%)	7,2% (44,0%)	99,1% (93,3%)	15,84 (3,51)

Para a substituição molecular, fez-se um alinhamento (figura 33) das 4 possíveis sequências para o inibidor de alfa-amilase de centeio com a sequência do inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo (código do pdb 1HSS) que também é bastante similar a estas e já teve sua estrutura determinada (ODA et al., 1997). Para

diferenciar as 4 sequências, estas foram denominadas remetendo conforme aonde foram sequenciadas: a) centeio-Brasilia (118 aminoácidos) (DIAS et al. 2005), b) centeio-Reino_Unido (121 aminoácidos) (LYONS et al. 1987), c) centeio-Mexico (124 aminoácidos) (2001) e d) centeio-China (141 aminoácidos) (WANG et al. 2010).

Figura 33: Alinhamento de sequências de inibidor de alfa-amilase de centeio (*Secale cereale*) com a sequência do inibidor 0,19 do trigo (1HSS). Os resíduos foram coloridos de acordo com o grau de similaridade usando conceito alscript calcons (BARTON, 1993).



Na tabela 8 encontram-se os valores de similaridade e identidade das sequências de inibidor de alfa-amilase de centeio (*Secale cereale*) quando comparadas com a sequência do inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo (1HSS), encontradas por meio do programa "EMBOSS Stretcher - Alignment". Percebeu-se que a sequência que apresenta mais similaridade e identidade com o inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo é a do inibidor de alfa-amilase centeio_Mexico.

TABELA 8: Comparação das sequências de inibidor de alfa-amilase de centeio (*Secale cereale*) com a sequência inibidor 0,19 do trigo

Sequência	Similaridade com trigo 0,19	Identidade com trigo 0,19	Gaps
centeio-Brasilia	43,4%	23,3%	12,4%
centeio-Reino_Unido	48,1%	29,5%	10,1%
centeio-Mexico	96,0%	92,7%	0,0%
centeio-China	81,6%	76,6%	12,1%

Por meio do programa Chainsaw, 4 modelos foram preparados para a substituição molecular, foram fornecidos a ele os alinhamento entre cada uma das 4 sequências de inibidor de alfa-amilase do centeio com o inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo, para que ele retirasse os resíduos não conservados e deixasse inalterados os resíduos conservados.

Por meio do programa Phaser, fizeram-se as substituições moleculares (para estimar fases da radiação difratada pelo cristal real) para cada uma das sequências de inibidor de alfa-amilase de centeio (Brasília, Reino Unido, México e China) alinhadas à do trigo 0,19, para os possíveis grupos espaciais $P3_1$ (fez-se a busca de por tetrâmero e por monômeros) e $P3_121$ (fez-se a busca por dímero e por monômeros). As soluções obtidas a partir dos oligômeros foram muito melhores, assim, descartaram-se aquelas obtidas a partir dos modelos monoméricos.

Com essas soluções encontradas, fez-se o refinamento de corpo rígido, depois o refinamento com restrições ("restrained refinement") e, posteriormente, rodou-se o programa arp/warp para avançar na completude do modelo (considerando-se o cristal geminado e o cristal não geminado para todas essas etapas). Gerou-se tabelas com todos esses dados para se comparar os valores de R_{factor} e R_{free} e tentar deduzir o verdadeiro grupo de espaço, a sequência e o grau de geminação do cristal inibidor de alfa-amilase, tabelas 9 e 10 para o $P3_1$ e $P3_121$, respectivamente.

TABELA 9: Grupo de espaço $P3_1$ valores de R_{factor} e R_{free}

Sequência	Refinamento de Corpo Rígido	Refinamento com Restrições	Arp/warp
Centeio-Brasília/c*	0,2917-0,2899	0,2205-0,2770	0,1914-0,3980
Centeio-Brasília/s*	0,3965-0,4094	0,3572-0,4015	0,2640-0,4670
Centeio-R.Unido/c	0,3006-0,3019	0,2328-0,2790	0,1829-0,4030
Centeio-R.Unido/s	0,4039-0,4152	0,3616-0,4161	0,2538-0,4560
Centeio-México/c	0,2817-0,2799	0,1974-0,2536	0,1920-0,2810
Centeio-México/s	0,3852-0,3964	0,3265-0,3812	0,2531-0,4530
Centeio-China/c	0,2854-0,2823	0,3324-0,3779	0,1730-0,3610
Centeio-China/s	0,3884-0,3957	0,3325-0,3783	0,2428-0,4550

* Refinamentos no programa reftmac i) /c - com geminação e ii) /s - sem geminação

TABELA 10: Grupo de espaço P3₁21 valores de R_{factor} e R_{free}

Sequência	Refinamento de Corpo Rígido	Refinamento com Restrições	Arp/warp
Centeio-Brasília/c*	0,3836-0,3576	0,3576-0,3681	0,2848-0,4910
Centeio-Brasília/s*	0,4333-0,4305	0,4026-0,4218	0,3147-0,5910
Centeio-R.Unido/c	0,3815-0,3749	0,3637-0,3713	0,2895-0,5180
Centeio-R.Unido/s	0,4356-0,4401	0,4111-0,4327	0,2884-0,5660
Centeio-México/c	0,3739-0,3595	0,3498-0,3516	0,2615-0,5550
Centeio-México/s	0,4238-0,4181	0,3873-0,4096	0,2867-0,5700
Centeio-China/c	0,3745-0,3636	0,3512-0,3559	0,2712-0,5120
Centeio-China/s	0,4239-0,4285	0,3889-0,4141	0,2959-0,5730

* Refinamentos no programa refmac i) /c - com geminação e ii) /s - sem geminação

Observando-se as duas tabelas (tabela 9 e 10), chegou-se a conclusão de que o grupo de espaço mais provável do inibidor de alfa-amilase do centeio é o P3₁ e que este deve ser geminado, sendo que a sequência mais provável é a centeio_Mexico. Todavia, quando se utilizou o programa arp/warp, os resultados de R_{factor} e R_{free} não melhoraram. Assim, prosseguiu-se o refinamento a partir do modelo obtido com restrições, utilizando-se os programas COOT e Refmac.

Logo no começo, um estudo de peso foi realizado cujos resultados estão na tabela 11, por meio desta concluiu-se que um bom peso entre a geometria e os dados cristalográficos é de 0,014 para o programa refmac, pois através deste obteve-se o melhor valor de R_{free} .

TABELA 11: Estudo de peso

Pesos testatos	R_{factor}	R_{free}	Desvio médio quadrático (comprimentos de ligação)	Desvio médio quadrático (ângulos de ligação)
0,002	0,20450	0,25427	0,00500	0,85000
0,004	0,19331	0,24721	0,00500	0,88000
0,006	0,18626	0,24181	0,00500	0,94400
0,008	0,18283	0,24052	0,00500	0,96200
0,010	0,17992	0,24067	0,00500	0,98100
0,012	0,17765	0,23994	0,00500	1,00800
0,014	0,17577	0,23966	0,00500	1,03500
0,016	0,17386	0,24104	0,00600	1,05500
0,018	0,17253	0,24070	0,00600	1,08100
0,020	0,17141	0,24073	0,00600	1,10600
0,040	0,16396	0,24273	0,00800	1,33100
0,060	0,16001	0,24532	0,01000	1,52500
0,080	0,15710	0,24802	0,01200	1,69700
0,100	0,15506	0,24812	0,01400	1,85300
0,120	0,15328	0,24908	0,01600	1,98900
0,140	0,15183	0,24892	0,01800	2,10300
0,160	0,14994	0,25018	0,02000	2,23900
0,180	0,14871	0,25062	0,02100	2,34600
0,200	0,14769	0,25073	0,02300	2,43900

Estudos de TLS (movimento de translação, libração e parafuso) com o objetivo de diminuir os valores de R_{factor} e R_{free} e NCS (simetria não cristalográfica) também foram realizados, os resultados podem ser vistos nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

TABELA 12: Valores obtidos com o teste de modelos para NCS

Instrução ao reftmac para as 4 cadeias	R_{factor}	R_{free}	Desvio médio quadrático (comprimentos de ligação)	Desvio médio quadrático (ângulos de ligação)
1 1 124 1	0,17056	0,23873	0,018	2,119
1 1 124 2	0,17066	0,23837	0,018	2,127
1 1 124 3	0,17068	0,23818	0,018	2,137
1 1 124 4	0,15131	0,24410	0,015	1,878
1 1 124 5	0,15133	0,24391	0,015	1,878
1 1 124 6	0,15178	0,24723	0,015	1,902
sem NCS	0,15156	0,24764	0,015	1,904

TABELA 13: Valores obtidos com o teste de modelos para TLS

Domínios de TLS	R_{factor}	R_{free}	Desvio médio quadrático (comprimentos de ligação)	Desvio médio quadrático (ângulos de ligação)
nenhum	0,15154	0,25086	0,015	1,933
4 monômeros juntos	0,15571	0,25655	0,016	2,006
monômeros AB e CD	0,1551	0,24985	0,016	1,971
cada monômero	0,15518	0,24877	0,016	1,979
monômeros AC e BD	0,15559	0,24747	0,016	1,997
monômeros AD e BC	0,15537	0,24681	0,016	1,988

Baseado nesse resultado resolveu-se usar os monômeros AD e os monômeros BC como domínios de corpo rígido (TLS). Já quanto à simetria não cristalográfica, resolveu-se deixar sem, pois a diferença foi muito pequena e verificou-se que autenticamente algumas cadeias laterais são diferentes.

Durante o refinamento ajustes foram feitos, melhorando-se a posição de alguns átomos que se encontravam fora da densidade eletrônica, arrumando-se alguns rotâmetros que não estavam bem na densidade eletrônica (figura 34), invertendo-se alguns átomos (figura 35) e colocando-se através do coot as moléculas de água que faltavam.

Figura 34: Mudança de rotâmetro (a) para um com melhor ajuste na densidade e em conformação mais comum (b).

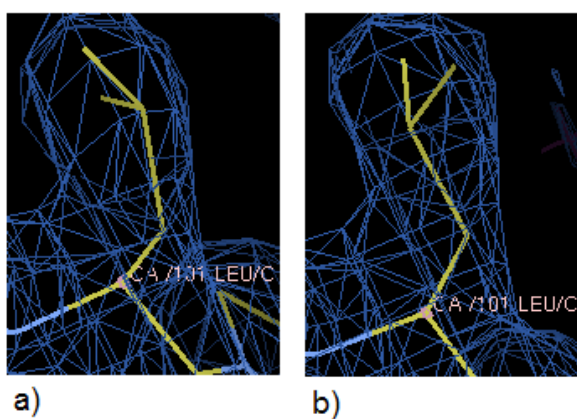
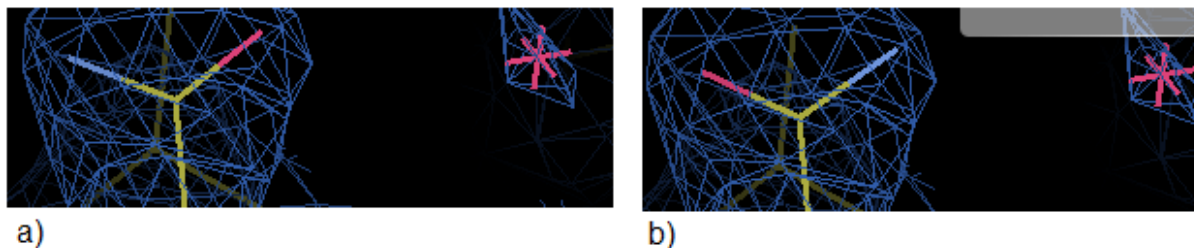


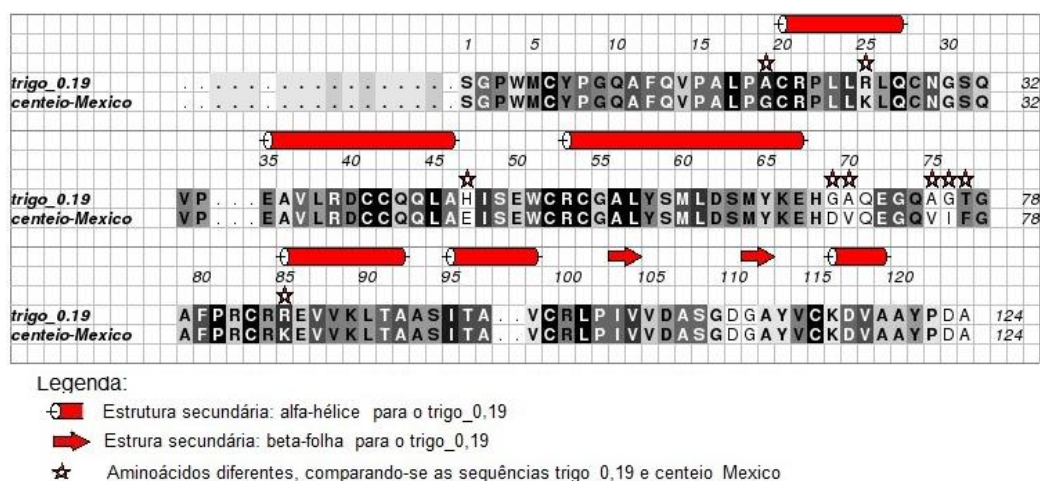
Figura 35: a) Átomo de oxigênio com interação com a água, invertido com b) átomo de nitrogênio, com interação mais provável com a água.



Com o prosseguimento do refinamento se percebeu, que a sequência era muito mais similar, todavia, ao do próprio inibidor 0,19 do trigo, embora tenha sido uma proteína extraída do centeio.

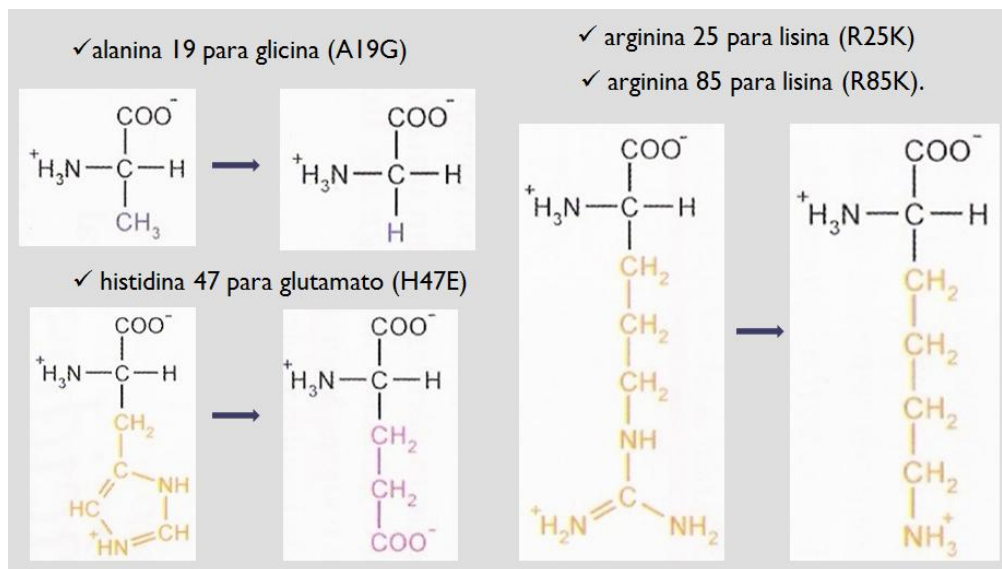
Após vários ciclos de refinamento, fez-se uma comparação mais detida dos aminoácidos da sequência do trigo 0,19 com os do inibidor de alfa-amilase do centeio, em que se esperavam 9 aminoácidos diferentes (indicados na figura 36 por uma estrela), embora os de números 69, 70, 75, 76 e 77 encontrem-se em regiões desordenadas de cadeia principal, restando, assim, 4 resíduos, números 19, 25, 47 e 85, para melhor comparação.

Figura 36: Alinhamento entre as seqüências das proteínas inibidor de alfa-amilase do trigo 0,19 e inibidor de alfa-amilase do centeio, destacando por meio de uma estrela os aminoácidos diferentes.



As alterações esperadas pelo sequenciamento para estes 4 resíduos são: alanina 19 para glicina (A19G), arginina 25 para lisina (R25K), histidina 47 para glutamato (H47E) e arginina 85 para lisina (R85K), conforme ilustrado na figura 37.

Figura 37: Comparação entre as estruturas dos aminoácidos presentes no inibidor de alfa-amilase do trigo 0,19 e inibidor de alfa-amilase do centeio



No caso do resíduo 85, em todos os monômeros não há como determinar se a cadeia lateral refere-se a uma arginina ou uma lisina (centeio), pois só há densidade até o carbono beta, embora o resíduo aponte para o solvente e assim também é observado na estrutura do inibidor 0,19. No caso do resíduo 47, em todas as cadeias não há densidade eletrônica o suficiente para revelar um glutamato, por isso este foi deixado até o CG (carbono gama), já na estrutura do inibidor 0,19, todavia, apenas os monômeros B e C indicam ser uma histidina. No caso do resíduo 25, não há densidade eletrônica o suficiente para uma lisina nos 4 monômeros, por isso no modelo foi deixada até o CG, já a estrutura do inibidor 0,19 confirma ser, para este, uma arginina.

No caso do resíduo 19, no inibidor de alfa-amilase de centeio, é notável que há densidade eletrônica além do carbono alfa, figura 38, para os 4 monômeros que foram refinados independentemente. Sendo assim, colocou-se uma alanina no lugar da glicina, mas, novamente, como mostrado na figura 39, há densidade além deste, para um átomo gama.

Figura 38: Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio (glicina) mostrando densidades eletrônicas além do carbono alfa, nível de contorno 1σ para o mapa de densidade eletrônica e $\pm 3\sigma$ para o mapa Fourier diferença.

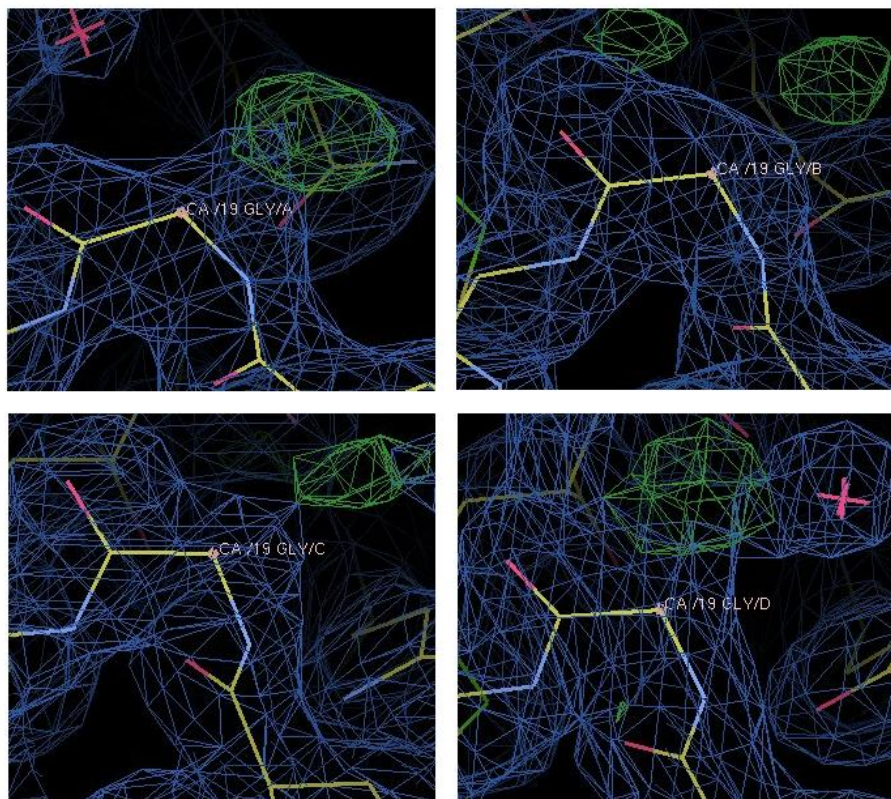
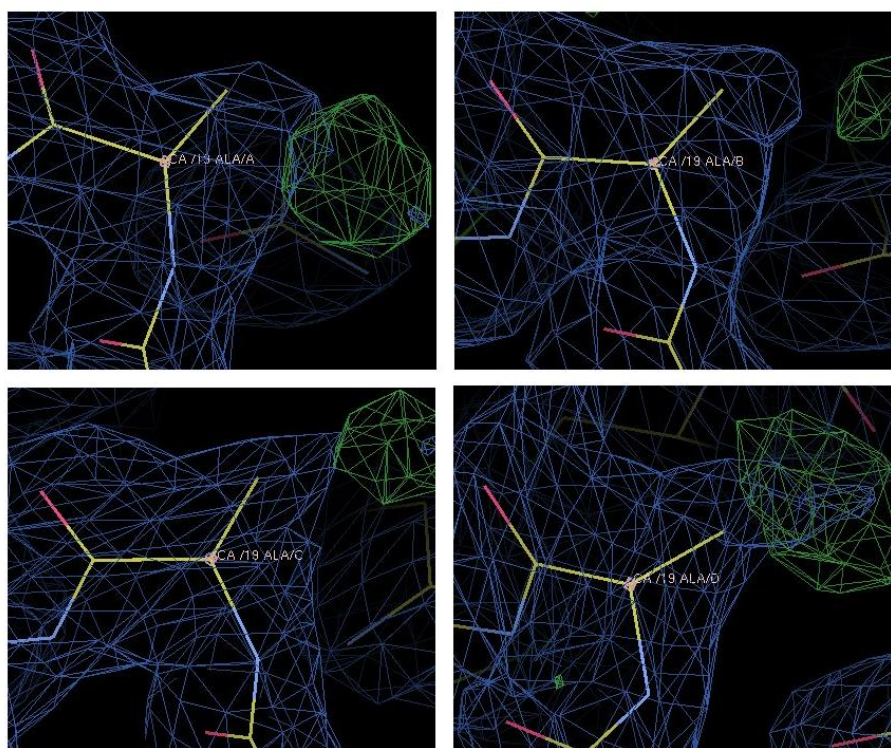


Figura 39: Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio (alanina) mostrando densidades eletrônicas além do carbono alfa, nível de contorno 1σ para o mapa de densidade eletrônica e $\pm 3\sigma$ para o mapa Fourier diferença.



Sendo assim, fez-se o refinamento substituindo agora o resíduo 19 por uma serina e por uma cisteína. Pode-se observar que a serina se ajustou melhor (figura 40), pois a cisteína mostra densidade eletrônica negativa (figura 41) no mapa de Fourier diferença. Ademais, o B-factor para o átomo gama no caso de cisteína fica apreciavelmente maior que dos demais átomos do mesmo resíduo. Então, foi possível concluir pela densidade eletrônica e através de comparações que na estrutura do inibidor de alfa-amilase, o resíduo 19 é uma serina.

Figura 40: Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio modelado como serina, nível de contorno 1σ para o mapa de densidade eletrônica e $\pm 3\sigma$ para o mapa Fourier diferença.

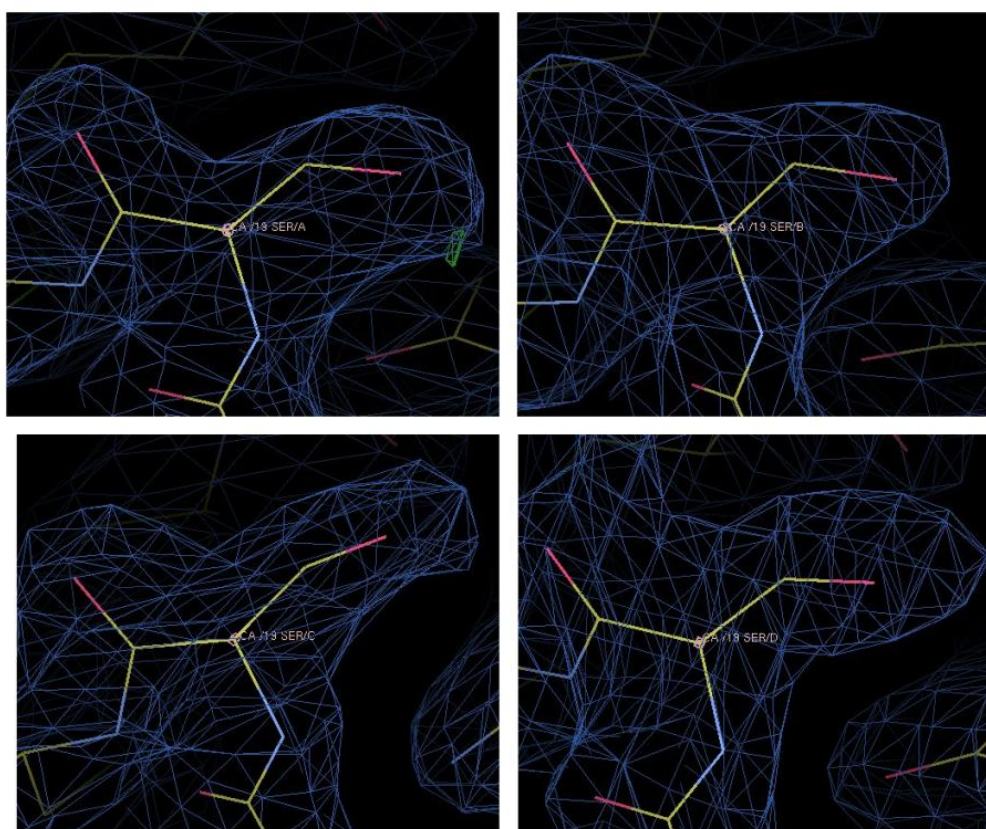
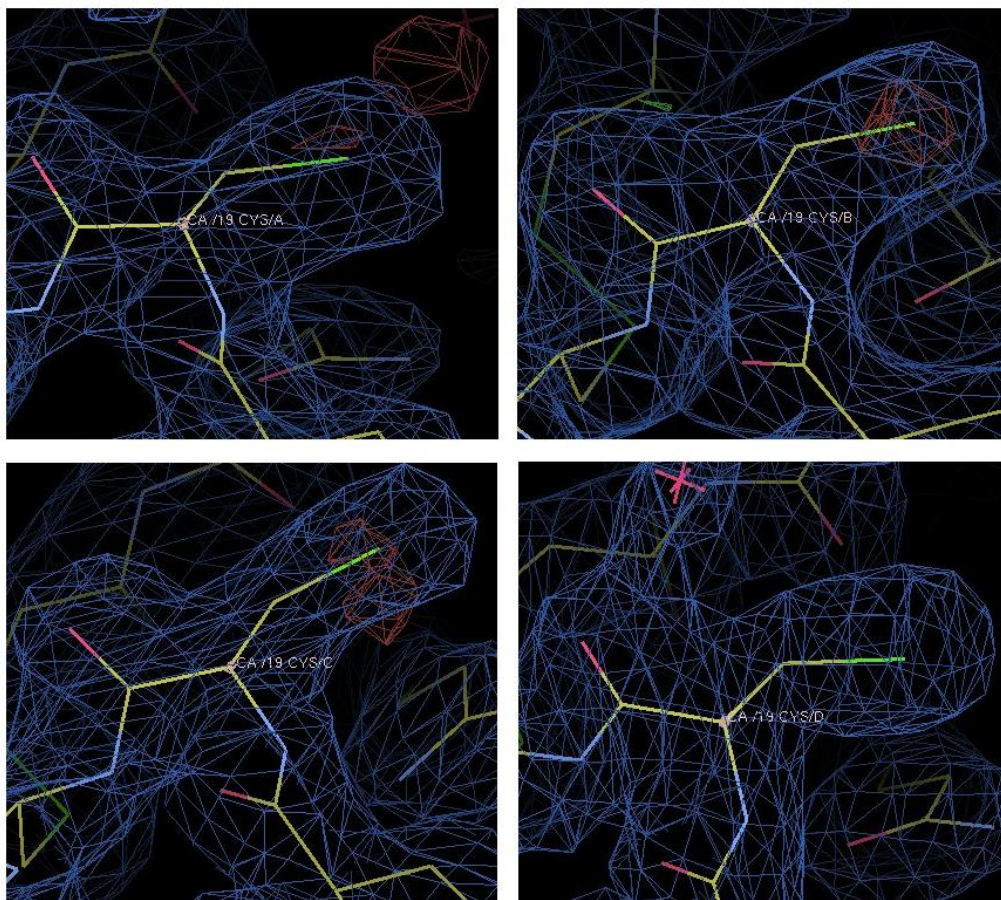
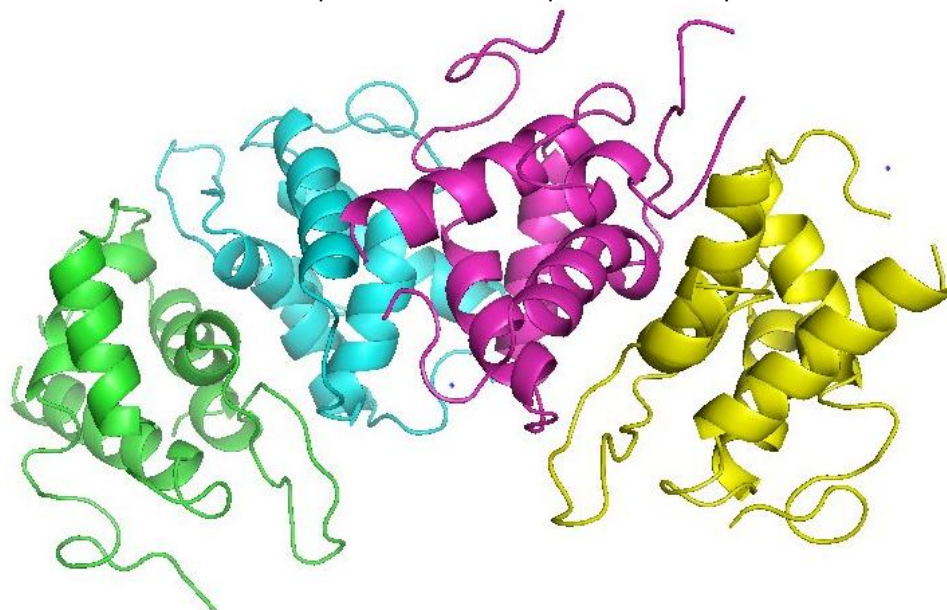


Figura 41: Resíduo 19 do inibidor de alfa-amilase do centeio modelado como cisteína, mostrando densidades eletrônicas negativas no mapa de Fourier diferença sobre os enxôfres, nível de contorno 1σ para o mapa de densidade eletrônica e $\pm 3\sigma$ para o mapa Fourier diferença.



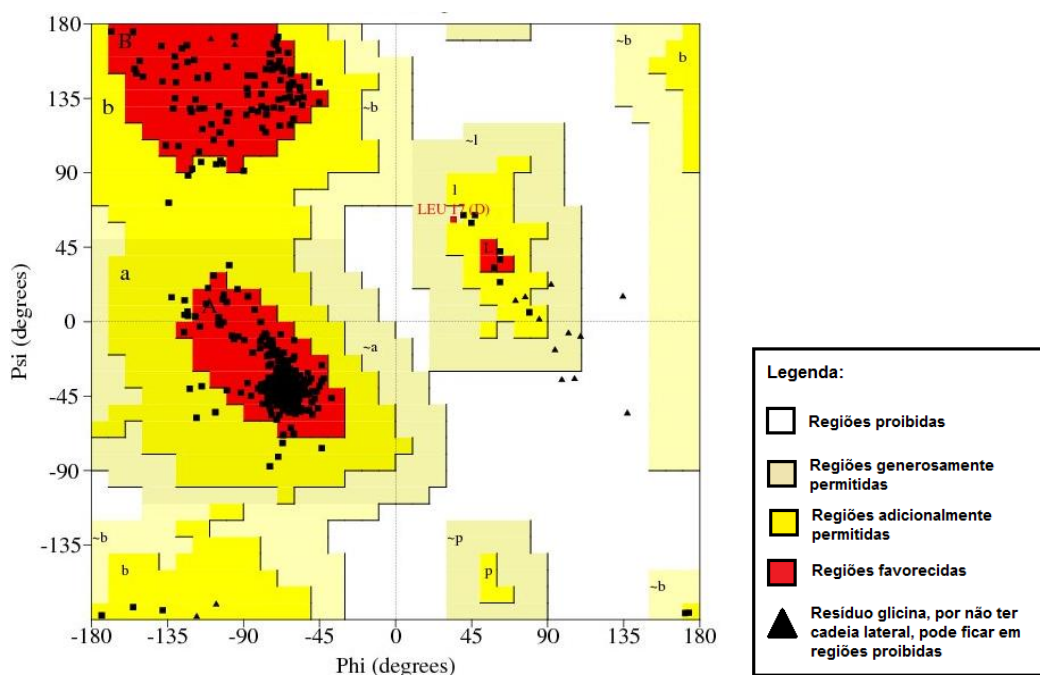
A estrutura final refinada (um tetrâmero na unidade assimétrica) pode ser vista na figura 42, obtida com os 2 domínios de geminação refinados de, domínio h, k, l, fração de geminação 0,513 e domínio h, k, -l, fração de geminação 0,487. Outros programas apontavam a presença também dos domínios -h,h+k,-l e h+k,-h,l, mas estes foram excluídos do refinamento por se apresentarem em proporção relativamente baixa.

Figura 42: Modelo de fitas da estrutura do inibidor de alfa-amilase de centeio (*Secale cereale*). O tetrâmero na unidade assimétrica é representado sendo que cada cor representa uma cadeia.



A estrutura obtida foi validada através do programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993), obtendo-se o gráfico de Ramachandran (figura 43). O programa calculou que 91% dos resíduos estão em regiões favorecidas, 8,7% em regiões adicionalmente permitidas e 0,3% em regiões generosamente permitidas.

Figura 43: Gráfico de Ramachandran para o inibidor de alfa-amilase de centeio.



A estrutura também foi validada com o MolProbity (CHEN et al., 2009), um resumo da validação da geometria protéica obtida com o este programa se encontra na figura 44:

Figura 44: Resumo da validação da estrutura de inibidor de alfa-amilase de centeio por meio do MOLProbity.

Geometria da Proteína	Rotâmeros pobres	1.89%	Meta: <1%
	Ramachandran proibido	0.72%	Meta: <0.2%
	Ramachandran favorecido	96.65%	Meta: >98%
	C β desvios >0.25Å	0	Meta: 0
	Resíduos com más ligações:	0.00%	Meta: 0%
	Resíduos com maus ângulos:	0.00%	Meta: <0.1%

Para indicar a qualidade de ajuste da estrutura na densidade eletrônica, foi calculado para cada cadeia o valor do residual do espaço real (RSR) (medida da semelhança entre um mapa de densidade eletrônica calculada diretamente a partir do modelo e uma calculada a partir de dados experimentais) e o valor do coeficiente de correlação do espaço real (RSCC), mostrados na figura 45 para as cadeias A, B, C e D. A tabela 14 mostra os valores para cada cadeia e global.

Figura 45: Gráfico com valores de RSCC (valor do coeficiente de correlação do espaço real) e RSR (valor do residual do espaço real) para cada cadeia da proteína do inibidor de alfa-amilase de centeio refinada.

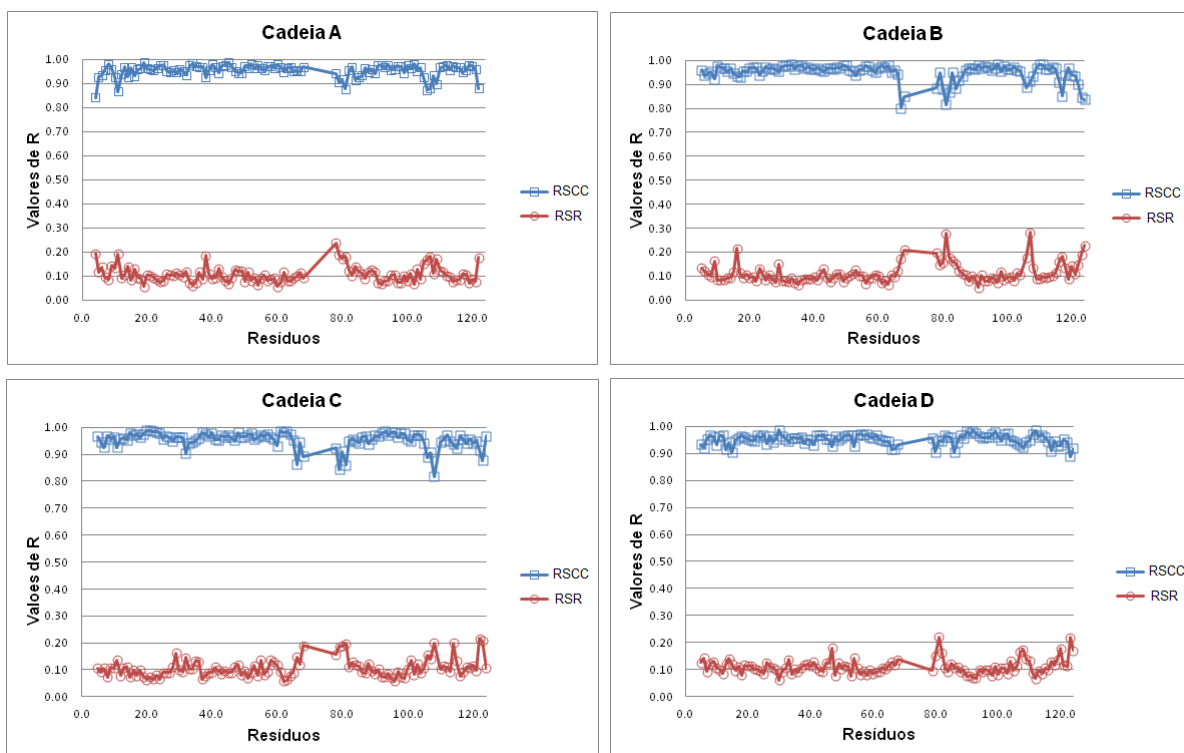


TABELA 14: Valores globais de RSCC e RSR

Cadeia	RSR	RSCC
A	0,1768	0,9254
B	0,1837	0,9291
C	0,1784	0,9233
D	0,1728	0,9252
Todas as cadeias	0,1779	0,9258

Observa-se que nos gráficos onde os valores de RSCC estão baixos e os valores de RSR estão altos, a proteína apresenta regiões flexíveis e mesmo há interrupção na modelagem da cadeia. Em cada monômero, as interrupções iniciam-se no resíduo 69 e acabam no resíduo 77; são regiões flexíveis e provavelmente trata-se de *loops*.

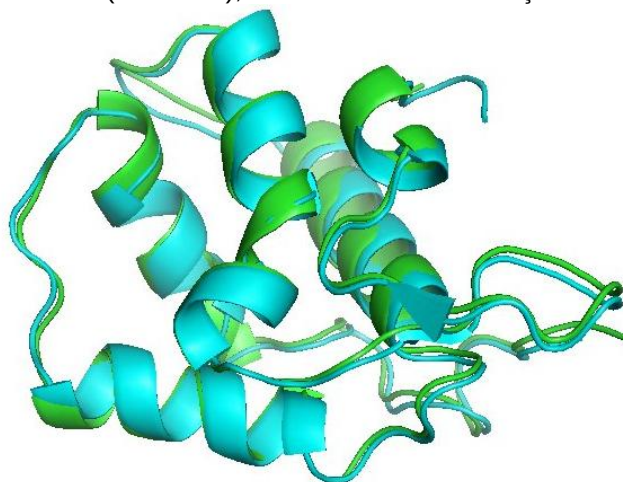
A tabela 15 apresenta um resumo dos dados finais de refinamento. O modelo refinado apresenta grupo de espaço $P3_1$, a estrutura foi refinada com a resolução de 2,24 Å e chegou-se a um valor final de R_{factor} de 0,17 e de R_{free} 0,21.

TABELA 15: Resumo do processamento dos dados e estatísticas do refinamento realizado para o inibidor de alfa-amilase do centeio

Comprimento de onda/Å	1,535
Grupo de espaço	$P3_1$
Faixa de resolução global (última faixa)/Å	80,0-2,24 (2,31-2,24)
Parâmetros da cela unitária/Å	a= 78,132, c=59,543
Número de reflexões únicas observadas	32614 (2675)
Mosaicidade refinada	0,20
Completeza dos dados (%)	98,1 (94,9)
Redundância	1,7(1,7)
R_{symm} (%)	5,3 (29,6)
R_{meas} (%)	7,5(41,4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	10,45 (2,49)
R_{factor} (%)	17,9
R_{free} (%)	21,4
Wilson B factor/Å ²	35,8
R.m.s.d. valores ideais, comprimento de ligação / Å	0,005
R.m.s.d. valores ideais, comprimento dos ângulos/°	0,952
Átomos de proteínas	3159
Moléculas de água	125
Ânalises apresentadas por Ramachandran	
Resíduos em regiões favoráveis (%)	91
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	8,7
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0,3

A estrutura refinada foi comparada com a do inibidor 0,19 disponível no PDB, (código 1HSS), a figura 46 mostra a superposição de um monômero das duas estruturas, pode-se ver que as duas estruturas são muito semelhantes.

Figura 46: Superposição de um monômero do inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo (em azul) com um monômero do inibidor de centeio (em verde), mostrando a semelhança entre as estruturas.



Apesar da semelhança, quando se compara as duas estruturas, diferenças nos vários ângulos de torção de cadeias laterais podem ser encontradas, de acordo com o refinamento executado. Considerando-se significativos aqueles que diferem de 60 graus ou mais, observamos 75 ângulos chi diferentes. A tabela 16 lista alguns selecionados para uma diferença superior a 120 graus.

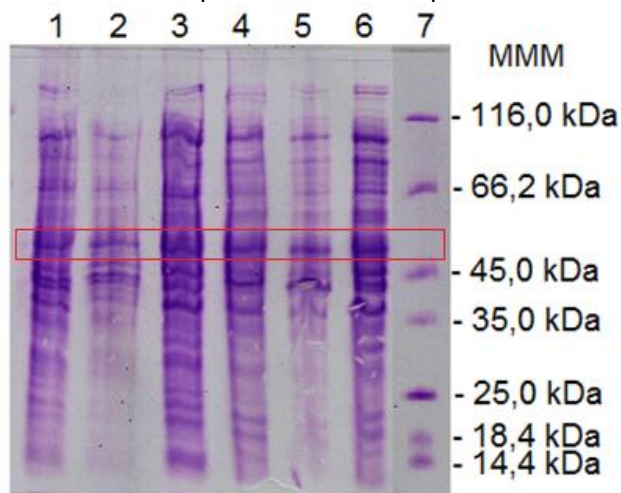
TABELA 16 - Seleção de ângulos de cadeia laterais muito diferentes

Resíduo/cadeia/ângulo	Diferença entre os ângulos
Asparagina 21/A/chi21	132,2
Treonina 96/ A/chi11	172,0
Arginina 100/B/chi3	140,1
Asparagina 29/C/chi22	129,2
Asparagina 29/D/chi22	164,1

4.2 GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*

Tentou-se expressar a proteína GTPase YchF a 37 °C e 20 °C. A figura 47 mostra a eletroforese realizada com as amostras obtidas, após a tentativa de expressão, lise e centrifugação.

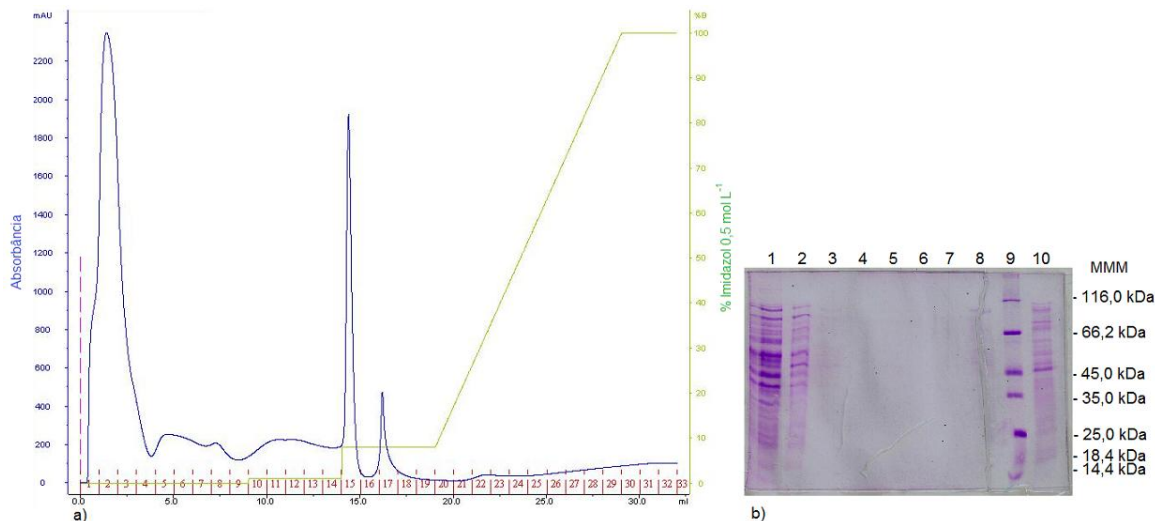
Figura 47: Gel obtido para as tentativas de expressão da GTPase: poço 1: 20 °C total, poço 2: 20 °C sedimento ("pellet"), poço 3: 20 °C sobrenadante, poço 4: 37 °C total, poço 5: 37 °C sedimento ("pellet"), poço 6: 37 °C sobrenadante, poço 7: marcador de massa molecular (MMM). O retângulo vermelho indica aproximadamente onde aparece a banda da proteína GTPase de massa 48,0 kDa.



A massa molecular da GTPase YchF sem cauda de histidina é de cerca de 44,3 kDa, porém, com a cauda de histidina é de 48,0 kDa (GRADIA, 2008), o gel obtido (figura 47) não traz muita evidência de que houve superexpressão, pois comparando-se os poços com o marcador de massa molecular, um pouco acima de 45 kDa não se nota nenhuma banda intensa, além disso, não se notou nenhuma diferença significativa na expressão comparando-se as bandas a diferentes temperaturas.

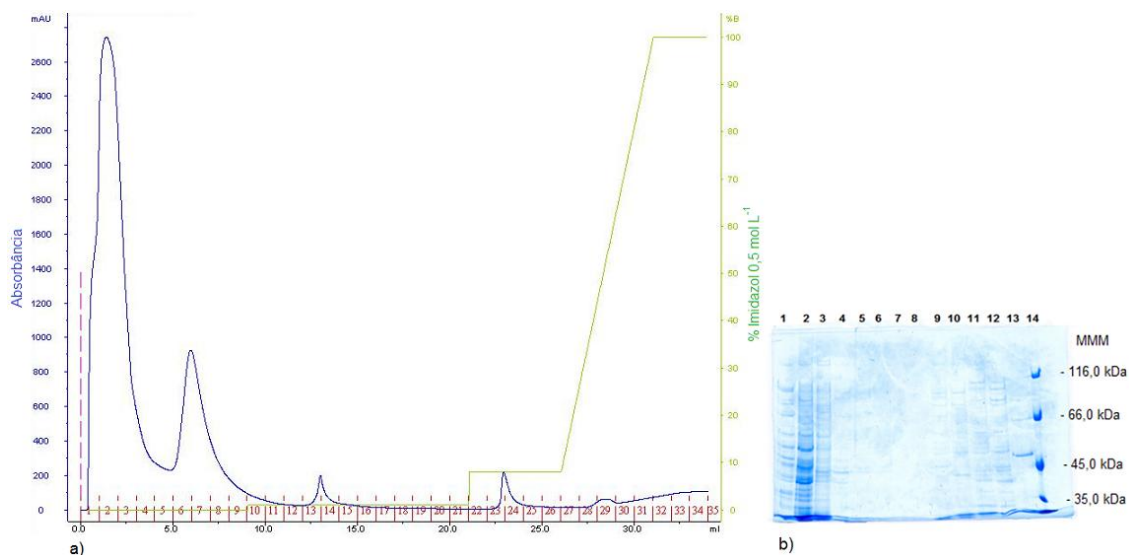
Mesmo sem se obter grande quantidade da proteína, esta foi dialisada para a retirada do sal e submetida à cromatografia de afinidade, obtendo-se o cromatograma da figura 48a. Fez-se eletroforese (figura 48b) para as frações obtidas nessa cromatografia e o que se observou é que o que evidenciaria a banda da GTPase YchF seria o tubo 17, que no gel apresenta uma banda algo acima de 45 kDa, porém, não totalmente purificada, além do fato de que a proteína se desligou da coluna em imidazol 40 mmol L⁻¹, ou seja, em condições de permanecer ligada, antes do gradiente com imidazol. Sendo assim, além da otimização da expressão, é necessário otimizar a purificação da proteína produzida também.

Figura 48: a) Primeira cromatografia realizada para a proteína GTPase YchF. Até o tubo 19, a concentração de imidazol é ainda de manutenção de ligação à coluna. b) Gel obtido para a cromatografia. Poço 1: tubo 2; poço 2: tubo 3; poço 3: tubo 5; poço 4: tubo 6; poço 5: tubo 8; poço 6: tubo 11; poço 7: tubo 12; poço 8: tubo 15; poço 9: marcador de massa molecular (MMM); poço 10: tubo 17.



Outra cromatografia (figura 49) visando otimização foi realizada, com perfil de eluição mais lento, o que separou melhor os picos da cromatografia anterior (figura 48). O gel obtido (figura 49), indica que o tubo 24 (poço 13 do gel), possui uma banda algo acima de 45 kDa, que pode ser da proteína que se está tentando purificar, porém, como anteriormente a proteína está se desligando da coluna em 40 mmol L⁻¹ de imidazol e não está saindo totalmente purificada.

Figura 49: Segunda cromatografia realizada para a GTPase YchF. b) Gel obtido para a cromatografia: poço 1: tubo 1; poço 2: tubo 2; poço 3: tubo 3; poço 4: tubo 4; poço 5: tubo 6; poço 6: tubo 7; poço 7: tubo 8; poço 8: tubo 9; poço 9: tubo 13; poço 10: tubo 14; poço 11: tubo 22; poço 12: tubo 23; poço 13: tubo 24; poço 14: marcador de massa molecular (MMM).

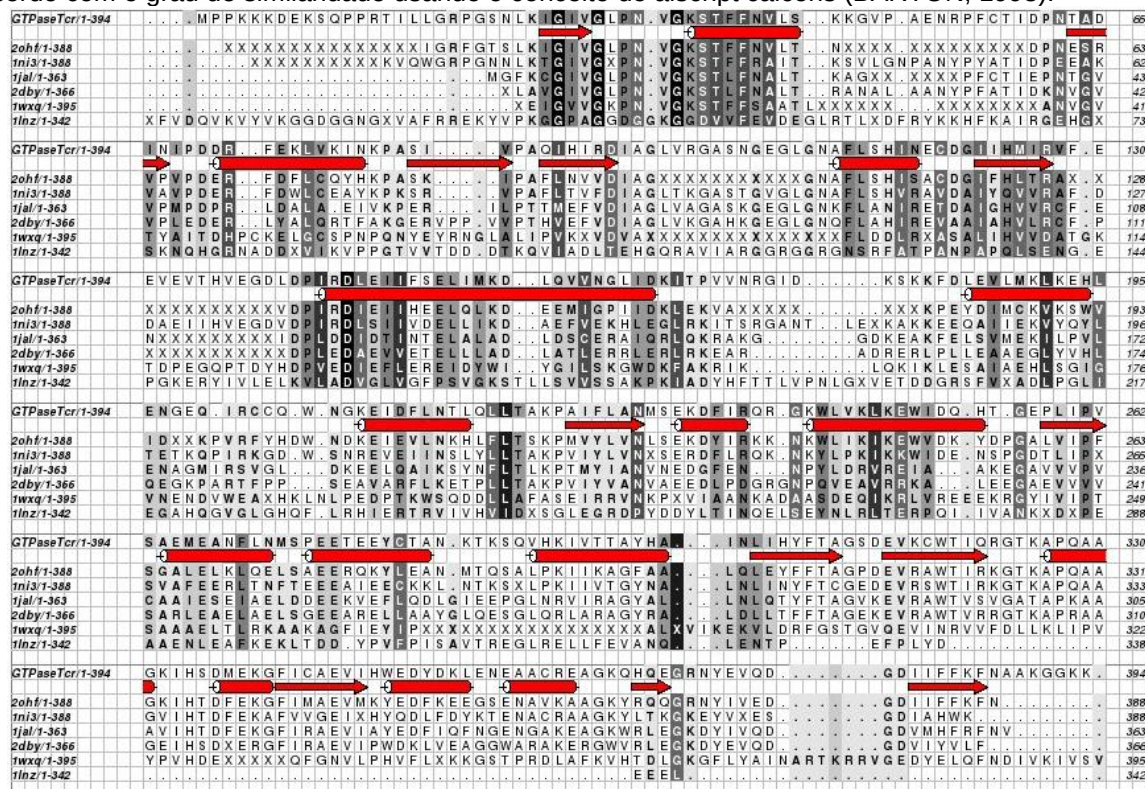


Como não foi possível purificar a proteína GTPase YchF para realizar ensaios de cristalização, optou-se pelo caminho computacional, construir um modelo por homologia, baseado em estruturas que já foram determinadas e que possuem sequência semelhante à da GTPase YchF. O código das estruturas, organismo, resolução, similaridade segundo o BLAST (BLAST..., 2012) e identidade encontram-se na tabela 17. O alinhamento (figura 50) foi realizado com base nas estruturas encontradas por meio das ferramentas BLAST (BLAST..., 2012) e MHOLline.

TABELA 17: Proteínas similares à GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*

Código PDB	Organismo	Resolução	Similaridade	Identidade
2ohf	<i>Homo sapiens</i>	2,70	73%	53%
1ni3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,80	67%	48%
1jal	<i>Haemophilus influenzae</i>	2,40	61%	42%
2dby	<i>Thermus thermophilus</i>	1,76	58%	41%
1wxq	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	2,60	50%	34%
1lnz	<i>Bacillus subtilis</i>	2,60	47%	33%

Figura 50: Alinhamento GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*, a estrutura secundária em vermelho é mostrada para a proteína 2ohf (GTPase YchF de *Homo sapiens*). Os resíduos foram coloridos de acordo com o grau de similaridade usando o conceito do alscript calcons (BARTON, 1993).

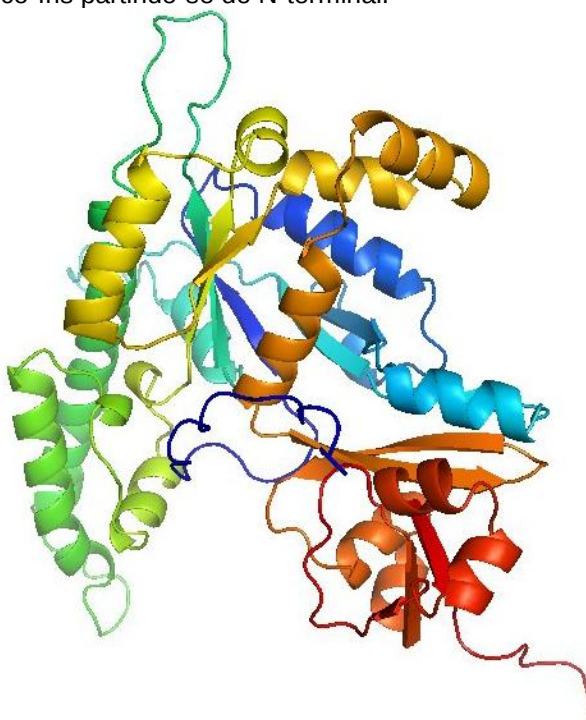


LEGENDA:

- ↗ Alfa-hélice
- Beta-folha

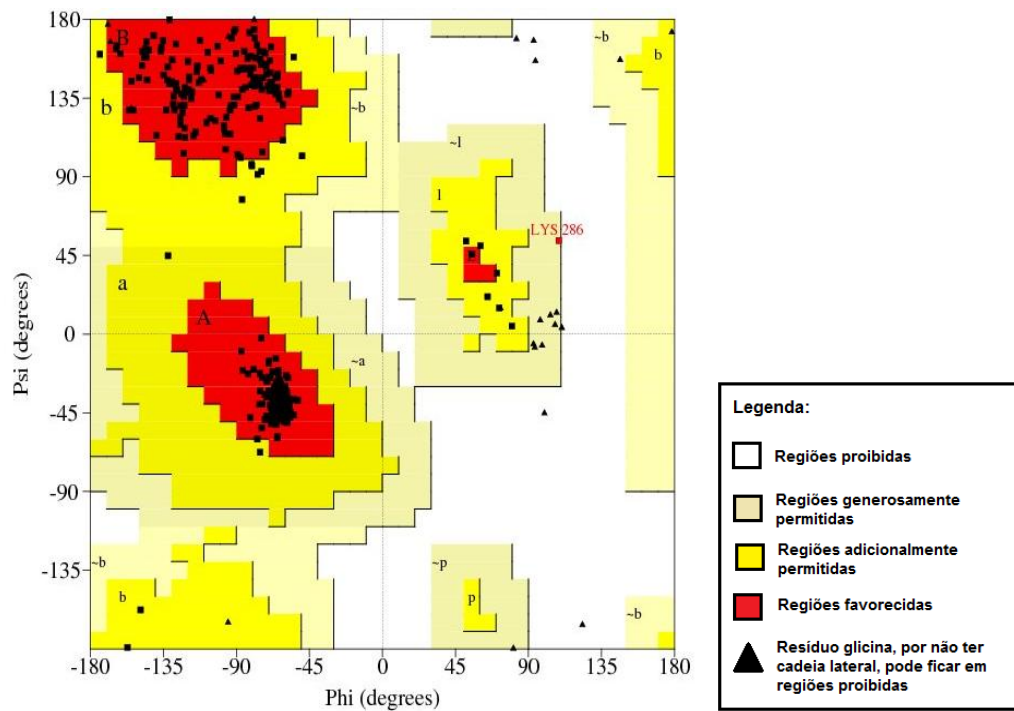
Todaíva, para a construção do modelo (figura 51) da GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*, usaram-se como modelo apenas as estruturas 2ohf e 2dby, estruturas que foram resolvidas complexadas. A inclusão das demais levava, sempre, a vários resíduos em posições desfavoráveis no gráfico de Ramachandran.

Figura 51: Modelo obtido por homologia para a GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*, a estrutura foi colorida com as cores do arco-íris partindo-se do N-terminal.



Para validação desta estrutura utilizou-se o programa procheck (LASKOWSKI et al., 1993), cujo gráfico de Ramachandran é apresentado na figura 52. Observa-se que 94,5% dos aminoácidos estão em regiões favoráveis, 5,2% em regiões adicionalmente permitidas e 0,3% em regiões adicionalmente permitidas.

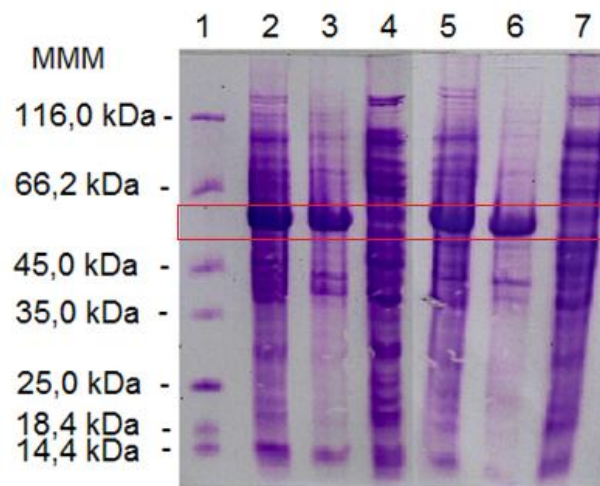
Figura 52: Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo da GTPase YchF de *Trypanosoma cruzi*.



4.3 Enolase de *Trypanosoma cruzi*

Eletroforeses das tentativas de expressão, a 20 °C e 37 °C são mostradas na figura 53. Pode-se perceber que a 20 °C a expressão foi relativamente melhor, porém, a maior quantidade de proteína expressa fica no sedimento ("pellet").

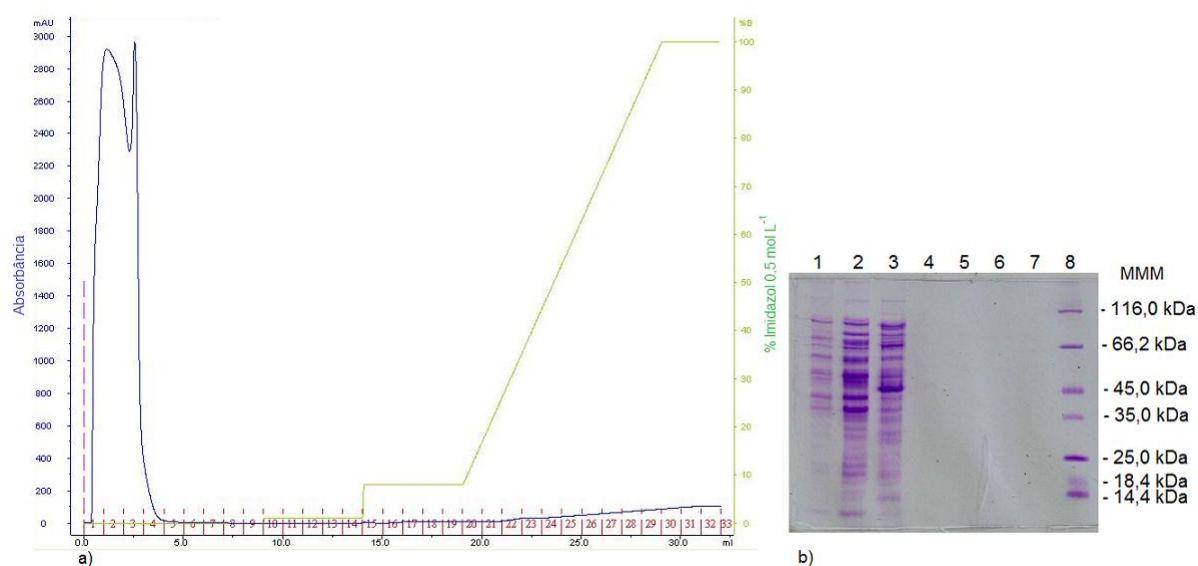
Figura 53: Gel obtido para as tentativas de expressão da enolase: Poço 1: marcador de massa molecular (MMM); poço 2: total 20 °C; poço 3: sedimento ("pellet") 20 °C; poço 4: sobrenadante 20 °C; poço 5: total 37 °C; poço 6: sedimento ("pellet") 37 °C; poço 7: sobrenadante 37 °C. O retângulo vermelho indica aproximadamente onde aparece a banda da proteína enolase de massa 57, 2 kDa.



A massa molecular da enolase é 57,2 kDa; no gel obtido na figura 53, observa-se a banda de superexpressão, mas a maior quantidade de proteínas ficou no sedimento ("pellet").

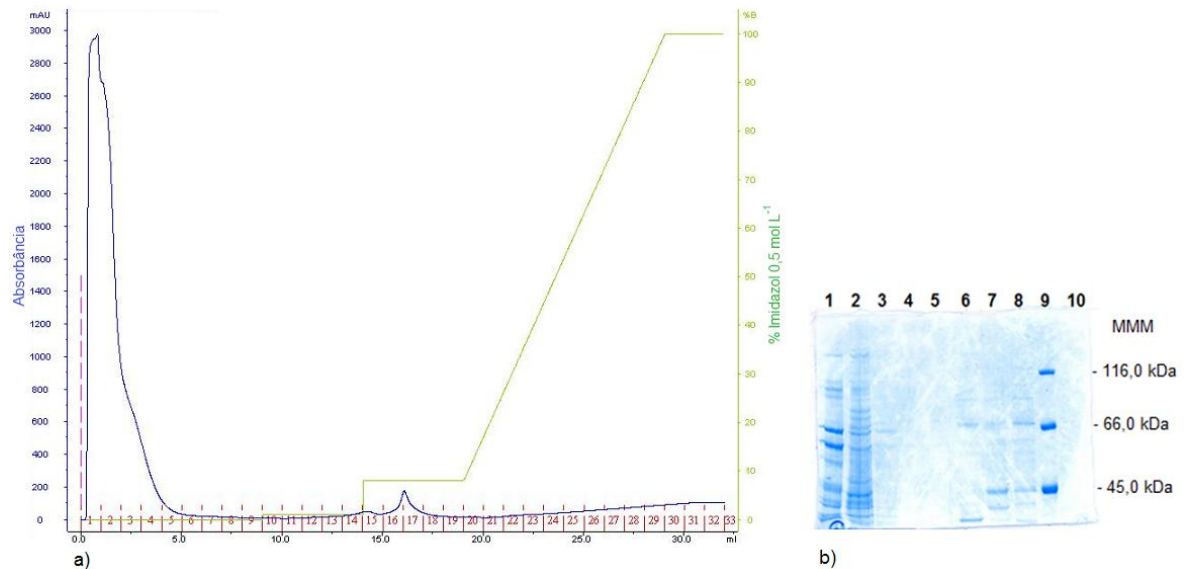
De qualquer forma, mesmo com a banda mais fraca, realizou-se com o sobrenadante cromatografia de afinidade, mas pode-se observar comparando-se o cromatograma obtido (figura 54a) com o gel obtido (figura 54b) que não houve purificação, a proteína pode ter saído antes mesmo de se aplicar imidazol. Sendo assim, é necessário uma otimização na expressão e na purificação desta proteína.

Figura 54: a) Primeira cromatografia realizada para a enolase, coluna utilizada: HiTrap Chelating e b) Gel obtido para a cromatografia: Poço 1: tubo 1; poço 2: tubo 2; poço 3: tubo 3; poço 4: tubo 4; poço 5: tubo 15; poço 6: tubo 22; poço 7: tubo 22; poço 8 : marcador de massa molecular (MMM).



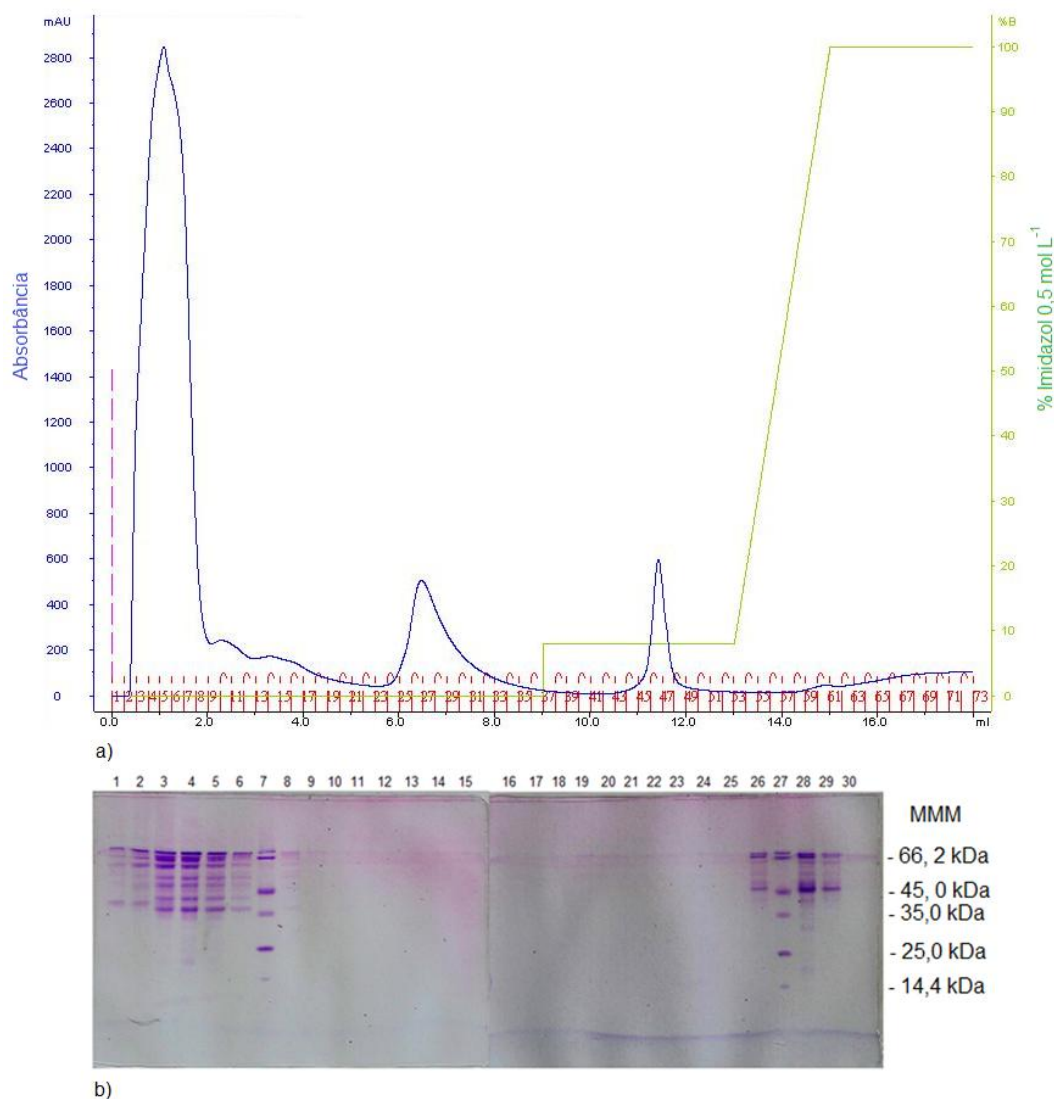
Devido ao insucesso da cromatografia anterior, outra cromatografia foi realizada, trocando-se de coluna. Os resultados podem ser vistos na figura 55 (cromatograma e gel).

Figura 55: a) Segunda cromatografia obtida para a enolase, coluna utilizada: HiTrap FF Crude, b) gel obtido para a cromatografia: poço 1: tubo 1; poço 2: tubo 2; poço 3: tubo 3; poço 4: tubo 4; poço 5: tubo 5; poço 6: tubo 15; poço 7: tubo 17; poço 8: tubo 26; poço 9: marcador de massa molecular (MMM).



Posteriormente mais uma cromatografia foi realizada, recolhendo-se menor volume por tubo e de forma mais lenta, utilizando-se a coluna Chelating; como pode ser visto no cromatograma e no gel (figura 56), também não se observou uma purificação clara para a proteína enolase (57,2 kDa).

Figura 56 a) Terceira cromatografia obtida para a enolase, mais lenta com menor volume por tubo, b) gel obtido para a cromatografia, poço 1: tubo 2; poço 2: tubo 3; poço 3: tubo 4; poço 4: tubo 5; poço 5: tubo 6; poço 6: tubo 7; poço 7: MMM; poço 8: tubo 8; poço 9: tubo 9; poço 10: tubo 10; poço 11: tubo 11; poço 12: tubo 12; poço 13: tubo 13; poço 14: tubo 14; poço 15: tubo 15; poço 16: tubo 16; poço 17: tubo 17; poço 18: tubo 18; poço 19: tubo 25; poço 20: tubo 26; poço 21: tubo 27; poço 22: tubo 28; poço 23: tubo 29; poço 24: tubo 30; poço 25: tubo 31; poço 26: tubo 45; poço 27: MMM; poço 28: tubo 46; poço 29: tubo 47; poço 30: tubo 60.



Como ainda não foi possível purificar a proteína enolase para realizar ensaios de cristalização, optou-se pelo caminho computacional, construir um modelo por homologia, baseada nas estruturas que já foram resolvidas e que possuem sequência similar a da enolase.

O código do PDB das estruturas, organismo, resolução, similaridade e identidade usadas no alinhamento e posteriormente na construção do modelo da enolase de *Trypanosoma cruzi*, encontram-se na tabela 18. O alinhamento (figura 57) foi realizado por meio da comparação da sequência da enolase de *Trypanosoma cruzi* com sequências similares de estruturas de proteínas já determinadas,

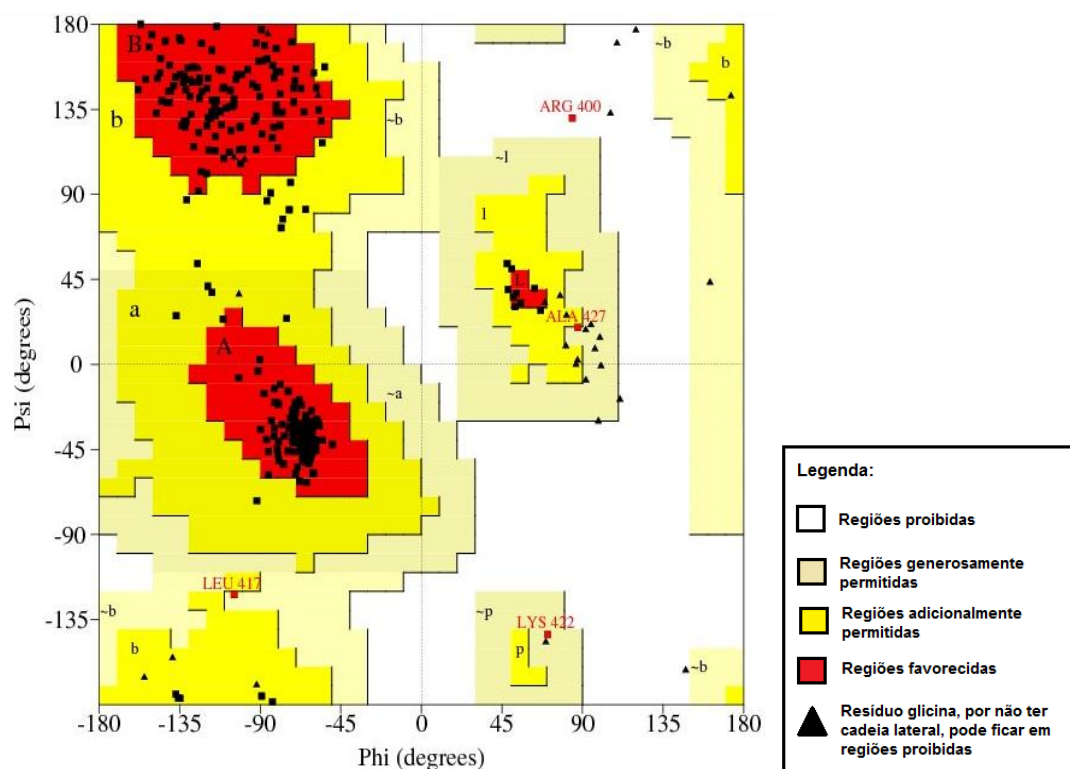
depositadas no PDB, encontradas por meio da ferramenta BLAST (BLAST..., 2012). Como várias estruturas resolvidas encontradas eram do mesmo organismo, deram-se preferência para modelagem as estruturas determinadas com uma melhor resolução levando-se em consideração a presença de ligantes.

TABELA 18: Proteínas similares à enolase de *Trypanosoma cruzi*

Código	Organismo	Resolução / Å	Similaridade	Identidade
2ptz	<i>Trypanosoma brucei</i>	1,65	93%	87%
2akz	<i>Homo sapiens</i>	1,36	77%	62%
3qtp	<i>Entamoeba histolytica</i>	1,90	74%	61%
1pdy	<i>Homarus gammarus</i>	2,40	73%	59%
2al1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,50	75 %	59 %
2pa6	<i>Methanocaldococcus jannaschi</i>	1,85	73%	57%
1iyx	<i>Enterococcus hirae</i>	2,80	69%	53%
1w6t	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,10	66%	50%
2fym	<i>Escherichia coli</i>	1,60	67%	52%
3tqp	<i>Coxiella burnetii</i>	2,20	64 %	46%

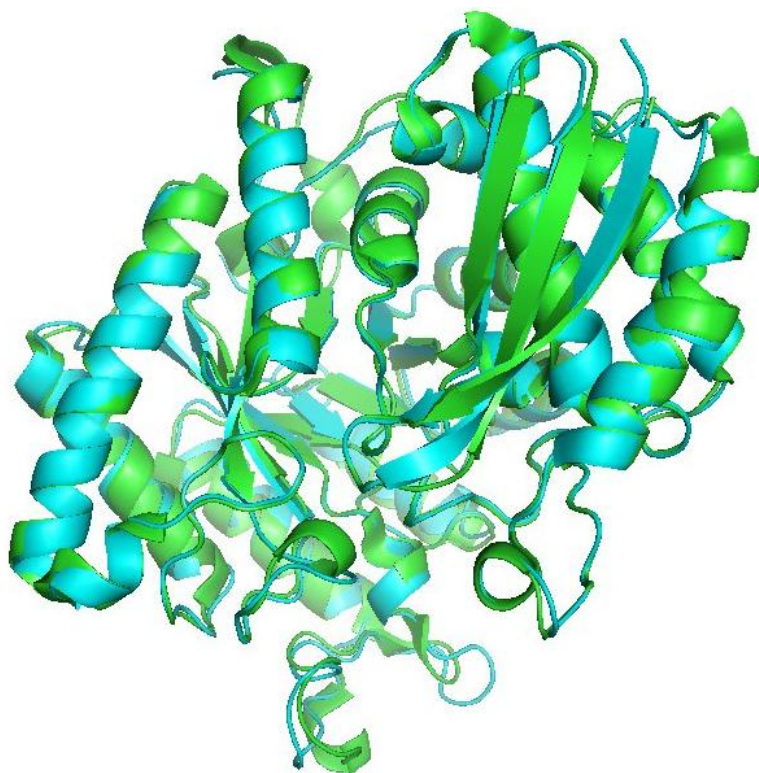
A figura 59 mostra o gráfico de Ramachandran usado para validar o modelo obtido. Observa-se que 92,7% dos resíduos estão em regiões favorecidas, 6,2% estão em regiões adicionalmente permitidas, 0,8% estão em regiões generosamente permitidas e 0,3% estão em regiões desfavoráveis.

Figura 59: Gráfico de Ramachandran para o modelo da enolase de *Trypanosoma cruzi*.



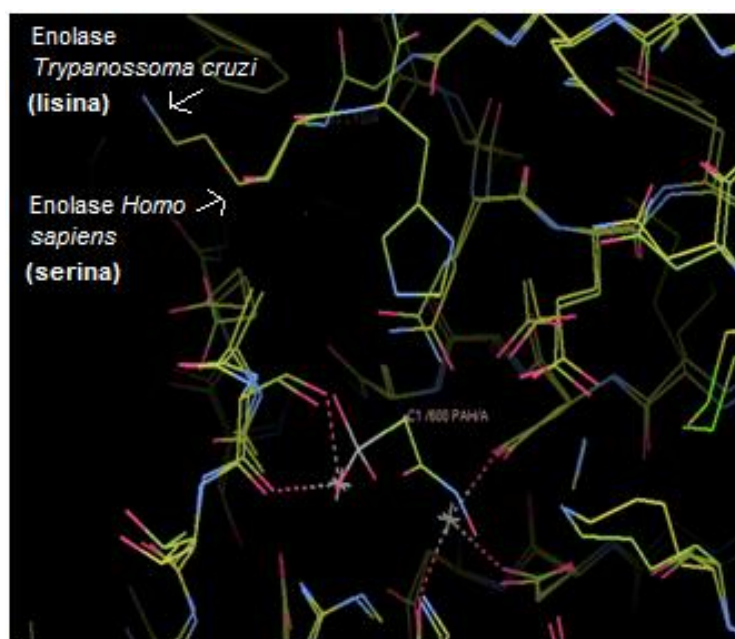
O modelo construído por homologia para a enolase de *Trypanosoma cruzi* foi comparado com a estrutura experimental da enolase de *Homo sapiens*, buscando-se uma diferença entre eles principalmente no sítio de ligação, que pudesse ser explorada e assim propor inibidores mais específicos para a enolase de *Trypanosoma cruzi*. A figura 60 apresenta a sobreposição realizada com as duas estruturas, indicando o quanto as estruturas são semelhantes.

Figura 60: Modelo por homologia construído com MODELLER para a enolase de *Trypanosoma cruzi* (azul) em sobreposição com a enolase de *Homo sapiens* (2akz) (verde).



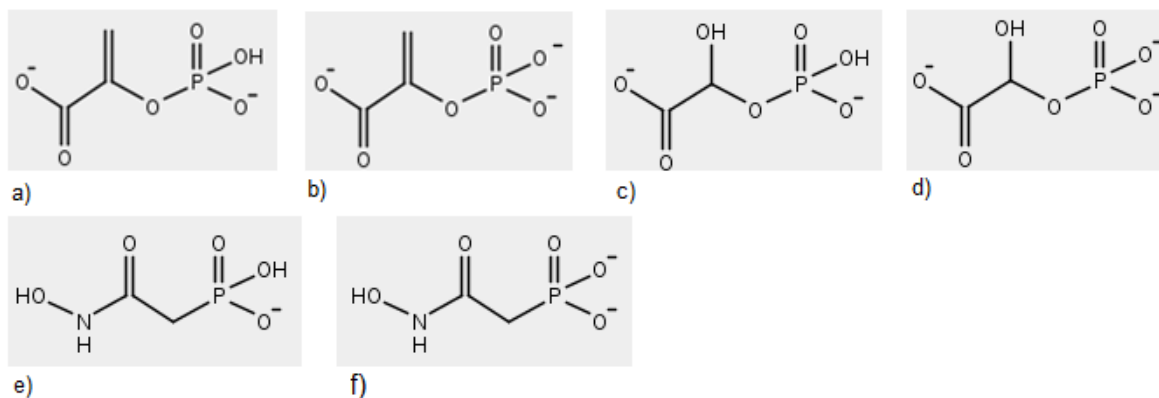
Observaram-se duas diferenças maiores, das quais se explorou a substituição da serina (aminoácido número 156) na humana por uma lisina (número 155) (figura 61) na do parasita. Tal diferença, inclusive, foi posteriormente denotada num artigo de revisão publicado, colaborando com o trabalho que foi feito (AVILÁN, 2011). Os aminoácidos observados encontram-se próximos do sítio de ligação, o que torna muito interessante o estudo de possíveis interações destes com ligantes/inibidores, possibilitando a descoberta de algum inibidor que apresente maior interação com a lisina presente na enolase do parasita e não interaja com a serina presente na enolase humana.

Figura 61: Resíduos diferentes entre a estrutura da proteína enolase de *Homo sapiens* (serina) e a de *Trypanosoma cruzi* (lisina). A figura apresenta também o inibidor PAH no sítio de ligação da proteína enolase de *Homo sapiens*.



Com o objetivo de se encontrar algum ligante/inibidor para a enolase do parasita realizou-se na literatura e internet uma busca por ligantes presentes em estruturas já determinadas de proteínas similares, encontrando-se os ligantes: ácido 2-fosfoglicérico (código 2PG) (substrato), ácido 2-fosfoenolpirúvico (código PEP) (substrato) e ácido fosfanoacetohidroxâmico (figura 60) (código PAH) (inibidor). Os ligantes encontrados são apresentados na figura 62.

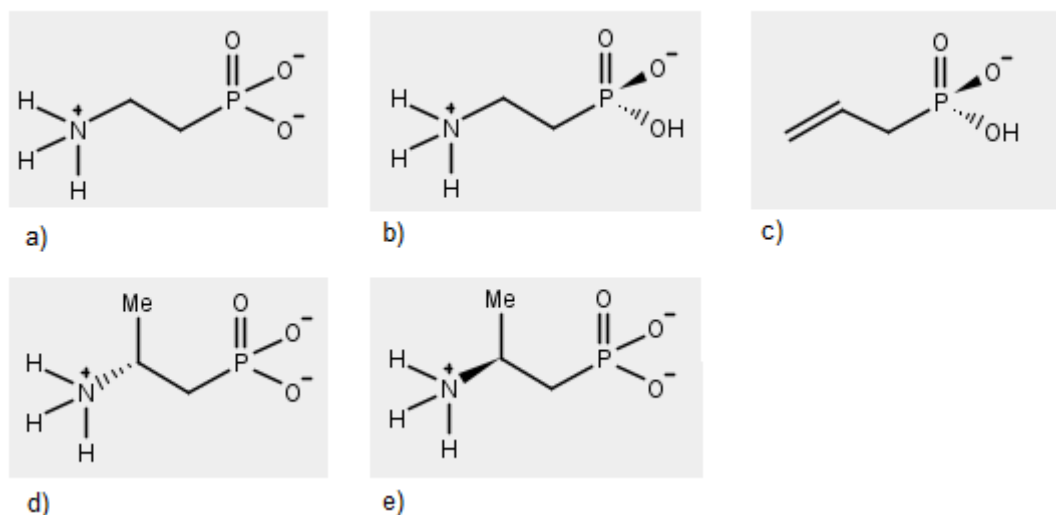
Figura 62: Ligantes encontrados por meio de busca na literatura e internet, com as duas cargas mais prováveis em meio fisiológico a) PEP-2, b) 2 PEP-3, c) PG2-2, d) PG2-3, e) PAH-1 e f) PAH-2.



A partir do inibidor PAH, fez-se uma busca no banco de estruturas ZINC ("ZINC Is Not Commercial") por inibidores semelhantes, na qual se encontraram

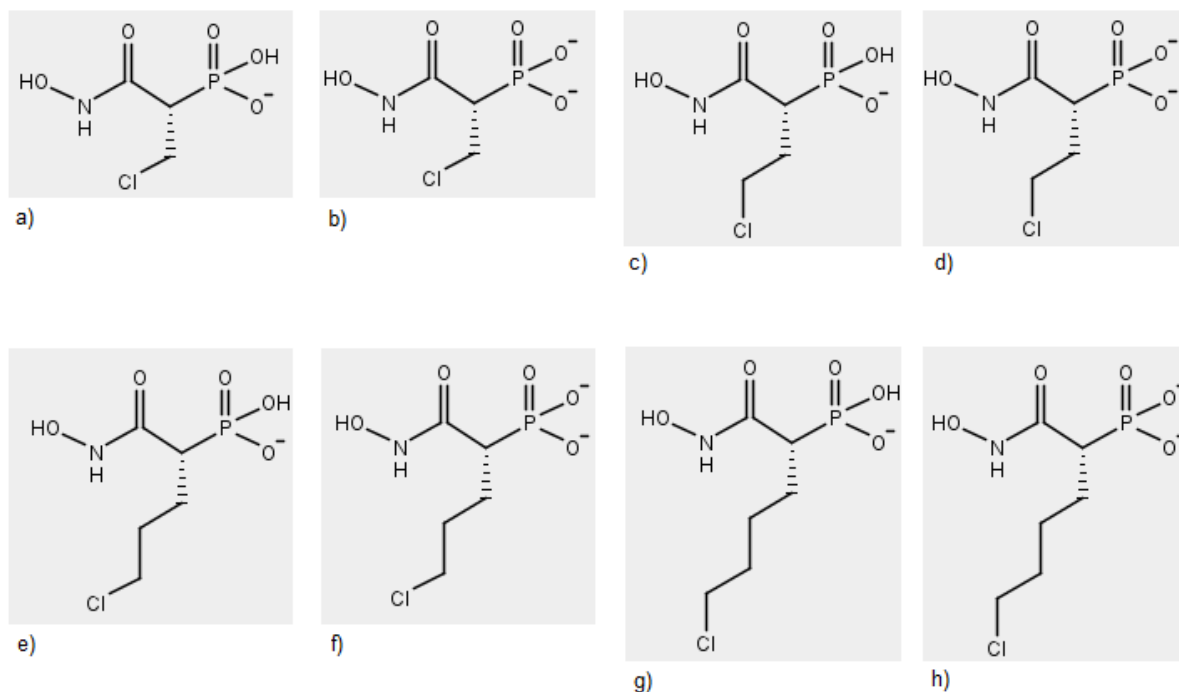
cinco compostos, embora somente quando se reduziu a similaridade para 50% no módulo de busca (figura 63). Dois deles (d; e) referem-se a estados de protonação diferentes.

Figura 63: Ligantes semelhantes ao PAH encontrados por meio de busca no ZINC, cujos códigos neste banco de estruturas são a) 3869509, b) 55157330, c) 25695689, d) 16951460 e e) 1720921. "a" e "b" diferem apenas pela protonação.



Procurou-se também sugerir ligantes (figura 64), para explorar as diferenças estruturais, a partir de observação do sítio de ligação do PAH, modificações visando por um átomo Cl (cloro) para alcançar e interagir com a lisina presente na estrutura da proteína de *Trypanosoma cruzi* e não com a serina na de *Homo sapiens* (figura 61). Para verificar a viabilidade desta interação, estudos foram realizados por alocação ("docking") e dinâmica molecular com estimativas de energias de interação.

Figura 64: Ligantes sugeridos, nomeados: a) PA1-1; b) PA1-2; c) PA2-1; d) PA2-2; e) PA3-1; f) PA3-2; g) PA4-1 e h) PA4-2.



As tabelas 19 e 20 mostram o resultado da alocação ("docking") realizado com as moléculas anteriormente citadas.

TABELA 19: Resultado da Alocação ("Docking") na enolase de *Homo sapiens*

Ligante	Número de agrupamentos	Maior agrupamento	Menor energia do maior agrupamento/ kcal mol ⁻¹
PG2-3	4	22	-22,88
PEP-3	2	28	-22,25
ZINC25695689-2	2	36	-20,71
PG2-2	3	36	-19,17
PEP-2	2	38	-18,85
PAH-2	4	30	-17,92
PA1-2	3	18	-14,75
PA2-2	3	18	-13,40
ZINC25695689-1	2	36	-12,32
PAH-1	3	34	-12,00
ZINC55157330-1	2	38	-11,30
ZINC16951460-1	3	36	-11,02
ZINC1720921-1	3	18	-9,21
PA1-1	8	22	-8,94
ZINC16951460-0	1	40	-5,15
ZINC55157330-0	1	40	-4,93
ZINC1720921-0	1	40	-4,05
PA3-2	16	6	-0,17
PA4-2	12	10	-0,17
PA2-1	15	6	0,42
PA3-1	14	6	1,77
PA4-1	16	6	3,12

TABELA 20: Resultado da Alocação ("Docking") na enolase de *Trypanosoma cruzi*

Ligante	Número de agrupamentos	Maior agrupamento	Menor energia do maior agrupamento/ kcal mol ⁻¹
PEP-3	4	22	-20,28
PG2-3	4	18	-20,26
ZINC25695689-2	3	22	-19,34
PG2-2	3	32	-19,26
PEP-2	4	28	-17,72
PAH-2	6	18	-17,64
PA1-2	7	14	-15,84
PA2-2	7	14	-13,53
PA3-2	13	8	-12,62
PAH-1	2	34	-12,49
ZINC25695689-1	3	26	-11,84
PA1-1	9	10	-11,67
ZINC16951460-1	4	24	-11,12
ZINC55157330-1	2	34	-10,90
ZINC1720921-1	4	20	-10,80
PA2-1	16	6	-9,18
ZINC55157330-0	1	40	-7,10
ZINC16951460-0	2	34	-6,84
ZINC1720921-0	5	30	-6,21
PA3-1	15	6	-2,95
PA4-2	14	8	-2,56
PA4-1	12	8	0,17

Pode-se verificar que, de forma geral, os substratos, fosfoenolpiruvato (PEP) e 2-fosfoglicerato (PG2), assim como o inibidor fosfonacetohidroxiato (PAH), apresentaram as energias mais favoráveis. Também é notável que o composto ZINC25695689-2 apresentou resultado de alocação favorável. Ou seja, estes foram os compostos que melhor interagiram com o sítio de ligação das proteínas enolase de *Trypanosoma cruzi* e de *Homo sapiens*.

Além da realização de alocação ("docking"), também, modelou-se, a partir da posição cristalográfica experimental do inibidor PAH que já tem relato na literatura de sua capacidade inibitória, as modificações apresentadas na figura 64 e realizaram-se, para cada um, estudos por dinâmica molecular, alocando-os no sítio de ligação da enolase de *Homo sapiens* (Hs) e de *Trypanosoma cruzi* (Tc). Os complexos assim modelados foram submetidos ao programa AMBER (Assisted Model..., 2011). Os resultados de energias de ligação estimadas estão na tabela 21.

TABELA 21: Energias de ligação estimadas por dinâmica molecular, para comparação da interação dos ligantes com enolase de *Trypanosoma cruzi* (Tc) e enolase de *Homo sapiens* (Hs).

Complexo	ΔG ligação médio / kcal mol ⁻¹	Desvio padrão do ΔG / kcal mol ⁻¹
Hs+PAH-2	-181,23	9,72
Hs+PA1-2	-146,29	6,91
Hs+PA2-2	-172,06	14,90
Hs+PA3-2	-141,79	8,24
Hs+PA4-2	-173,13	8,02
Tc+PAH-2	-169,74	10,47
Tc+PA1-2	-156,88	9,83
Tc+PA2-2	-163,77	7,53
Tc+PA3-2	-196,26	7,61
Tc+PA4-2	-175,97	8,34

Aparentemente, a presença de um átomo de cloro ligado ao inibidor poderia promover melhoria da energia de interação, sobretudo quando acrescentado de 3 átomos de carbono entre este e o restante da molécula, embora não se tenha detectado interação diretamente entre este e o nitrogênio da lisina 155. Os valores apresentados na tabela indicam que a energia de interação para o ligante PA3-2 com a enolase de *Trypanosoma cruzi* é de -196,26 kcal mol⁻¹, enquanto que para o mesmo ligante com a enolase de *Homo sapiens* o valor de energia de interação é o mais baixo de toda a tabela, -141,79 kcal mol⁻¹. Isso indica que esse ligante teria o melhor discernimento de ligação preferencial para a enolase de *Trypanosoma cruzi* em comparação com a de *Homo sapiens*.

5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

- Para o centeio por meio de cromatografias, separaram-se dois inibidores diferentes (A2 e B2), ambos cristalizaram, porém não apresentaram difração de raios X, para confirmar a diferença entre eles;

- Com imagens de difração, de um cristal geminado obtidas anteriormente, para um inibidor de alfa-amilase do centeio, foi possível um estudo estrutural deste, dada a possibilidade atual dos programas de refinamento de tratar este problema, com o processamento e refinamento chegou-se a conclusão que o mesmo pertence ao grupo P3₁ e que realmente o cristal era geminado, obtendo-se a valores de R_{factor} de 17,9 % e R_{free} de 21,4 %, com a resolução de 2,24 Å. A estrutura refinada foi comparada com o inibidor de alfa-amilase 0,19 do trigo, revelando-se ser muito similar a esta;

- Para as proteínas GTPase TcYhF e enolase de *Trypanosoma cruzi* apresentaram-se alinhamentos e modelos por homologia;

- A enolase de *Trypanosoma cruzi*, foi comparada com a enolase de *Homo sapiens*, também buscou-se e planejou-se inibidores para ela, por meio de pesquisa na literatura e em bancos de dados; assim, fez-se a alocação ("docking") destes, obtendo-se energias de ligação mais favoráveis para os substratos, fosfoenolpiruvato (PEP) e 2-fosfoglicerato (PG2), para o inibidor fosfonacetohidroxamato (PAH) e para o composto codificado ZINC25695689 do banco de dados ZINC. Também, a partir da posição experimental do inibidor PAH, estimaram-se as energias de interação para as moléculas pesquisadas e planejadas, através do programa de dinâmica molecular AMBER (Assisted Model..., 2011) e, aparentemente, a presença de um átomo de cloro convenientemente ligado ao inibidor poderia promover melhoria da energia de interação da enolase de *Trypanosoma cruzi* com o inibidor PA3-2.

Durante a realização do trabalho teve-se aprendizagem com relação a:

- Purificação de proteínas: diálise, centrifugação, precipitação fracionada, cromatografias (iônica e de afinidade);
- Técnicas de análise: eletroforese, dosagem protéica, ensaios de inibição;
- Concentração de proteínas;
- Ensaios de cristalização;
- Expressão de proteínas: fermentação, sonicação;

- Técnicas computacionais: busca de sequências e estruturas em bancos de dados, modelagem por homologia;
- Determinação de estrutura protéica: processamento de imagens, substituição molecular, refinamento e validação;
- Alocação ("Docking");
- Dinâmica molecular e estimativas de energia.

O trabalho relacionado ao inibidor de alfa-amilase do centeio (esclarecimento da presença de dois diferentes inibidores) poderá ser continuado, obtendo-se cristais melhores para os inibidores A2 e B2, que possam apresentar boas imagens com a difração de raios X, e consequentemente seja possível a resolução da estrutura destes.

Quanto as proteínas GTPase YchF e enolase de *Trypanosoma cruzi* é necessário melhor otimização do método de purificação destas, para obter-se assim as proteínas puras e biologicamente ativas, para ensaios de cristalização, e estudos estruturais.

REFERÊNCIAS

ABE, J. I.; SIDENIUS, U.; SVENSSON, B. **Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds.** *Biochem. J.* v. 293, p.151-155, 1993.

ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. **Journal of Chemical Physics.** v. 31, n.2, p. 459-467, 1959.

ALESSANDRO, F. Estudos estruturais e bioquímicos das septinas 7 e 9 humanas. Dese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal Ethnopharmacology**, v.107, p.449-455, 2006.

Aline: An Extensible WYSIWYG Protein Sequence Alignment Editor for Publication Quality Figures. Disponível em: <<http://crystal.bcs.uwa.edu.au/px/charlie/software/aline/>>. Acesso em: 17 set. 2011.

Ammonium Sulfate Calculator. Disponível em: <<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>>. Acesso em: 02 mar. 2011).

Assisted Model Building with Energy Refinement. Disponível em: <<http://ambermd.org/>>. Acesso em: 15 out. 2011).

ÁVILAN, L. et al. Enolase: a key Player in the metabolism and a probable virulence factor of Trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia Coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p. 411-421, 1999.

BARTON, G. J. ALSCRIPT a tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering**, v. 6, n. 1, p. 37-40, 1993.

Benzonidazol. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Benzonidazol>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

BERNFELD, P. Amylases alpha and betha. **Methods Enzymology**, v. 1, p. 149-154, 1995.

Bicudo-do-algodoeiro. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Bicudo-do-algodoeiro>>. Acesso em: 02 fev. 2011.

BLAST Assembled RefSeq Genomes. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

BLOCH Jr, C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5kD) protein inhibitors of insect α -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat δ -purothionins. **FEBS Letters**. v. 279, p. 101-104, 1991.

BOLTEN, K. E. et al. *Sarcocystis neurona*: molecular characterization of enolase domain I region and a comparison to other protozoa. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 108-112, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

Bradford Reagent 5x: reagent for protein quantification. Disponível em: <http://www.serva.de/servaWeb/www_root/documents/39222_e_1.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012).

CALDON, C. E.; YOONG, P.; MARCH, P. F. Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 289-297, 2001.

CARAWAY, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 32, n. 1, p. 97-99, 1959.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CASTRO, M. de S.; FONTES, W. Plant defense and antimicrobial peptides. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 13-18, 2005.

CCP4bb navigation: new version of refmac (v5.5). Disponível em: <<http://www.protein-crystallography.org/ccp4bb/message5995.html>>. Acesso em: acesso em 12 fev. 2012.

Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en>>. Acesso em: em 2 de jan. 2012.

CHANG, G. C. et al. Identification of α -enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. **Clinical Cancer Research**. v.12, p. 5746-5754, 2006.

CHEATHAM, T. E.; YOUNG, M. A. Molecular dynamics simulation of nucleic acids: successes, limitations, and promise. **Biopolymers**, v. 56, n. 4, p. 232-256, 2001.

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

ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Acesso em: 28 out. 2011.

Collaborative Computational Project No. 4: software for macromolecular X-ray crystallography. Disponível em: <<http://www.ccp4.ac.uk/>>. Acesso em: 13 nov. 2011.

CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; BLUNDELL, T. L. Structural biology and drug discovery. **Nature Reviews**, v. 10, n.13, p. 895-907, 2005.

CORRADINI, E. et al. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

COURA, J. R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

CULLITY, B. D. Elements of X-Ray Diffraction. 2ed. Massachusetts: **Addison-Wesley Publishing Company**, Inc., 555 p. 1978.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. **Journal of Structural Biology**, v. 134, p. 246-256, 2001.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and Application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121: 404-427, 1964.

DAYLER, C.S.A. et al. Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5616-5620, 2005.

DIAS, S. C. et al. Molecular cloning and expression of an alpha-amylase inhibitor from rye with potential for controlling insect pests. **Journal Protein**, v. 24, n. 2, p. 113-123, 2005.

EMBOSS Stretcher - Pairwise Sequence Alignment. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/>. Acesso em: 26 abr. 2011.

Embrapa Trigo. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/>>. Acesso em: 26 abri. 2010.

ENGEL, J. C. et al. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotas. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1-2, p. 1-10, 1987.

ESWAR, M. A. et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Protein Science**, v. 15,p. 5.6.1-5.6.30, 2006.

FENG, G.H.et al. α -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. **Insect Biochemistry**. Mol. Biol. v. 26, p. 419-426, 1996.

FERNANDES, L. P. et al. Produção de amilase pelo fungo *macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 4, n.1, p. 43-51, 2007.

FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por Homologia. **Química Nova**. v.26, n.2, p. 253-259, 2003.

FRAGOSO, S. P., et al. **Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi***. *Molecular and Biochemical Parasitology* v. 126, p. 113-117, 2003.

FRANCO, O.L. et al. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal Biochemistry**, v.267, p. 2166-2173, 2000.

FRASER, C. M. et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, p. 397-403, 1995.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today**, v.7, n. 9, p. 240-244, 1991.

GARCIA-MOROTO, F.; CARBONERO, P.; GARCIA-OLMEDO, F. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect α -amylase. **Plant Molecular Biology**. v. 17, p. 1005-1011, 1991.

GIACOVAZZO, H. L. et al. **Fundamentals of Crystallography**. IUCr Texts on Crystallography – 7. 2ed. International Union of Crystallography. Oxford: Oxford University Press, 2002.

GMMSB - Grupo de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos. Disponível em: <<http://www.gmmsb.lncc.br/index.php?pg=3>>. Acesso em: 25 abr. 2011.

GONTIJO, E. D.; SANTOS, S. E. **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=173>>. Acesso em: 01 fev. 2012.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G.M.; OLSON, A. J. **Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock**. *Journal Molecular Recognition*, v.9, n. 1, p. 1-5, 1996.

GRADIA, F. D. **TcYchF - Uma nova ATPase associada à maquinaria de tradução do protozoário *Trypanosoma cruzi***. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008.

GROSSI DE SÁ, M. F. et al. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v. 203, p. 295-303, 1997.

HIV-1 protease. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/HIV-1_protease>. Acesso em: 15 fev. 2012.

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M.J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiology**, v. 11, p. 393-401, 1996.

IULEK, J. et al. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereal* (Rye). **International Journal of Experimental and Clinical Cellular Physiology**, Biochemistry and Pharmacology, v. 32, p. 1195-1204, 2000.

JONASSON, P. et al. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 35, p. 91-105, 2002.

JUNIOR, A. N. et al. **Cultivo de centeio**. EMBRAPA TRIGO, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Centeio/CultivodeCenteio_2ed/introducao.htm>. Acesso em: 26 dez. 2010.

KADZIOLA, A. et al. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, n.1, p. 104-21, 1994.

Karplus M.; McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646-652, 2002.

KENDREW, J. C. et al. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. **Nature**, v. 181, p. 662-666, 1958.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews**. Drug discovery, v. 3, n. 11, p. 935-349, 2004.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, p. 381-387, 2000.

KONDO, N. K. **Níveis e Atividade Específicas dos Inibidores de Alfa-amilase de Cultivares de Trigo Recomendadas no Paraná: extração, purificação e caracterização parcial**. 1991. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias Departamemto de Tecnologia de alimentos e medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LAYER, P. et al. Effect of a purified amylase inhibitor on carbohydrate tolerance in normal subjects and patients with diabetes mellitus. **Mayo Clinic Proceedings**, v.61, p. 447, 1986.

LEIPE, D.D. et al. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, p. 41-72, 2002.

Ligação peptídica: unindo aminoácidos. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica9.php>. Acesso em: 13 fev. 2012.

LIN, Y. H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of rice bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor from *Oryza sativa*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n.8, p.743-5, 2006.

LOIZZO, M. R. et al. Composition and α -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 323-326, 2007.

LYONS, A. et al. Characterization of homologous inhibitors of trypsin and alpha-amylase from seeds of rye (*Secale cereale* L.). **Journal Biochemistry Acta**, v. 915, n.2, p. 305-313, 1987.

MARSHALL, J.J.; LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, 1975.

MARIN-NETO, J. A. et al. Indeterminate form of Chagas' disease: proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 6, p. 623-627, 2002.

MARTI-RENOM, M. A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, v. 29, p. 291-325, 2000.

McPHERSON, A. **Crystallisation of Biological Macromolecules**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1999.

MELO, F. R.; et al. α -Amylase from cowpea seeds. **Protein & Peptide Letters**, v. 6, p. 387-392, 1999.

Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. Disponível em: <<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1481086>>. Acesso em: 02 fev. 2011.

MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006.

MILLER, M. et al. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. **Science**, v.246, p. 1149-1152, 1989.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases – an overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 163-173, 2005.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 13 set. 2011.

Nelfinavir. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Nelfinavir>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

Nifurtimox. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Nifurtimox>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

ODA, Y. et al. Tertiary and quaternary structures of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. **Biochemistry**, v. 36, n. 44, p. 13503-13511, 1997.

OLIVEIRA, M. F. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v. 37, n. 3, p. 209-228, jul./set. 2008.

ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I. Background and Theory. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 321-349, 1964.

PANCHOLI, V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 7, p. 902-920, 2001.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p.171-180, 2004.

PLEWCZYNSKI, D. et al. Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 742-755, 2010.

PERUTZ, M. F. et al. Structure of hemoglobin: a three-dimensional fourier synthesis at 5-5Å. resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**, v. 185, p. 416-422, 1960.

POMPERMAYER, P. et al. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v.99, p. 79-85, 2001.

PROTEIN DATA BANK: Biological Macromolecular Resource. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 13 set. 2011.

PyMOL. Disponível em: < <http://www.pymol.org/>>. Acesso em: 12 out. 2011).

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95-99, 1963.

REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS D. E. Disk Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels. **Letters to Nature**. v.195, p. 281-283, 1962.

Representação esquemática da eletroforese. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06f1.htm>. Acesso em: 13 fev. 2012.

ROMÃO, M. J. Cristalografia de Proteínas: metodologias e aplicações em Bioquímica. **Boletim de Biotecnologia**, v.53, p. 18-36, 1996.

SARASTE, M., et al. **The P-loop - a common motif in ATP-and GTP-binding proteins**. Trends Biochem. Sci. v. 15, p. 430-434, 1990.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDalton. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SERGOVIA-GAMBOA, N. C et al. Entamoeba invadens, encystation process and enolase, **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 2, p. 63-69, 2010.

SHERWOOD, D.; COOPER, J. **Crystals, x-rays and proteins: comprehensive protein crystallography**. Oxford : Oxford University Press, 2010.

SMITH, T. F.; WATERMAN, M. S.; **Identification of common molecular subsequences**. **Journal of Molecular Biology**. v.147,n. 1, p. 195-197, 1981.

SOUZA, D.W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 269-285, 2002.

SOUZA, F. S. P. **Caracterização da Proteína TcKAP3 do Cinetoplasto do Protozoário Trypanosoma cruzi**. 2009, 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5ed. Trad. Ignez Caracelli, et al. Porto Alegre:Bookman, 2002.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1996.

TEODORO, M. L.; PHILLIPS, G. N.; KAVRAKI, L. E. Molecular Docking: A Problem with Thousands of Degrees of Freedom. **In ICRA**, p. 960-965, 2001. Disponível em: <<http://phillips-lab.biochem.wisc.edu/pdfs/108-docking.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

TIFFIN, P., GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor *wip1* In *Zea* and related genera. **Molecular Biology Evolution**, v.18, p. 2092-2101, 2001.

Trypanosoma cruzi. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi>. Acesso em: 02 jan. 2012.

Uepg's protein purification and 3d structure determination group webpage. Disponível em: <http://www.uepg.br/iulek/>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

VACARI, F. C. M. Cristalização e resolução de estrutura das proteínas *Canavalia gladiata lectin* (CGL) e *Canavalia marítima lectin* (CML) complexadas ao açúcar manose 1-6 manose. Dissertação (Biofísica Molecular), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2010.

VARGHESE, J. N. Development of neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus drugs. **Drug Development Research**. v. 46, p. 176-196, 1999.

VEGA ZZ: molecular modeling toolkit. Disponível em: http://nova.colombo58.unimi.it/cms/index.php?Software_projects:VEGA_ZZ>. Acesso em: 13 nov. 2011.

VIEIRA, R. **Fundamentos de Bioquímica.** Bélem-Pará: Textos Didáticos, 2003. Disponível em: < <http://pt.scribd.com/doc/60245645/Fundamentos-de-Bioquimica-Ricardo-Vieira>>. Acesso em: 24 dez. 2011.

YAMAGATA, H. et al. Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, p. 978-985, 1998.

YANG, J. et al. Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage, **Parasitology Research**, v. 107, p. 667-677, 2010.

XDS Program Package. Disponível em: <http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/>>. Acesso em: 14 set. 2011.

WALKER, J. E. et al. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATPase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide-binding fold. **The EMBO Journal**. v. 1, p. 945-951, 1982.

WALKER, M. J. et al. Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 308–313, 2005.

WALKER, R. & STEINBRECHER, T. **AMBER ADVANCED TUTORIALS TUTORIAL 3 (MM-PBSA).** Disponível em: <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial3/>>. Acesso em: 12 out. 2011.

WANG, J.R. et al. Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS. **Journal of Cereal Science**, v.43, p. 360-368, 2006.

WANG, J. R. et al. Phylogenetic analysis of the dimeric alpha-amylase inhibitor sequences from an orthologous region in 21 different genomes of the tribe Triticeae (Poaceae). **Journal Biochemistry Systems Ecology**, v.38, n.4, p. 708-714, 2010.

WEIL, J.H. **Bioquímica Geral**. 2ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG. J. Determinação de Proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, p. 787-793,1998.

ZINC ¹². Disponível em: <<http://zinc.docking.org/>>. Acesso em: 12 nov. 2011.