

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

VIVIANE PAULA MARTINI

DETERMINAÇÃO E ESTUDOS DE ESTRUTURAS DE COMPLEXOS ENZIMA-
LIGANTES RELEVANTES À BIOLOGIA DAS PTERIDINAS EM PARASITAS: BASE
PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE DROGAS TERAPÊUTICAS CONTRA
DOENÇA DO SONO

PONTA GROSSA
2007

VIVIANE PAULA MARTINI

DETERMINAÇÃO E ESTUDOS DE ESTRUTURAS DE COMPLEXOS ENZIMA-
LIGANTES RELEVANTES À BIOLOGIA DAS PTERIDINAS EM PARASITAS: BASE
PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE DROGAS TERAPÊUTICAS CONTRA
DOENÇA DO SONO

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek

PONTA GROSSA
2007

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

Martini, Viviane Paula
M386d Determinação e estudos de complexos enzima - ligantes
relevantes à biologia das pteridinas em parasitas: base para o
desenvolvimento racional de drogas terapêuticas contra doença
do sono / Viviane Paula Martini. Ponta Grossa, 2007.
151 f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Profº. Drº. Jorge Iulek

1. Doença do sono. 2. Drogas terapêuticas. 3. Pteridina
redutase. 4. *Trypanosoma brucei*. I. Iulek, Jorge. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Química Aplicada. III. IT.

CDD: 572.7

VIVIANE PAULA MARTINI

DETERMINAÇÃO E ESTUDOS DE ESTRUTURAS DE COMPLEXOS ENZIMA-
LIGANTES RELEVANTES À BIOLOGIA DAS PTERIDINAS EM PARASITAS: BASE
PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE DROGAS TERAPÊUTICAS CONTRA
DOENÇA DO SONO

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

Ponta Grossa 6 de março de 2007

Prof. Dr. Jorge Iulek – Orientador
Doutor em Ciências: Físico – Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof^a. Dr^a. Elaine Machado Benelli
Doutora em Ciências Bioquímica
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. André Vitor Chaves de Andrade
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades a mim oferecidas e por sentir sua presença constante no meu viver.

Ao meu orientador Jorge Iulek, muito mais que um orientador, também um amigo e companheiro, encorajando-me ante as dificuldades e incentivando-me a superá-las e a não desistir ante os insucessos. Sua disponibilidade irrestrita, apoio e orientação sempre me deram e me dão força para seguir em frente.

Ao Professor Doutor William Nigel Hunter, ser humano único, generoso e notável pesquisador, de um conhecimento extraordinário, amante de sua terra, cultivador de sua história e de suas tradições. Agradeço a oportunidade a mim oferecida de excepcional vivência e apreendizado, só tenho muito a agradecer pela participação no projeto e a possibilidade de conhecer um centro de pesquisa tal como o Biocentre da School of Life Sciences da Universidade de Dundee.

Ao pesquisador Lindsay Brian Tulloch em quem a palavra compartilhar é uma constante. Obrigada por toda a sua experiência, paciência, credibilidade, apoio e estímulo, por ter permitido minha participação num projeto amplo do qual é um dos pilares.

À Universidade de Dundee e ao Biocentre, a todas as pessoas que fazem parte daquele grande centro de pesquisa.

À Professora Doutora Christiane Philippini Ferreira Borges e ao nosso saudoso Professor Doutor José Caetano Zurita da Silva que muito me incentivaram a ir ao estágio na Universidade de Dundee, estendendo meu agradecimento a toda a Coordenação do Mestrado pelo consentimento para que o mesmo se tornasse possível.

Aos Professores Doutores André Maurício Brinatti e Mariza Marques Boscacci pelas críticas e sugestões no exame de qualificação no tocante à descrição do trabalho.

À Professora Doutora Mariza Marques Boscacci pela orientação inicial na ausência de meu orientador Professor Doutor Jorge Iulek.

À Chris pelas conversas, ajuda, amizade e por colocar o laboratório sempre em ordem.

Às colegas Dani e Célia pela amizade e pelos estudos com bolo e chimarrão. Em especial, Dani, pela ajuda na normalização do pré-projeto.

Aos Coordenadores e Professores que estiveram à frente do Curso de Pós- Graduação em Química Aplicada durante o período da minha titulação.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus pais por todo o carinho e atenção. Pai, agradeço por toda sua ajuda e suporte. Mãe, muito obrigada pelas suas orações e sua confiança.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

RESUMO

As enzimas dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) e pteridina redutase (PTR) estão envolvidas no metabolismo pterina/folato dependente; juntas, representam um importante alvo para a quimioterapia de leishmanias e tripanossomas parasitas. A Cristalografia por Raios X foi utilizada para elucidar acuradamente a estrutura da enzima PTR1 de *Trypanosoma brucei* complexada com inibidores que são análogos ao substrato.

Os ligantes ensaiados para cristalização foram o substrato folato e os inibidores melamina, 6-tioguanina, WSG1012, WSG1034, WSG3065, WSG3066 e WSG3067. Destes, quatro forneceram cristais com padrões de difração suficientes para um conjunto de dados completo. WSG3065 (mais tarde revelando ausência do ligante), WSG3066 e WSG3067 são três das estruturas apresentadas neste trabalho derivadas dos ensaios de cristalização citados; somadas a estas estão as estruturas refinadas dos complexos com triantereno e ciromazina, provenientes de dois outros conjuntos de dados anteriormente disponíveis. Os conjuntos de dados foram processados com os programas **Mosflm / Scala** e **Xds / Xscale**, as estruturas refinadas usando-se os programas **CNS** e **Refmac5** e validadas com os programas **Procheck**, **Whatcheck**, **Sfcheck** e **ValidationPDB**. Todas as estruturas refinadas apresentaram grupo espacial P2₁ com celas unitárias aproximadas $a = 79 \text{ \AA}$, $b = 90 \text{ \AA}$, $c = 82 \text{ \AA}$, $\beta = 115^\circ$, 4 monômeros de 268 resíduos cada por unidade assimétrica e sítios ativos complexos. Além dos ligantes inibidores presentes nas estruturas (exceto WSG3065), outros ligantes foram encontrados próximos ou fora do sítio ativo: ditiotreitol, glicerol, etilenoglicol, íons sódio e íons acetato. Análises das posições dos ligantes inibidores e correspondentes interações com a proteína foram realizadas a fim de se entender modos de inibição e, em particular, assistir ao planejamento ou à descoberta de novos compostos que sejam inibidores potentes, mas seletivos, para a enzima parasitária. Assim, estudos iniciais de atracagem (docking) foram realizados visando identificar novas moléculas ou arcabouços com capacidades inibitórias.

Palavras-chave: pteridina redutase, doença do sono, *Trypanosoma brucei*, inibidores do metabolismo do folato, desenho racional de inibidores.

ABSTRACT

The enzymes dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and pteridine reductase (PTR) are involved in the pterin/folate dependent metabolism; together they represent an important target for chemotherapy of parasitic leishmanias and trypanosomes. X-ray crystallography was used to elucidate accurately the structure of the PTR1 enzyme from *Trypanosoma brucei* in complex with inhibitors which are analogous to the substrate.

The ligands assayed for crystallization were the substrate folate and the inhibitors melamine, 6-thioguanine, WSG1012, WSG1034, WSG3065, WSG3066 and WSG3067. Of these, four yielded crystals with diffraction patterns sufficient for a complete dataset. WSG3065 (later revealing the lack of the ligand), WSG3066 and WSG3067 are three of the several structures presented in this work which came from the cited crystallization assays; added to these are the refined structures complexed with triamterene and cyromazine, proceeded from two other datasets already available. The datasets were processed with the programs **Mosflm** / **Scala** and **Xds** / **Xscale**, the structures were refined using the programs **CNS** and **Refmac5** and validated with the programs **Procheck**, **Whatcheck**, **Sfcheck** and **ValidationPDB**. All refined structures belong to the space group $P2_1$ with unit cells around $a = 79 \text{ \AA}$, $b = 90 \text{ \AA}$, $c = 82 \text{ \AA}$, $\beta = 115^\circ$, 4 monomers each of 268 residues per asymmetric unit and complex active sites. Besides the inhibiting ligands (except WSG3065) present in the structure, other ligands were found either near or outside the active site: dithiothreitol, glycerol, ethylene glycol, sodium and acetate ions. Analyses on the ligand positions and corresponding interactions with the protein were carried out to understand modes of inhibition and to guide the design or the discovery of new compounds which are potent, but selective to the parasitic enzyme, inhibitors. Thereby, initial docking studies were performed aiming at identifying new molecules or lead compounds with inhibitory capabilities.

Keywords: Pteridine reductase, sleeping sickness, *Trypanosoma brucei*, folate metabolism inhibitors, inhibitor rational design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 -	Principais causas de morte no mundo desenvolvido e no mundo em desenvolvimento.....	20
Figura 1.2 -	Vetor transmissor mosca tsé-tsé, <i>Glossina palpalis</i>	21
Figura 1.3 -	Distribuição e abrangência da tripanossomíase africana em humanos	23
Figura 1.4 -	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i>	25
Figura 1.5 -	Os tripanossomas e hemácias na corrente sanguínea	27
Figura 1.6 -	Estruturas de drogas utilizado no tratamento da doença do sono ou tripanossomíase africana	32
Figura 1.7 -	Estratégia para a busca de uma nova droga para tratamento de uma doença parasítica	34
Figura 1.8 -	Estrutura de Pteridinas	36
Figura 1.9 -	Estruturas de MTX, metotrexato, uma droga antifolato padrão e TOP, trimetoprima	37
Figura 1.10 -	Reações catalisadas pela DHFR-TS e pela PTR1 de <i>Leishmania major</i>	39
Figura 1.11 -	Reações catalisadas por <i>TcPTR1</i> , <i>TcPTR2</i> e DHFR-TS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
Figura 1.12 -	Diagrama de fases para cristalização macromolecular	44
Figura 1.13 -	Esquema de montagem para cristalização de proteínas por diálise	47
Figura 1.14 -	Método <i>Batch</i>	48
Figura 1.15 -	Tipos de cristalização por difusão de vapor	49
Figura 1.16 -	Cristalização por difusão de vapor	50
Figura 1.17 -	Aumento da imagem de um objeto pela microscopia de luz	54
Figura 1.18 -	Empacotamento de moléculas dentro do retículo cristalino	55
Figura 1.19 -	Representação esquemática de uma onda de raio X	56
Figura 1.20 -	Adição de ondas de mesmo comprimento de onda	58
Figura 1.21 -	Expressão das ondas como vetores para sua adição	59

Figura 1.22 -	Esquema expressando uma onda como número complexo	61
Figura 1.23 -	Reflexões de Bragg	63
Figura 1.24 -	Vários planos reticulares dentro do mesmo reticulo cristalino	65
Figura 1.25 -	Difração de raios X	67
Figura 1.26 -	A resolução determina a quantidade de detalhes em mapas de densidade eletrônica	70
Figura 1.27 -	Ensaio Virtual	81
Figura 2.1 -	pH - concentração final (em mol / L) do precipitante, nos vários poços (A1 a D6) das placas de cristalização, exceto a JI11	88
Figura 2.2 -	Esquema de preparação da placa de cristalização JI11 do ligante folato, pH e concentração final (em mol / L) do precipitante nos vários poços (A1 a D6)	89
Figura 2.3 -	Representação esquemática da montagem da gota suspensa na placa de cristalização	90
Figura 2.4 -	Representação da captura de um cristal em protetor criogênico por um <i>loop</i> (laço) e alocação deste na cabeça goniométrica	94
Figura 3.1 -	Alguns cristais de complexos de <i>TbPTR1</i> obtidos	106
Figura 3.2 -	Qualidade de ajuste da estrutura TTR na densidade eletrônica	111
Figura 3.3 -	Qualidade de ajuste da estrutura CYR na densidade eletrônica	112
Figura 3.4 -	Qualidade de ajuste da estrutura WSG3065 _{ausente} na densidade eletrônica	112
Figura 3.5 -	Qualidade de ajuste da estrutura WSG3066 na densidade eletrônica ...	113
Figura 3.6 -	Qualidade de ajuste da estrutura WSG3067 na densidade eletrônica ...	113
Figura 3.7 -	Representação do tetrâmero funcional de <i>TbPTR1</i>	115
Figura 3.8 -	Comparações entre a <i>TbPTR1</i> e a <i>LmPTR1</i>	116
Figura 3.9	Subunidade C da estrutura WSG3065, mostrando a posição do cofator	117
Figura 3.10 -	Sítios ativos com ligantes, monômero C representado em todos os casos	120
Figura 3.11 -	Sítio ativo do monômero C, estrutura WSG3065, na verdade este ausente e em sua posição esperada os ligantes glicerol e ditiotreitol ...	121

Figura 3.12 -	Sítio ativos do monômero C com os ligantes a) TTR, b) CYR, c) WSG 3066 e d) WSG 3067	122
Figura 3.13 -	Cadeia lateral do Glu217 do monômero A em diferentes conformações: MTX (cinza), TTR (azul), CYR (rosa), WSG3065 (verde), WSG3066 (amarelo), WSG3067 (laranja)	128
Figura 3.14 -	Representação do sítio ativo da <i>TbPTR1</i> com os ligantes TTR (azul), CYR (rosa), WSG3066 (amarelo), WSG3067 (laranja) superpostos ao MTX (cinza)	130
Figura 3.15 -	Cisteínas modificadas	133
Figura 3.16 -	Mapas de densidade eletrônica e Fourier diferença anteriores <i>omit maps</i> às modificações das Cys168	134
Figura 3.17 -	Posição das melhores estruturas ranqueadas	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Diferença entre as subespécies de <i>Trypanosoma brucei</i> quais causam a Tripanossomíase Africana	22
Tabela 2.1 -	Proporções relativas das soluções para preparação do <i>ligand mix</i>	85
Tabela 2.2 -	Representação esquemática das proporções entre várias soluções para chegar-se a concentrações e volumes desejados na gota de cristalização	86
Tabela 2.3 -	Placas de cristalização e os diversos ligantes empregados	87
Tabela 2.4 -	Fórmulas estruturais dos ligantes ensaiados para cristalização	91
Tabela 2.5 -	Cristais ensaiados e suas respectivas placas de cristalização	96
Tabela 2.6 -	Cristais que foram ensaiados no Síncroton de Daresbury	98
Tabela 2.7 -	Conjuntos de dados coletados no SRS	98
Tabela 2.8 -	Fórmulas estruturais dos ligantes refinados	100
Tabela 2.9 -	<i>Smiles</i> para construção no banco de dados do ZINC	104
Tabela 3.1 -	Resumo da coleta de dados dos cristais <i>TbPTR1</i> em presença de diferentes ligantes	107
Tabela 3.2 -	Resumo dos dados estatísticos de processamento das imagens	107
Tabela 3.3 -	Valores de R e R_{free} obtidos no refinamento de corpo rígido, após este refinamento do tipo <i>restrained</i> e finalmente refinamento <i>restrained</i> realizado após o <i>Simulated Annealing</i>	108
Tabela 3.4	Resumo dos dados estatísticos obtidos do refinamento das estruturas cristalinas	109
Tabela 3.5 -	Dados dos Gráficos de Ramachandran	110
Tabela 3.6 -	Contatos (interações) ($\leq 3,5$ Å) entre a proteína e os inibidores MTX, TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 com o monômero C da <i>TbPTR1</i> ..	125
Tabela 3.7 -	Contatos (interações) ($\leq 3,5$ Å) entre a coenzima (NADPH), os inibidores MTX, TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 e moléculas e água no monômero C da <i>TbPTR1</i>	127
Tabela 3.8 -	Ligantes inibidores e outros ligantes nos sítios ativos	131
Tabela 3.9 -	Ligantes encontrados fora do sítio ativo	131
Tabela 3.10 -	Situação das cisteínas 168 nas várias estruturas por monômeros	132
Tabela 3.11 -	Ligantes virtuais escalonados por escores	136
Tabela 3.12 -	As 20 melhores moléculas ranqueadas do <i>drug-like</i> parcial	138

LISTA DE SIGLAS

ACT	Íon acetato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATP	5' trifosfato de adenosina
CCP4	Collaborative Computational Project nº 4
Cys	Cisteína
CYR	Ciromazina
DFMO	Eflornitina (DL- α -difluorometilornitina)
DHB	Dihidrobiopterina
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato redutase
DHFR-TS	Dihidrofolato redutase-timidilato sintase bifuncional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dTMP	Monofosfato de desoxitimidina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DTO	Ditiotreitol oxidado
dUMP	Monofosfato de desoxiuridina
EDO	Etilenodiol
F _{obs}	Fator de estrutura observado
F _{calc}	Fator de estrutura calculado
GOL	Glicerol
HAT	Tripanossomíase Africana Humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hits	Identificação de ligantes
HTS	Bioensaios em larga escala <i>High-Throughput Screening</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50%
LmPTR1	Pteridina redutase 1 de <i>Leishmania major</i>
MAD	Dispersão anômala de múltiplos comprimentos de onda
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MIR	Substituição isomórfica múltipla
MR	Substituição molecular
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
MTX	Metotrexato
NA	Íon sódio
NaAc	Acetato de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCS	Simetria não cristalográfica <i>Non-crystallographic symmetry</i>
ODC	Ornitina decarboxilase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietileno glicol
PTR	Pteridina redutase
PTR1	Pteridina redutase 1
RMN	Ressonância magnética nuclear
rmsba	Desvio médio quadrático de ângulos de ligação
Rmsbl	Desvio médio quadrático de comprimentos de ligação
Rmscc	Desvio médio quadrático de restrições de centros quirais

RSCC	Valor do coeficiente de correlação do espaço real
RSR	Valor residual no espaço real
RNA	Ácido Ribonucléico
R	Índice residual
R _{free}	Índice residual livre
SBDD	Desenho de drogas ou <i>drug design</i>
SDR	Dehidrogenase redutase de cadeia curta
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SMILES	<i>Simplified molecular input line entry specification</i> Linha de entrada de especificação molecular simplificada
SNC	Sistema nervoso central
SRS	Synchrotron Radiation Source - Daresbury Laboratory
<i>T.b. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
<i>T.b. gambiense</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
TbPTR1	Pteridina redutase 1 de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcPTR1	Pteridina redutase 1 de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcPTR2	Pteridina redutase 2 de <i>Trypanosoma cruzi</i>
THB	Tetrahidrobiopterina
THF	Tetrahidrofolato
TIM	Triosefosfato isomerase
TLS	Translação-libração-parafuso <i>Translation-libration-screw</i>
TOP	Trimetoprima
tRNA	Ácido Ribonucléico transportador
TS	Timidilato sintase
TTR	Triantereno
VHTS	seleção virtual de alto rendimento <i>virtual high-throughput screening</i>
VSG	Glicoproteína variante de superfície
WSG3065	Codificação de síntese do laboratório dos Professores Colin Suckling, Judith Huggan e Colin Gibson (Departamento de Química, Universidade de Strathclyde, Glasgow, Escócia), ligante não incorporado à estrutura protéica.
WSG3066	Codificação de síntese do laboratório dos Professores Colin Suckling, Judith Huggan e Colin Gibson (Departamento de Química, Universidade de Strathclyde, Glasgow, Escócia),
WSG3067	Codificação de síntese do laboratório dos Professores Colin Suckling, Judith Huggan e Colin Gibson (Departamento de Química, Universidade de Strathclyde, Glasgow, Escócia),

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	<u>Doenças Infecciosas Parasíticas</u>	19
1.1.1	Tripanossomíase Africana Humana (HAT)	20
<i>1.1.1.1</i>	<i>Agente Causador e Subespécies</i>	<i>20</i>
<i>1.1.1.2</i>	<i>Regiões Afetadas</i>	<i>22</i>
<i>1.1.1.3</i>	<i>Sintomatologia</i>	<i>23</i>
<i>1.1.1.4</i>	<i>Ciclo de Vida e Transmissão do <u>Trypanosoma brucei</u></i>	<i>25</i>
1.2	<u>Tratamentos Correntes</u>	27
1.2.1	Drogas Disponíveis	28
<i>1.2.1.1</i>	<i>Suramin</i>	<i>28</i>
<i>1.2.1.2</i>	<i>Pentamidina</i>	<i>29</i>
<i>1.2.1.3</i>	<i>Melarsoprol</i>	<i>29</i>
<i>1.2.1.4</i>	<i>Eflornitina</i>	<i>31</i>
1.3	<u>A pesquisa de Novas Drogas</u>	33
1.3.1	O Processo de Desenvolvimento de Novas Drogas	33
1.4	<u>Pteridina Redutase como Alvo Quimioterápico</u>	35
1.4.1	Metabolismo da Pteridina/Folato em Tripanossomas; DHFR TS e PTR1	35
<i>1.4.1.1</i>	<i>Rotas Metabólicas Envolvendo a PTR1 Parasítica</i>	<i>38</i>
1.4.2	A estrutura da Pteridina Redutase	40
<i>1.4.2.1</i>	<i>O Sítio Ativo da Pteridina Redutase</i>	<i>41</i>
<i>1.4.2.1.1</i>	<i>Modelo Cristalográfico</i>	<i>41</i>
1.5	<u>Cristalização de Proteínas</u>	41
1.5.1	Formação de um Cristal de Sal	42

1.5.2	Formação de um Cristal de Proteína.....	43
1.5.2.1	<i>Alguns Métodos para produção de Cristais de Proteína</i>	46
1.5.2.1.1	Diálise	46
1.5.2.1.2	Batch Cristalização	47
1.5.2.1.3	Difusão de Vapor	48
1.5.3	Obtenção de Cristais de Complexos Protéicos	50
1.5.3.1	<i>Co-cristalização</i>	51
1.5.3.2	<i>Soaking.....</i>	51
1.5.3.2.1	Crioproteção e montagem no <i>loop</i>	52
1.6	<u>Difração de Raios X, Coleta e Processamento de Dados</u>	53
1.6.1	Observação de Pequenos Objetos	53
1.6.2	Difração de Raios X	56
1.6.2.1	<i>As Características da Onda de Raio X</i>	56
1.6.2.1.1	Expressando a Onda como Vetores	57
1.6.2.1.2	Expressando a Onda como Números Complexos	60
1.6.2.2	<i>Lei de Bragg</i>	61
1.6.2.3	<i>Retículos Planos e Índices de Miller</i>	64
1.6.2.4	<i>O Padrão de Difração e a Cella Unitária</i>	66
1.6.2.5	<i>Intensidade dos Pontos no Padrão de Difração</i>	68
1.6.2.6	<i>Fatores de Estrutura e Transformada de Fourier</i>	69
1.6.3	Coleta dos Dados de Difração	70
1.6.3.1	<i>Processamento dos Dados de Difração</i>	70
1.6.3.1.1	Resolução	70
1.6.3.1.2	Completeza	71

1.6.3.1.3	Redundância	71
1.6.3.1.4	R_{merge} ou R_{sym}	72
1.6.3.1.5	Relação sinal / ruído, $I/\sigma(I)$	72
1.6.3.1.6	Wilson Plot	73
1.7	<u>Resolvendo o Problema das Fases</u>	73
1.7.1	O Problema das Fases	73
1.7.1.1	<i>Substituição Molecular (MR)</i>	74
1.8	<u>Refinamento de estruturas protéicas</u>	75
1.8.1	Os indicadores R e R_{free}	76
1.9	<u>Validação do Modelo</u>	76
1.9.1	Validação Geométrica	77
1.9.2	Validação na Densidade eletrônica	78
1.10	<u>Busca de Novos Ligantes Inibidores</u>	79
1.10.1	Desenho de Drogas Baseado em Estrutura (SBDD)	79
1.10.1.1	<i>Método Baseado em Ensaio Virtual</i>	79
1.10.1.1.1	<i>Docking Tridimensional Molecular</i>	79
1.10.1.1.1.1	Flexibilidade do Ligante	81
1.10.1.1.1.2	Flexibilidade da Proteína	82
1.11	<u>Objetivos do trabalho</u>	83
2	MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1	<u>Expressão e Purificação da TbPTR1</u>	84
2.2	<u>Preparação e Cristalização de Complexos com a TbPTR1</u>	84
2.2.1	Preparação dos Complexos Proteína-Ligante	84
2.2.1.1	<i>Experimentos de Cristalização</i>	85

2.2.1.1.1	Preparação da Solução Proteína-Ligante.....	85
2.2.1.1.2	Placas de Cristalização.....	87
2.2.2	Cristalização por Difusão de Vapor em Gota Suspensa.....	89
2.2.2.1	<i>Avaliação das Placas.....</i>	92
2.2.2.2	<i>Otimização das Condições de Cristalização para Alguns Ligantes.....</i>	92
2.3	<u>Coleta e Processamento dos Cristais de para TbPTR1</u>	93
2.3.1	Crioprotetor apropriado	93
2.3.2	Montagem do Cristal de Proteína no loop	94
2.3.3	Coleta de Dados de Difração de Raios X	95
2.3.3.1	<i>Ensaio de Difração dos Cristais.....</i>	95
2.3.3.2	<i>Coleta Completa dos Dados de Difração</i>	96
2.3.3.3	<i>Análise dos Dados de Difração de Raio X</i>	99
2.4	<u>Substituição Molecular para Estruturas dos Complexos de TbPTR1</u>	99
2.5	<u>Refinamento das Estruturas de TbPTR1</u>	100
2.5.1	Programas Computacionais Utilizados para Modelagem e Refinamento	101
2.5.1.1	<i>Adição de ligantes ao modelo</i>	102
2.5.1.2	<i>Adição de moléculas de água ao modelo</i>	102
2.6	<u>Validação das Estruturas dos complexos de T.brucei</u>	103
2.6.1	Programas Utilizados para Validação	103
2.7	<u>Busca Computacional de Novos Inibidores da TbPTR1</u>	103
2.7.1	Busca com uso dos Smiles	104
2.7.2	Busca com uso do subconjunto Drug-Like.....	105
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	105
3.1	<u>Cristalização dos Complexos</u>	105

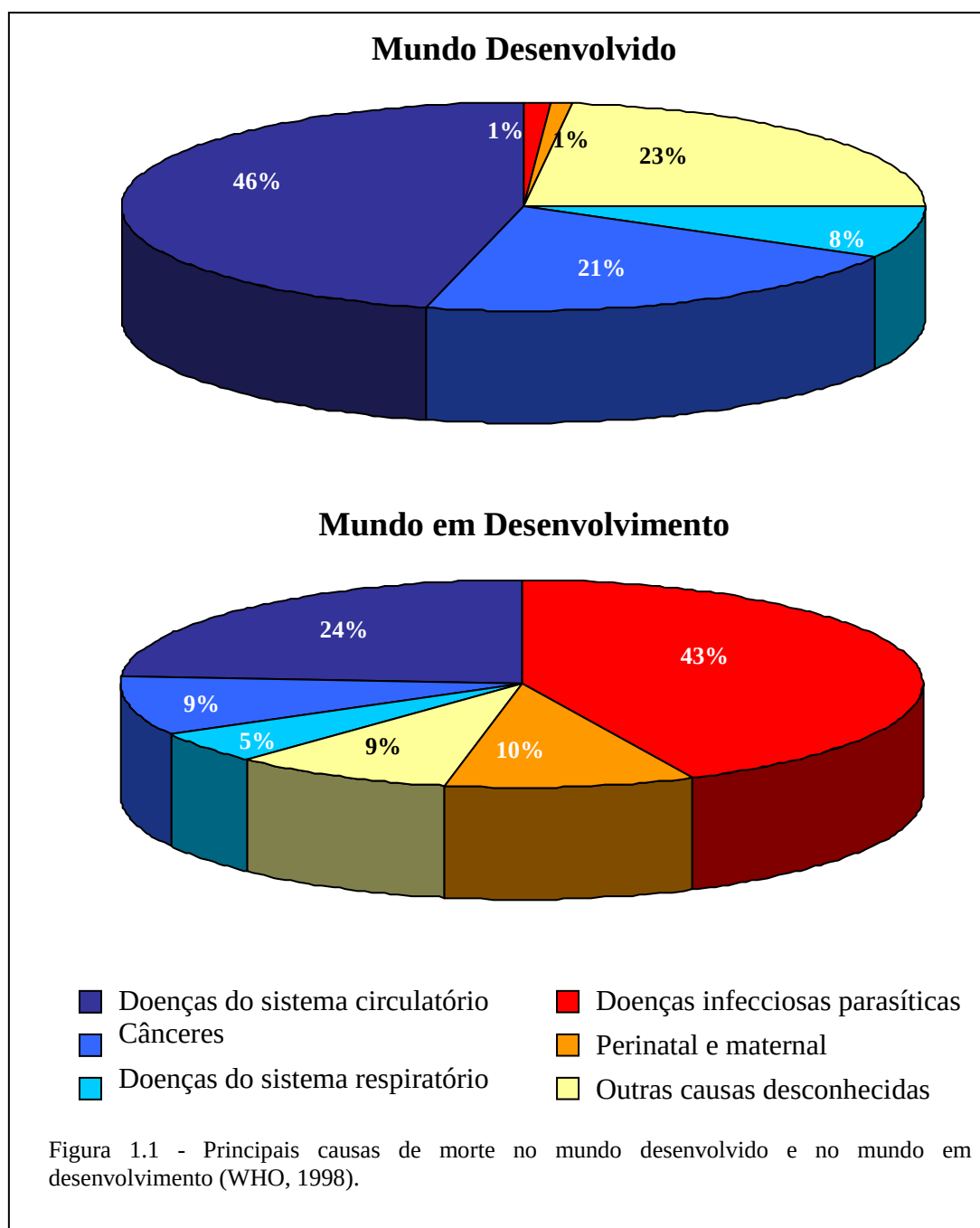
3.2	<u>Determinação de Estrutura por Difração de Raios X</u>	105
3.2.1	Coleta de dados de Difração e Processamento	105
3.2.1.1	<i>Cristais Coletados</i>	105
3.2.1.2	<i>Resultados do Processamento das Imagens</i>	107
3.3	<u>Substituição Molecular e Refinamento</u>	108
3.3.1	Substituição Molecular	108
3.3.2	Refinamento das Estruturas Cristalinas	109
3.3.2.1	<i>Resultados Estatísticos de Refinamento</i>	109
3.4	<u>Validação dos Modelo Refinados Cristalograficamente</u>	110
3.4.1	Gráfico de Ramachandran	110
3.4.2	Desvio Médio Quadrático de Comprimentos de Ligação (rmsbl), Ângulos de Ligação (rmsba) e Restrições de Centros Quirais (rmscc)....	110
3.4.3	Ajuste na Densidade Eletrônica	111
3.5	<u>Análises Estruturais</u>	114
3.5.1	Estrutura global	114
3.5.1.1	<i>Sítio Ativo.....</i>	117
3.5.2	Ligantes nas Estruturas Cristalinas	119
3.5.2.1	<i>Tratamento dos loops</i>	123
3.5.2.2	<i>Interações dos inibidores com a enzima e o cofator ligantes.....</i>	124
3.5.2.3	<i>Diferenças estruturais entre a proteína ligada ao MTX e aos demais ligantes.....</i>	128
3.5.2.4	<i>Conformações dos principais resíduos das estruturas com os inibidores.....</i>	129
3.5.2.5	<i>Estruturas superpostas</i>	129
3.5.2.6	<i>Outros Ligantes Presentes nos Sítios Ativos.....</i>	131
3.5.2.7	<i>Outros Ligantes, Fora do Sítio Ativo.....</i>	131
3.5.3	Cisteínas Modificadas	132

3.6	<u>Busca virtual de novos ligantes</u>	135
3.6.1	Resultado da Busca pelos <i>Smiles</i>	135
3.6.2	Resultado da Busca no subconjunto <i>Drug-Like</i>	137
4	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	140
5	REFERÊNCIAS	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Infecciosas Parasíticas

Observa-se atualmente no mundo desenvolvido um declínio constante do número de mortes causadas por doenças infecciosas parasíticas, de 5% (porcentagem em relação ao número de mortes total) em 1985 (0,55 milhões de pessoas) para 1% em 1997 (0,12 milhões de pessoas) (Figura 1.1) (WHO, 1998). Isto ocorreu devido aos avanços médicos no cuidado da saúde e a uma maior habilidade em se tratar destas doenças. As doenças do sistema circulatório (principalmente doenças do coração) e os cânceres permanecem sendo as maiores causas de morte do mundo desenvolvido e, em 1997, foram responsáveis por 46 % e 21 % do número total das mortes, respectivamente. Tais números são atribuídos frequentemente ao estilo de vida inadequado do mundo ocidental, mas, na verdade, também estão relacionados com a idade avançada (senil) da população (WHO, 1998). Em contraste, no mundo em desenvolvimento as maiores causas de morte são as doenças infecciosas parasíticas, que em 1997 foram responsáveis por 43 % do número total das mortes (17,2 milhões de pessoas) (Figura 1.1) (WHO, 1998). Tais doenças são frequentemente encontradas em regiões de clima tropical e estão associadas à pobreza. As doenças infecciosas parasíticas HIV/AIDS e a malária matam 2,3 milhões e 1,5-2,7 milhões de pessoas, respectivamente, a cada ano (WHO, 1998), no mundo todo. Algumas dessas doenças menos comuns, mas igualmente mortais, tais como Tripanosomíases e leishmaníases (africana e americana) foram negligenciadas para pesquisas de novas drogas. Este estudo diz respeito à infecção tripanossomíase africana (HAT).



1.1.1 Tripanossomíase Africana Humana (HAT)

1.1.1.1 Agente Causador e Subespécies

Trypanosoma é um gênero de protozoários tripanossomatídeos da ordem Kinetoplastida. Várias espécies tem um ciclo de vida complexo envolvendo insetos e o

parasitismo de animais. Em particular, o *Trypanosoma brucei* (causador da doença do sono) é transmitido pela picada das moscas tsé-tsé (*Glossina spp*) macho e fêmea (Figura 1.2) contendo o parasita. A transferência dos protozoários pode ocorrer ao ser humano, ao gado ou a certos mamíferos selvagens, que atuam como hospedeiros dos parasitas. A mosca tsé-tsé pode adquirir os parasitas alimentando-se do sangue infectado destes animais ou de humanos. Dentro do hospedeiro humano, os tripanossomas multiplicam-se e invadem a maioria dos tecidos. Há 3 subespécies: *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* e *T. b. brucei*.



Figura 1.2 - Vetor transmissor mosca tsé-tsé, *Glossina palpalis*. Fonte: De CICCO, L.H.S. Mosca tsé-tsé. Disponível em: <www.saudeanimal.com.br/mosca_tse.htm>. Acesso em: 10 set.2006.

Os *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* estão disseminados em diferentes regiões geográficas da África porque são transmitidos por diferentes espécies da mosca tsé-tsé (Tabela 1.1). O *T. b. gambiense* é transmitido por *Glossina palpalis* que tem como habitat florestas úmidas, rios e lagoas, geralmente áreas altamente povoadas, sendo então o reservatório hospedeiro não-humano freqüentemente animais domésticos. A alta densidade populacional dentro das áreas afetadas junto com o contato direto com os animais hospedeiros permite a rápida propagação da doença e, como resultado, a doença do sono é endêmica ou epidêmica em muitas destas regiões (Figura 1.3). Uma pessoa infectada com *T. b. gambiense* pode não saber que tem a doença porque a progressão da fase aguda até fase crônica é lenta, o

que leva a um aumento do depósito de parasitas e à posterior infecção de outras pessoas (WHO, 2000b).

Tabela 1.1 - Diferenças entre as subespécies de *Trypanosoma brucei* que causam a Tripanossomíase Africana

Características	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
Vetor (mosca tsé-tsé)	<i>Glossina palpalis</i>	<i>Glossina morsitans</i>
Habitat	Florestas úmidas, rios, lagos.	Savanas silvestres
Ciclo de transmissão preponderante	Humano → mosca → humano	Animal → mosca → humano
Hospedeiro não humano	Animais domésticos	Animais selvagens
Progressão da doença	Vagarosa	Rápida
Indivíduo portador	Comum	Raro

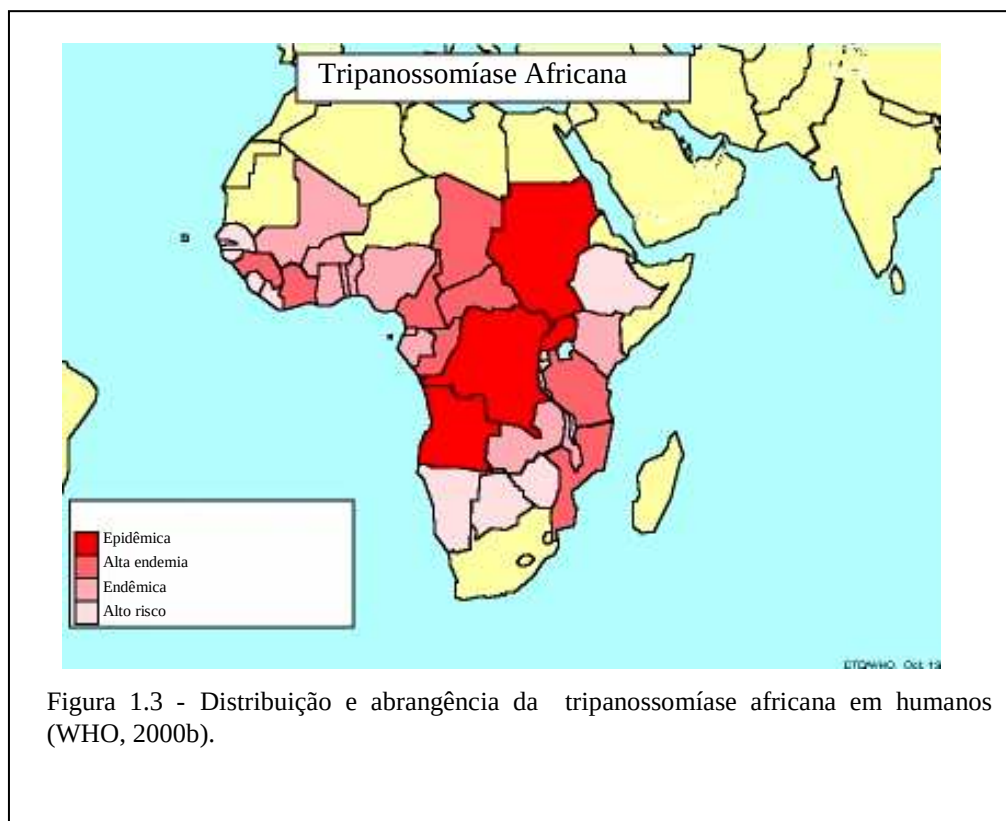
Fonte: WISER MF. **Kinetoplastid Biology and Human Disease**. Disponível em: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>. 2004. Acesso em: 15 dez. 2005.

O *T. b. rhodesiense* é transmitido pela mosca tsé-tsé *Glossina morsitans* que tem como habitat regiões secas da África como savanas e florestas, as quais são menos povoadas, sendo então reservatório hospedeiro não-humano animais silvestres (WISER, 2004). Por ser regiões de pequena habitação humana, a doença raramente é transmitida de humano a humano, sendo estes contaminados normalmente quando adentram as savanas. Predominando no oriente e sul da África, é principalmente associada a madeireiros, caçadores, pescadores e agricultores. A doença progride rapidamente à fase crônica e se alguma pessoa foi infectada com *T. b. rhodesiense* geralmente morre dentro de semanas ou meses se não receber tratamento (WHO, 2000b).

1.1.1.2 Regiões Afetadas

A tripanossomíase africana ou doença do sono foi quase erradicada durante os anos 60, mas agora é uma das principais causas de morte e doença em 36 países da África subsaariana, dos quais 22 estão entre os mais pobres e menos desenvolvidos do mundo. (VERLINDE et al., 2001; KENNEDY, 2004) (Figura 1.3). A área infestada pela mosca tsé-tsé recobre dois terços da África de tal forma que mais de 60 milhões de pessoas tem o risco de

desenvolver a Doença do Sono. Uma estimativa é que de 0,3 a 0,5 milhões de novos casos de HAT ocorrem anualmente, os quais são fatais se não forem tratados (KENNEDY, 2004). Botsuana, Etiópia, Libéria, Namíbia, Nigéria, Ruanda, Senegal e Serra-Leoa não têm programas de erradicação da HAT e a epidemiologia é desconhecida nestes países. Portanto, o número de casos de HAT pode ser subestimado; 40 mil casos foram relatados em 1999, mas somente 3-4 milhões do total de 60 milhões de pessoas que vivem nestas regiões de risco têm acesso ao diagnóstico e/ou ao tratamento, o número real de casos pode ser estimado como acima de 0,6-0,8 milhões (WHO, 1998; WHO, 2000b). A doença é epidêmica em Angola, República Democrática do Congo, Sudão e Uganda Ocidental, afetando 20-70% das populações, matando mais do que HIV/AIDS nessas regiões (WHO, 2000b).



1.1.1.3 Sintomatologia

No estágio inicial de infecção, os tripanossomos se multiplicam dentro dos vasos sanguíneos (WHO, 2000b). Os da subspécie *gambiense* reproduzem-se lentamente e o número

relativamente baixo de parasitas dentro da corrente sangüínea da pessoa torna a doença inicialmente assintomática, porém infecciosa, podendo estender-se por meses ou até anos e quando os sintomas emergem a doença já se encontra em fase avançada. Os da subespécie *T. b. rhodesiense* replicam-se rapidamente e portanto os sintomas são perceptíveis desde o início.

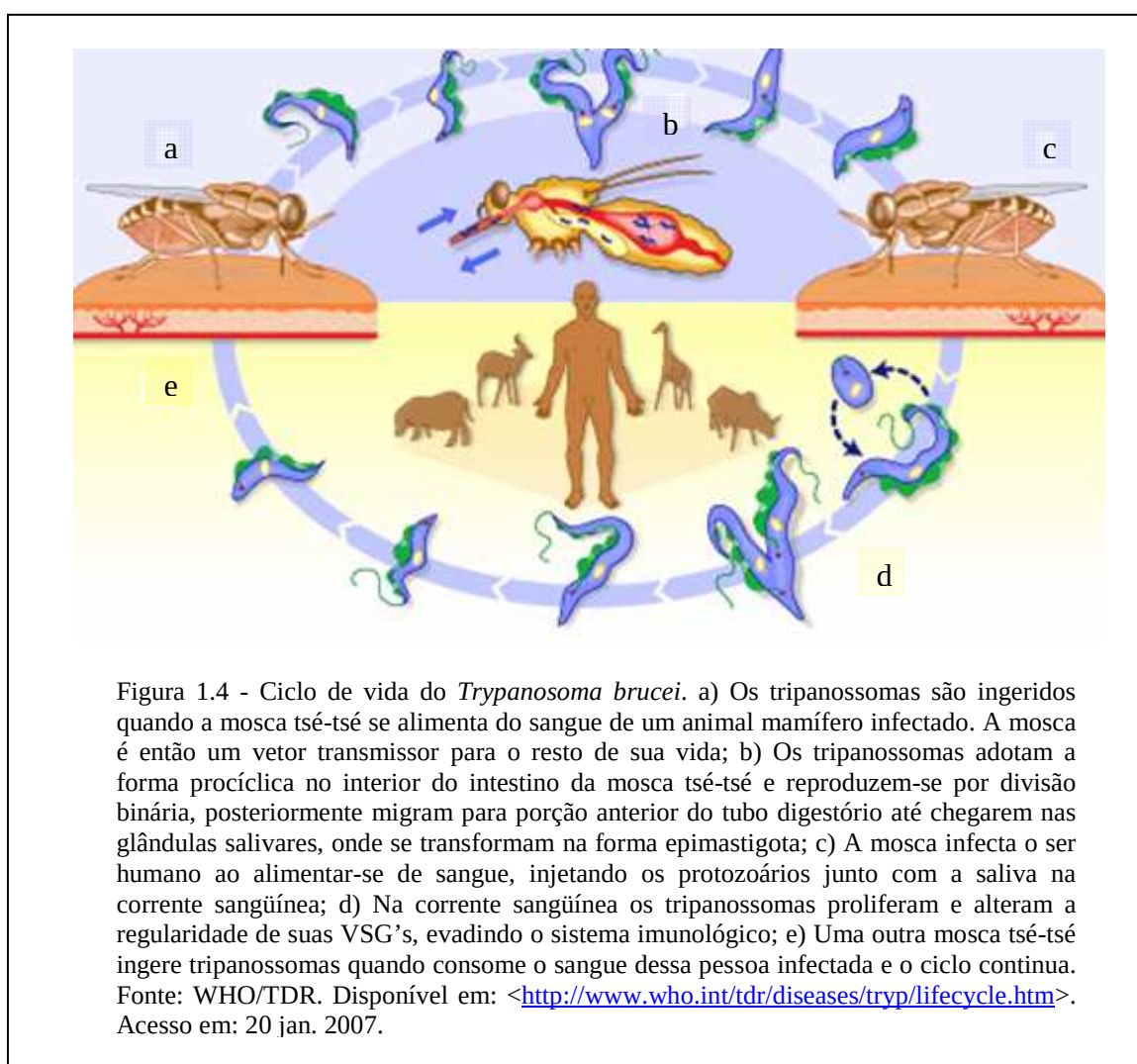
Os sintomas em fase adiantada incluem febre, inchaço de glândulas e baço, dor de cabeça, anemia, dores comuns e são mais severos e agudos em infecções por *T. b. rhodesiense*, podendo levar à morte dentro de alguns dias ou semanas. As infecções, em fase inicial, podem ser controladas através da resposta imune da pessoa (WHO, 2000b). A fase mais avançada da infecção (algumas vezes chamadas de fase neurológica) geralmente ocorre entre 6 e 12 meses ou mesmo anos em infecções por *T. b. gambiense* e dentro de semanas em infecções por *T. b. rhodesiense*. Essa fase começa com o cruzamento da barreira sangue-cérebro e a invasão do parasita no sistema nervoso central (SNC). Os danos nervosos e cerebrais são indicados pelos sintomas de confusão mental, fala ininteligível, distúrbios sensoriais e dificuldade de coordenação. Um sintoma característico, pelo qual a doença recebe a designação de doença do sono, é o distúrbio no ciclo do sono, com extrema fadiga ao dia e agitação durante à noite. A doença avança progressivamente ao ponto de coma e morte.

O sistema imune da pessoa raramente consegue superar a infecção em estágio avançado; se não tratada com drogas a morte é inevitável. Muitas pessoas procuram o médico somente quando a doença se encontra em fase avançada.

Os parasitas podem ser eliminados com o tratamento por drogas, porém, os danos neurológicos ocorridos são irreversíveis (WHO, 2000b).

1.1.1.4 *Ciclo de Vida e Transmissão do Trypanosoma brucei*

Quando uma mosca tsé-tsé se alimenta do sangue de um animal infectado, ela ingere os parasitas *T. brucei* e estes migram para o seu intestino (Figura 1.4). Ali, adotam a forma procíclica, perdendo de seu revestimento a glicoproteína variante de superfície (VSG) e a substituindo por um revestimento procíclico, aumentando sua capacidade infecciosa (ACOSTA-SERRANO et al., 2001).



As concentrações de glucose no interior do intestino da mosca tsé-tsé são menores que no sangue do hospedeiro mamífero e a crista mitocondrial parasítica reforma-se permitindo os

tripanossomas passarem a respirar aerobicamente. Dentro do intestino da mosca tsé-tsé, os tripomastigotas procíclicos experimentam vários ciclos de replicação por divisão binária.

Os parasitas na forma tripomastigota procíclica então movem-se através do sistema digestório e migram até as glândulas salivares da mosca tsé-tsé (VAN DEN ABEELE et al., 1999), onde transformam-se em uma forma de menor mobilidade, a epimastigota, usando seu flagelo para prender-se às células epiteliais e submetendo-se a mais ciclos de reprodução assexuada.

Enquanto os tripanossomas amadurecem na forma metacíclica, sua mitocôndria perde suas cristas em preparação à infecção mamária. A alta concentração de glucose dentro do sangue mamífero permite que os tripanossomas confiem unicamente nesta fonte, não sendo mais necessária a mitocôndria para o metabolismo de energia. A recombinação aleatória e a expressão das proteínas de revestimento (VSG) são estimuladas no início da fase metacíclica (GRAHAM; WYMER; BARRY, 1998), formando uma população diversa de tripanossomas, o que maximiza as chances de uma colonização bem sucedida à infecção mamária (BARRY et al., 1998). Os tripanossomas metacíclicos maduros então se desprendem das paredes epiteliais e esperam dentro do lúmen da glândula salivar da mosca para serem transferido a um hospedeiro mamífero.

Quando uma mosca tsé-tsé infectada alimenta-se do sangue de uma pessoa não infectada, os tripanossomas metacíclicos são transferidos da saliva da mosca tsé-tsé diretamente para a corrente sangüínea (Figura 1.4c-1.5). Há, então, replicação dentro do plasma através da divisão binária longitudinal e evasão do sistema imune pela alteração da regularidade das VSG's através da diferenciação e expressão genética. Na replicação dos tripanossomas, uma parte transforma-se em reservatório para futuras infecções e o ciclo continua.

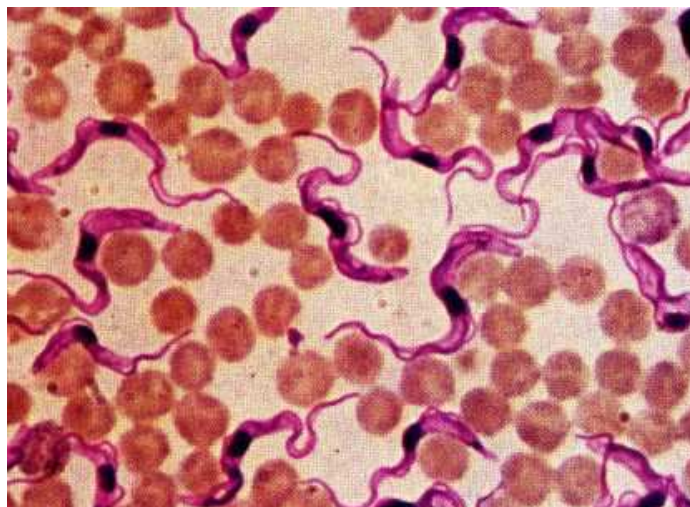


Figura 1.5 - Os tripanossomas e hemácias na corrente sangüínea. Fonte: UNIVERSIDADE COMPLUTENSE DE MADRID. Disponível em: <<http://www.ucm.es/info/parasito/Trypanosoma.jpg>>. Acesso em: 10 set.2006.

1.2 Tratamentos Correntes

O tratamento é sempre difícil, especialmente quando a doença alcança um estágio avançado com o envolvimento do sistema nervoso central, porque as poucas drogas disponíveis apresentam limitações. Pentamidina é uma droga não eficaz no estágio avançado da doença e há algumas formas resistentes do parasita a ela. Suramin deve ser administrado intravenosamente e pode ter efeitos colaterais adversos. Melarsoprol, uma droga arsênica desenvolvida há 50 anos, é usada contra a doença em estágio avançado, mas induz frequentemente à morte e a sérios efeitos colaterais (WHO, 2000). Eflornitina é uma droga muito cara, conseqüentemente inadequada para os países pobres (KEISER; STICH; BURRI, 2001; KIRCHOFF et al., 2000) e a maneira como deve ser administrada intravenosamente a cada seis horas por injeção lenta durante um período de 45 minutos, significa que somente pode ser usada em hospitais.

Há uma necessidade urgente de novos tratamentos mais eficientes, já que as drogas correntes induzem efeitos colaterais sérios e indesejáveis. Ademais, formas resistentes dos parasitas a estas drogas estão sendo cada vez mais prevalentemente encontradas (WEBSTER, 1990).

1.2.1 Drogas Disponíveis

1.2.1.1 Suramin

Suramin (fornecido pela Bayer S.A. e Bayer HealthCare AG) é um sulfonado de naftilamina que tem sido usado para o tratamento da doença do sono desde 1920 e é somente efetivo contra a infecção em estágio inicial (Figura 1.6a) (OLLIVIER e LEGROS, 2001; PEPIN e MILORD, 1994). A dosagem tipicamente é de 1 a 2 g, por 3 a 6 meses, sendo administrado por injeção intravenosa. Um efeito colateral comum é urina turva (por excreção inofensiva de proteína) e náusea geral; efeitos colaterais menos comuns incluem a formação de úlceras e feridas na boca (Bayer, informação do produtor). Efeitos colaterais mais sérios que podem ocorrer são convulsões, diminuição da pressão sanguínea, inchaço do abdômen, choque anafilático e perda de consciência, porém, são raros.

O modo de ação da suramin ainda é um tanto obscuro. Sua ação como droga tripanocida foi relatada como devida à ligação aos monômeros de triose fosfato isomerase (TIM), desse modo impedindo a formação do dímero e a ativação de enzima, (GAO et al., 1998). A TIM é uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de dihidroxicetona fosfato para glicerol 3-fosfato e a inibição da glicólise pode ser suficiente para matar os parasitas. Suramin é também muito conhecido pela inibição de outras enzimas, incluindo algumas que se ligam às fitas de DNA e RNA. Presume-se que esta é facilitada através de interações eletrostáticas entre enzimas e os seis grupos sulfonados da suramin (Figura 1.6a) (DENISE E

BARRETT, 2001) e, como tal, seu real modo de ação pode envolver a inibição das funções relacionadas aos ácidos nucléicos.

1.2.1.2 *Pentamidina*

Isotionato de pentamidina (fornecido por May e Baker) é um aromático diamidina que tem sido usado para o tratamento da fase inicial da doença do sono desde 1940 (Figura 1.6b) (PEPIN e MILORD, 1994). A droga é administrada por uma injeção intramuscular na dose de 4 mg / kg massa corporal a cada dois dias, no máximo durante 19 dias (isto é, dez aplicações) (BNF, 2004). O tratamento com isotionato de pentamidina pode causar sérios efeitos colaterais como pancreatite, arritmia, leucopenia, insuficiência renal ou até mesmo a morte.

A droga é um inibidor reversível da S-adenosil-L-metionina decarboxilase e pode matar os parasitas inibindo a síntese de poliamina (PEPIN e MILORD, 1994). Também acredita-se que se liga a ácidos nucléicos do parasita, inibindo funções como a replicação do DNA, a expressão de genes e a tradução do RNA. Os efeitos colaterais severos freqüentemente observados são devidos à natureza não-específica do isotionato de pentamidina, que podem causar danos severos aos tecidos humanos bem como também aos tripanossomas.

1.2.1.3 *Melarsoprol*

Melarsoprol (fornecido por Rhône Poulenc Rhorer Doma) é um composto organo-arsênico que tem sido usado para o tratamento na fase inicial e principalmente na fase avançada da doença do sono desde 1949 (Figura 1.6c) (KEISER; STICH; BURRI, 2001;

OLLIVIER e LEGROS, 2001). A dosagem é de 0,7 a 1,2 mg / kg de massa corporal três vezes ao dia, durante três dias, a qual é repetida sete dias depois e mais um vez 10 a 21 dias depois (KIRCHOFF et al., 2000). Como o melarsoprol contém arsênico, é altamente tóxico e induz efeitos colaterais severos.

Encefalopatia é uma reação comum, sendo mais habitual em pacientes que apresentam os tripanossomas em estágio avançado (KIRCHOFF et al., 2000; OLLIVIER e LEGROS, 2001). Os efeitos adversos indicam afetação do SNC e incluem febre, tremor, dificuldade na fala, ataques apopléticos, perda de consciência, coma e morte. A morte é muito comum em pacientes. A falha terapêutica está ocorrendo mais freqüentemente devido aos tripanossomas estarem tornando-se mais resistentes ao melarsoprol; entre 1998 e 2000, 30,4 % das pessoas em Uganda apresentavam-se indiferentes ao tratamento (OLLIVIER e LEGROS, 2001).

Acredita-se que o Melarsoprol entra nos tripanossomas através do transportador P2 amina-purina (DENISE e BARRET, 2001), mas a natureza tripanocida exata do melarsoprol não é compreendida inteiramente e diversos mecanismos foram propostos. Os tripanossomos submetidos ao melarsoprol sofrem uma perda de ATP antes da lise da célula e sugere-se que diversas enzimas glicolíticas sejam inibidas pelo melarsoprol, fazendo a interrupção glicolítica um mecanismo de ação proposto (KIRCHOFF et al., 2000). Entretanto, as fontes de ATP não são extensivamente esgotadas antes da lise da célula, assim é improvável a glicólise ser o alvo do melarsoprol (VAN SCHAFTINGTON; OPPERDOES; HERS, 1987). O melarsoprol foi também relatado como inibidor da tripanotiona redutase formando um complexo com tripanotiona, um metabólito envolvido na detoxificação dos peróxidos (KIRCHOFF et al., 2000; PEPIN e MILORD, 1994).

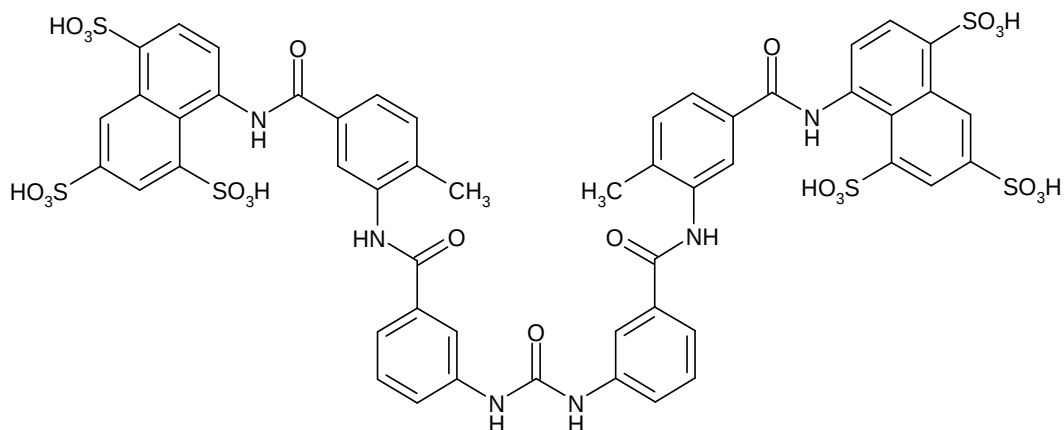
1.2.1.4 Eflornitina (DMFO)

Eflornitina (DL- α -difluorometilornitina, DFMO) (Figura 1.6d) (fornecido por Marrión-Merrell-Dow) é a única droga que foi introduzida no mercado nos últimos 50 anos (OLLIVIER e LEGROS, 2001). É eficaz para a fase avançada das infecções por *T. b. gambiense*, mas ineficaz contra *T. b. rhodesiense*.

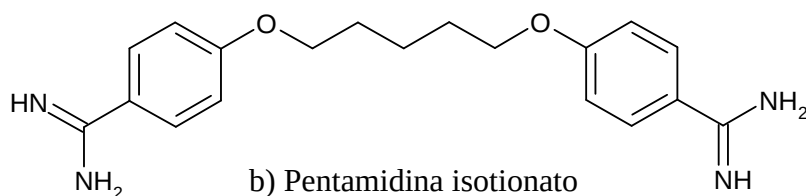
É apelidada “a droga de ressurreição” devido a sua habilidade para despertar pacientes letárgico (KEISER; STICH; BURRI, 2001). A dosagem é 100 mg / kg de massa corporal e é administrada intravenosamente a cada seis horas por injeção lenta durante um período de 45 minutos (KIRCHOFF et al., 2000). A administração lenta é requerida a fim de evitar danos nas plaquetas e células brancas do sangue. Efeitos colaterais severos são raros e à exceção daqueles que afetam as células brancas do sangue e as plaquetas o paciente pode experimentar ataques apopléticos e perda de consciência.

DFMO é um inibidor irreversível da ornitina decarboxilase (ODC), que é envolvida na síntese da poliamina (KIRCHOFF et al., 2000). A inibição de ODC é insuficiente para matar os parasitas, mas pode impedir sua divisão celular. Como a droga somente impede a replicação do tripanossomatídeos, não é uma droga tripanocida e acredita-se que o sistema imune do paciente mata os tripanossomas incapazes.

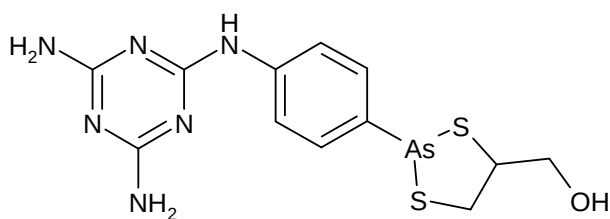
O uso de DFMO para o tratamento das infecções por *T. b. gambiense* em fase avançada não se tornou difundido, em parte porque a droga é muito cara, conseqüentemente tornando-se inadequado para os países pobres (KEISER; STICH; BURRI, 2001; KIRCHOFF et al., 2000). A maneira como a DFMO deve ser administrada significa que pode somente ser usada nos hospitais.



a) Suramin



b) Pentamidina isotionato



c) Melarsoprol

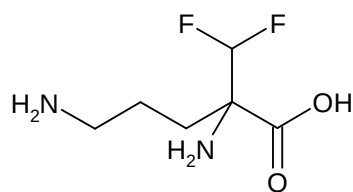
d) DL- α -difluorometilornitina (DFMO)

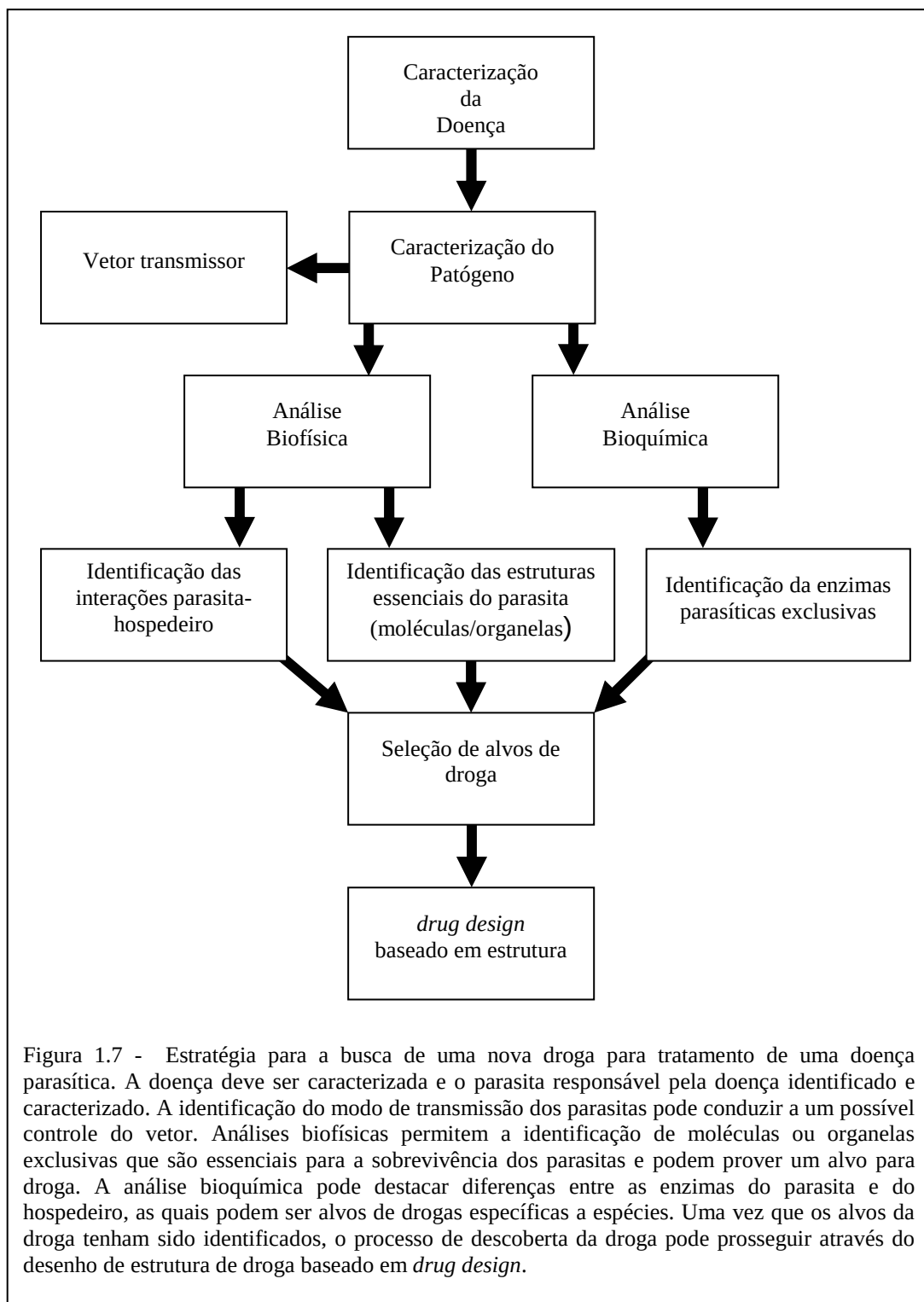
Figura 1.6 - Estruturas de drogas utilizado no tratamento da doença do sono ou tripanossomíase africana. a) Suramin pode inibir a função do ácido nucléico, b) Pentamidina inibe a S-adenosil-L-metionina decarboxilase, c) Melarsoprol pode inibir tripanotiona redutase e d) difluorometilornitina inibe ornitina decarboxilase.

1.3 A Pesquisa de Novas Drogas

1.3.1 O Processo de Desenvolvimento de Novas Drogas

No passado, a descoberta bem sucedida de drogas era mais por serendipidade do que por busca racional, e o mecanismo de ação da droga raramente era conhecido (RATTI e TRIST, 2001). Avanços tecnológicos recentes aumentaram o conhecimento no que concerne a organismos biológicos, não só ao nível molecular, mas também ao nível atômico. Isto permitiu uma nova abordagem, o projeto racional de drogas *drug design* (Figura 1.7).

Seguindo a caracterização de uma doença, é possível identificar os patógenos que a causam e iniciar o entendimento de como eles o fazem. Caracterizando os patógenos biofísica e bioquimicamente, pode se identificar moléculas que são exclusivas de um ou outro dos patógenos, ou são convenientemente diferentes daquelas do organismo do hospedeiro (Figura 1.7). Os alvos de droga selecionados podem então ser usados para um projeto de desenho de droga *drug design* baseado na estrutura; por meio de uma seleção virtual (LYNE, 2002; WALTERS; STAHL; MURCKO, 1998) ou por química combinatória (KUBINYI, 1998), moléculas que agem sobre o alvo de uma maneira desejável podem ser identificadas.

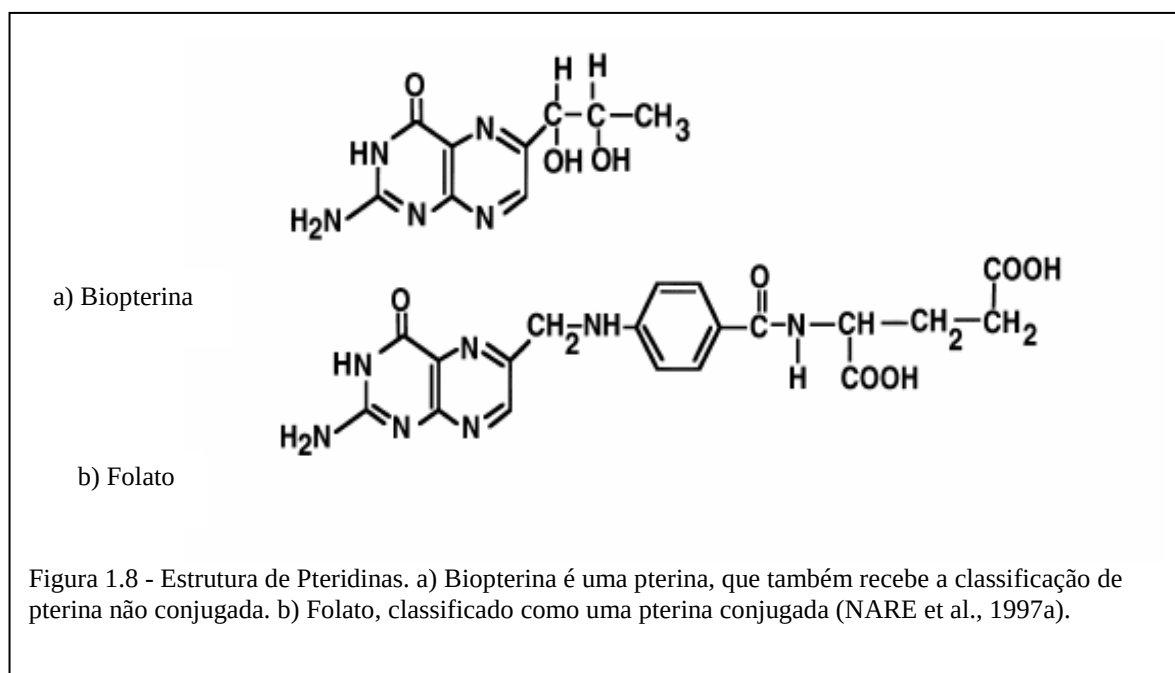


1.4 Pteridina Redutase como Alvo Quimioterápico

Um alvo ideal deve ser uma enzima essencial para a sobrevivência do parasita, ausente no hospedeiro humano ou apresentando uma especificidade pelo substrato marcadamente diferente (HYDE, 1990a; WANG, 1997). Duas enzimas de tripanossomatídeos envolvidas no metabolismo dependente de pterina/folato dos mesmos preenchem adequadamente os critérios de alvos para drogas; são elas a dihidrofolato redutase-timidilato sintetase bifuncional (DHFR-TS) e a pteridina redutase (PTR1), esse último tema deste projeto.

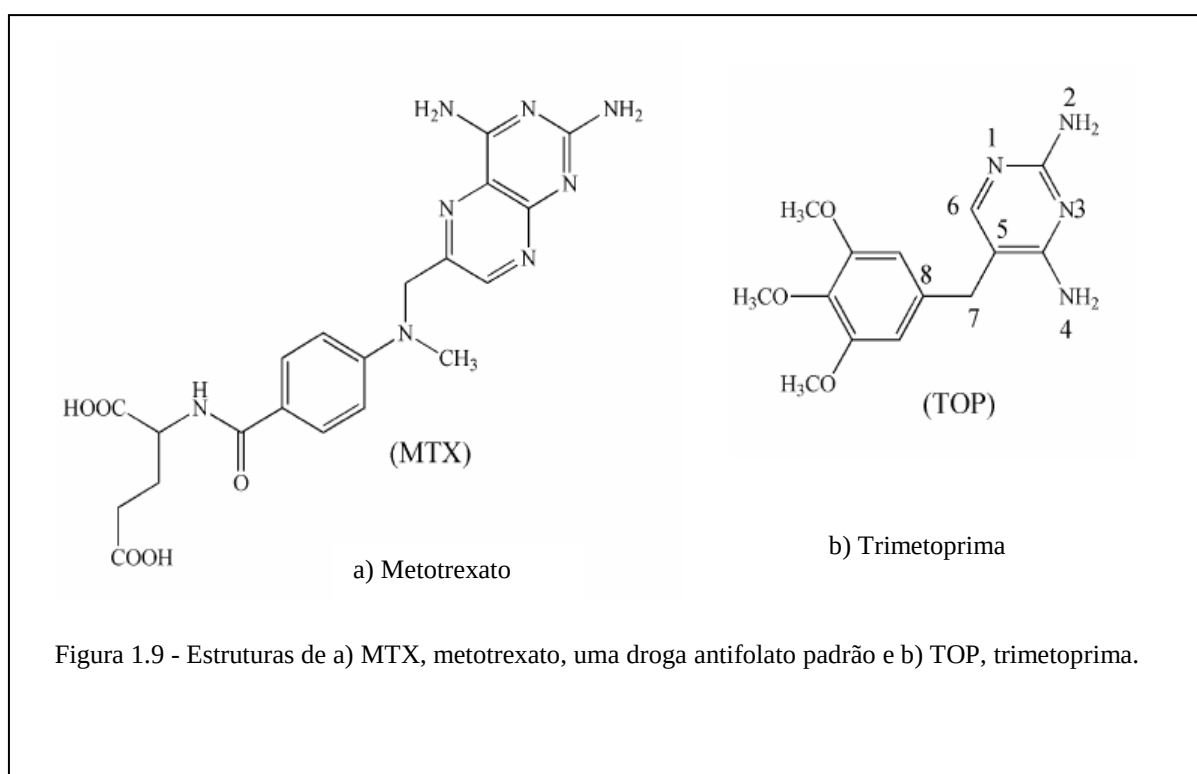
1.4.1 Metabolismo da Pteridina/Folato em Tripanossomas; DHFR-TS e PTR1

As pteridinas (Figura 1.8) têm um papel crítico na hidroxilação da fenilalanina a tirosina, na clivagem de lipídios apresentando ligações tipo éter e como coenzimas para a óxido nítrico sintetase (BLAKLEY, 1985; KWON; NATHAN; STUEHR, 1989). O termo pteridina é usado coletivamente por duas classes de compostos estruturalmente próximos, as biopterinas (Figura 1.8a) e os folatos (Figura 1.8b), os quais diferem somente na cadeia lateral ligada ao átomo C6 do anel pterínico (SENKOVICH et al., 2002). Ambos em suas formas reduzidas (tetrahydro) são importantes coenzimas em uma ampla faixa de rotas metabólicas, que incluem a síntese de DNA e de RNA, a iniciação da síntese de proteínas e o metabolismo de aminoácidos. Pterinas e folatos são essenciais para o crescimento da maioria dos tripanossomatídeos (NARE et al., 1997a) e as enzimas associadas com este aspecto de seu metabolismo são de interesse como alvos de drogas.



Todas as células requerem atividade de dihidrofolato redutase (DHFR) e timidilato sintetase (TS). A TS catalisa a conversão de dUMP (monofosfato de desoxiuridina) a dTMP (monofosfato de desoxitimidina) usando a coenzima 5,10-metilenotetrahidrofolato como doador de carbono e redutor. A DHFR mantém a concentração de tetrahidrofolato (THF) no meio através da redução de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) dependente de dihidrofolato (DHF). A inibição destas enzimas limita o suprimento de dTMP requerido para a síntese de DNA, abreviando a replicação do mesmo e levando à morte da célula. As atividades enzimáticas já foram extensivamente caracterizadas e estudadas como alvos para quimioterapia (BLAKLEY, 1995; CARRERAS e SANTI, 1995). A DHFR é o alvo clássico para terapia antibacteriana e antineoplásica e também é um alvo válido para terapias de certos organismos parasíticos (HYDE, 1990a; WANG, 1997; WEBSTER, 1990). A pirimetamina e o metotrexato (MTX) (Figura 1.9a) representam típicos inibidores de DHFR da classe dos antifolatos, servindo tanto como agentes terapêuticos quanto como modelos para reconhecimento molecular em interações enzima-ligante (BACCANARI e KUYPER, 1993; HARTMAN, 1993; THEN, et al., 1993).

As variações de aminoácidos na DHFR de espécie para espécie ajudam a explicar o grau de inibição seletiva que pode ser obtido e é a base da utilidade clínica de muitos antifolatos. Por exemplo, a trimetoprima (TOP) (Figura 1.9b) inibe seletivamente as DHFR's bacterianas em comparação à enzima humana (IC_{50} de $< 0,05 \mu\text{mol} / \text{L}$ para a primeira comparada a $900 \mu\text{mol} / \text{L}$ para a segunda) e tem um uso já provado como agente antibacteriano, apesar da ausência de um entendimento completo dos fatores que determinam sua seletividade (BACCANARI e KUYPER, 1993; HARTMAN, 1993; THEN et al., 1993).



A TS de muitos organismos é um homodímero com subunidade de massa 30 a 35 kDa e uma das enzimas mais conservadas em termos de sequência de resíduos e estrutura tridimensional. A maioria das DHFR's são monômeros de massa 18 a 24 kDa.

Parasitas kinetoplastidas e apicomplexos são diferentes dos hospedeiros mamíferos no sentido de que ambas atividades de DHFR e TS são associadas em uma única proteína, que é um homodímero com subunidade de massa de 56 kDa. A função DHFR compreende o

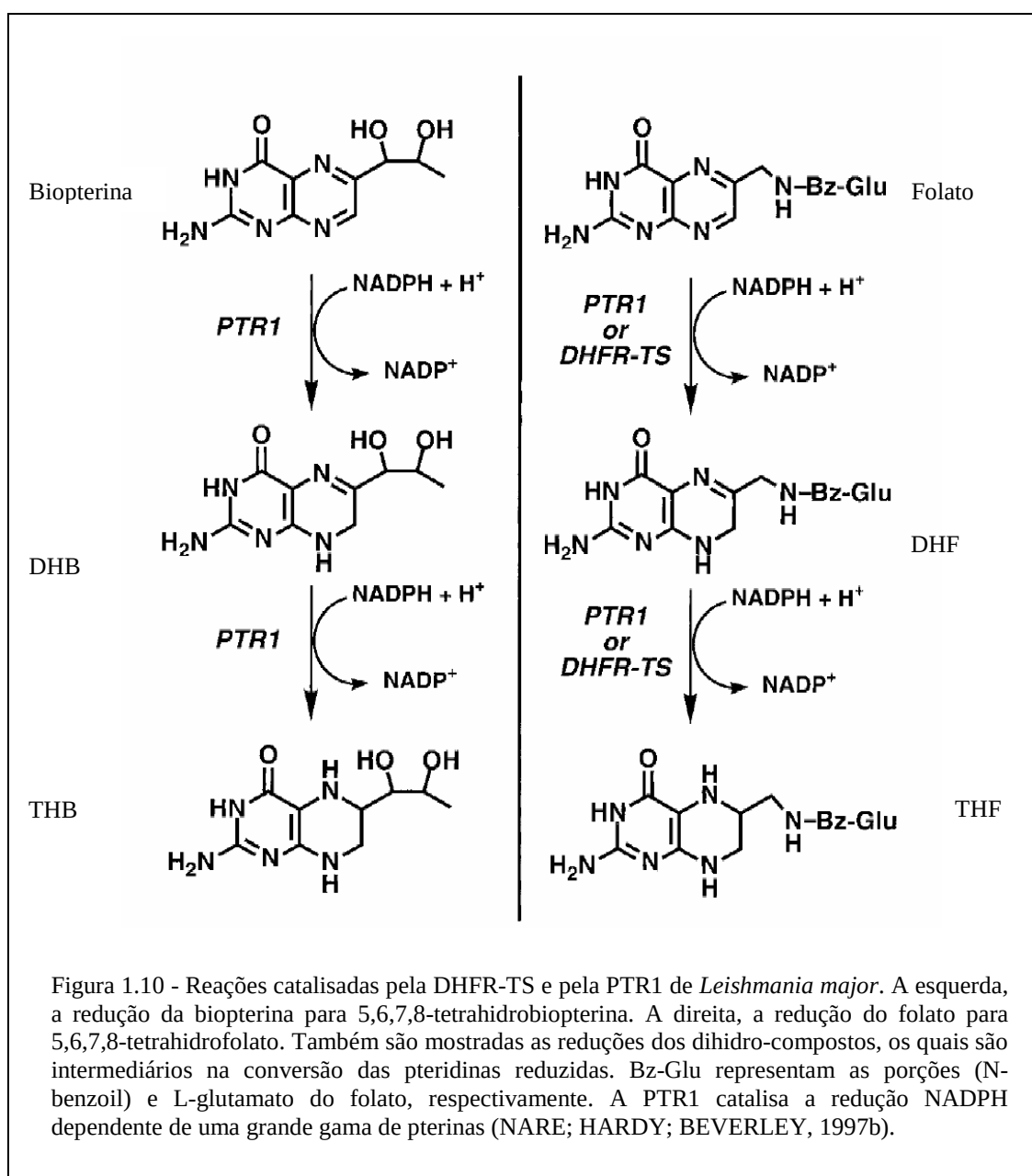
domínio N-terminal e a função TS os resíduos do C-terminal. A DHFR-TS já foi validada como um alvo importante para quimioterapia (WANG, 1997).

1.4.1.1 *Rotas Metabólicas Envolvendo a PTR1 Parasítica*

Os tripanossomatídeos são auxotróficos para pterinas e folatos, dependendo então da obtenção destes de seu ambiente usando um transportador de folato e pterina, combinada com a reciclagem destes compostos (NARE; HARDY; BEVERLEY, 1997b).

Isto sugere que antifolatos tóxicos seriam prontamente assimilados, portanto, serviriam como terapias úteis. Em outras palavras, os antifolatos deveriam servir como drogas contra doenças causadas por esses parasitas, tais como: doença do sono, doença de Chagas e leishmanioses. Entretanto, terapias a base de antifolatos têm falhado com respeito à infecção por leishmanias, apesar de parecerem tão apropriadas (HYDE, 1990b). Tal fato foi investigado usando complementação genética e métodos de transfecção para estudar resistência a drogas antifolatos (BELLO et al., 1994; HARDY et al., 1997; NARE et al., 1997a; NARE; HARDY; BEVERLEY, 1997b). Seleção por resistência a MTX leva a um transporte-assimilação reduzido e à amplificação ou mutação dos genes selecionados. Apesar de que o gene *dhfr-ts* pode sofrer mutação, o mecanismo primário de resistência envolvendo a DHFR é um aumento na expressão do gene que codifica a enzima. Isto está em contraste com a situação encontrada em *Plasmodium*, onde a mutação é o mecanismo predominante de resistência em isolados clínicos (HYDE, 1990b). A amplificação de outro gene leva à identificação da pteridina redutase (PTR1) NADPH dependente. A enzima é necessária para a essencial reciclagem de pterinas conjugadas e não-conjugadas (ou biopterinas) e medeia a síntese da forma bioquimicamente ativa das pteridinas a partir das formas oxidadas. A PTR1 pode produzir DHF/DHB a partir de folato/biopterina (Figura 1.10), então, subsequentemente produz THF/THB a partir de DHF/DHB, isto é, ela duplica a atividade da DHFR, apesar de

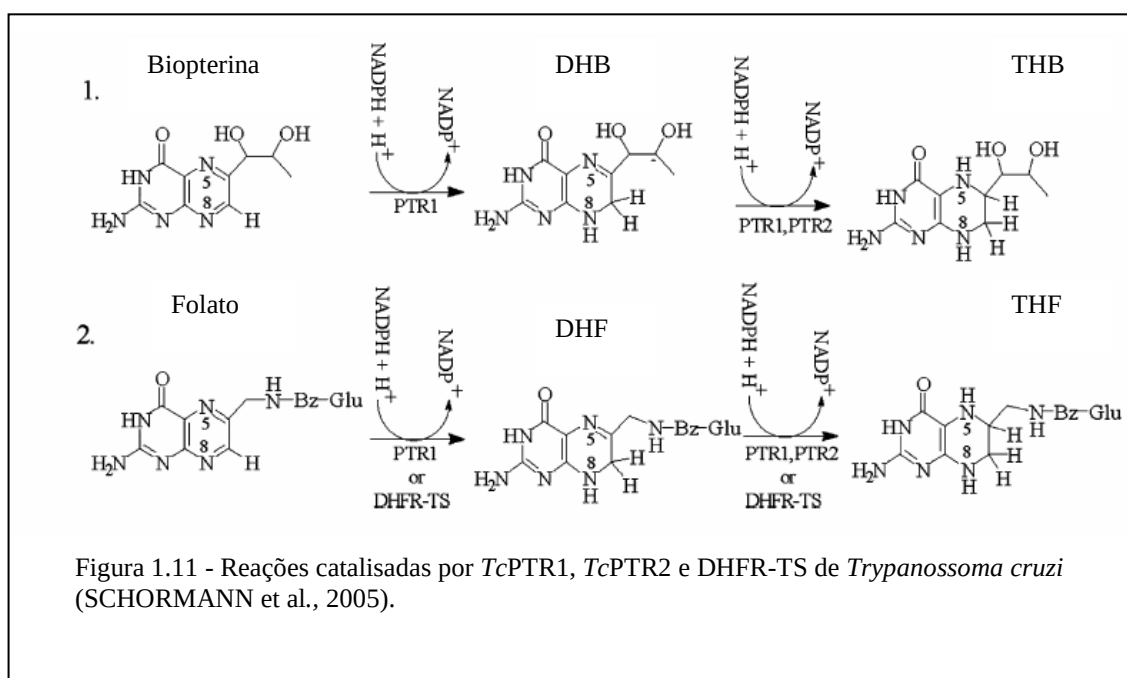
não ter homologia seqüencial com a mesma. Portanto, a PTR1 funciona como um modulador e um caminho alternativo molecular para moderar a inibição da DHFR (NARE; HARDY; BEVERLE, 1997b). Esta descoberta ajuda a explicar a falha, até o momento, da terapia antifolato para infecções por leishmanias e tripanossomos. Assim, no desenvolvimento de drogas para essa rota metabólica de tripanossomatídeos, ambas enzimas devem ser consideradas.



1.4.2 A Estrutura da Pteridina Redutase

A enzima PTR1 pertence à família das dehidrogenases/reduases de cadeia curta (SDR, *short-chain dehydrogenases/reductase*). Estudos bioquímicos mostram que possui uma especificidade total pelo substrato e é capaz de reduzir ambos folatos e biopterinas usando NADPH como coenzimas. A PTR1 é menos sensível (por duas ordens de grandeza) ao MTX e outros antifolatos quando comparada à DHFR, mesmo sendo capaz de reduzir folato e dihidrofolato (SENKOVICH et al., 2002)

Por razões que se desconhecem, as PTR1's de espécies diferentes mostram diferentes atividades. A *TbPTR1* é igualmente ativa com os substrato biopterina e DHB, mas relativamente insensível para folato e DHF. A *TcPTR1* (PTR1 de *Trypanosoma cruzi*) é mais ativa contra biopterina e folato do que com DHB e DHF (ROBELLO et al., 1997), enquanto a isoforma *TcPTR2* é somente ativa contra pterinas reduzidas, DHB e DHF (SCHORMANN et al., 2005) (Figura 1.11). *TbPTR1* é mais ativa do que *LmPTR1* com respeito à redução das pterinas e as enzimas têm pH's ótimos diferentes. Para *LmPTR1*, o pH ótimo está em 4,7, comparado com 3,7 para *TbPTR1*. *TbPTR1* mostra inibição pelo substrato com DHB, enquanto *LmPTR1* apresenta inibição variável pelo substrato como relatado (NARE; HARDY; BEVERLEY, 1997b).



1.4.2.1 O Sítio Ativo da Pteridina Redutase

1.4.2.1.1 Modelo Cristalográfico

A primeira estrutura de *TbPTR1* foi determinada a 2,2 Å de resolução complexada com MTX e os índices de discordância R e R_{free} foram 15,35 % e 22,30 %, respectivamente. A unidade assimétrica consiste em um homotetrâmero. A estrutura foi determinada sem o uso das restrições de simetria não cristalográfica (NCS) (DAWSON et al., 2006). A *TbPTR1* apresenta 51 % de identidade sequencial com a *LmPTR1* e comparações estruturais mostram que a arquitetura do sítio ligante da coenzima e do centro catalítico é altamente conservada.

1.5 Cristalização de Proteínas

O principal objetivo da cristalização de uma macromolécula biológica, tal como proteína, ácido nucléico ou vírus, é o estudo estrutural desta macromolécula por métodos de difração de raios X. Tal estudo estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos. Os cristais de macromoléculas biológicas são diferentes dos cristais de pequenas moléculas em vários aspectos: i) tamanho, cristais de macromoléculas são normalmente bem menores, dificilmente excedendo 1 mm³ em volume ii) são bem mais frágeis e iii) possuem um alto conteúdo de solvente. A fragilidade dos cristais de macromoléculas biológicas é uma consequência das poucas interações intramoleculares dentro da retículo e do próprio alto conteúdo de solvente destes cristais (de 20 % a mais de 75 % em volume) (DE AZEVEDO et al., 2003). As ligações que mantêm a estrutura cristalina são do tipo hidrofóbicas e de hidrogênio. Ainda, devido ao alto conteúdo de solvente, de

macromoléculas biológicas devem ser mantidos em um ambiente saturado com o mesmo, caso contrário, a desidratação conduzirá à destruição dos cristais. O alto conteúdo de solvente, contudo, tem conseqüências úteis, pois os canais de solvente nos cristais de macromoléculas biológicas permitem a difusão de pequenas moléculas, uma propriedade usada na preparação de derivados isomorfos e de complexos binários de proteínas com ligantes.

1.5.1 Formação de um Cristal de Sal

Quando um sal é dissolvido na água, seus íons carregados interagem com a molécula polar da água; a medida que continua a se dissolver a solução aumenta a sua concentração e esta eventualmente atinge um estado supersaturado, em que o número de íons salinos dissolvidos excede o limite de solubilidade do sal (DUCRUIX e GIEGE, 1992; McPHERSON, 1999). Num estado supersaturado, os íons salinos podem formar uma fase sólida (por exemplo, cristalina) uma vez que a energia de ativação tenha sido superada. Então, o número de moléculas na fase sólida continuará aumentando até que o equilíbrio seja alcançado, isto é, quando o número das moléculas que se incorporam ao estado sólido é igual ao número de moléculas redissolvidas na solução.

Os sais também podem formar cristais pela evaporação das soluções salinas, devido a diminuição de moléculas de solvente, forçando os íons salinos a interagir um com os outros, formando o estado sólido. Os cristais continuarão crescendo enquanto a água continuar evaporando. Para ambos os exemplos de cristalização de sal descritos, os fundamentos são similares, à medida que a proporção de sal disponível em relação à água aumenta, a solução se torna mais concentrada até alcançar um ponto crítico quando os íons começam a interagir uns com os outros formando um estado cristalino.

1.5.2 Formação de um Cristal de Proteína

Para o crescimento de cristais de proteínas, estas têm que alcançar um estado de supersaturação em solução que é termodinamicamente instável, no qual pode se desenvolver uma fase sólida amorfa ou cristalina quando há o retorno ao equilíbrio. A supersaturação pode ser alcançada pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns parâmetros, como: temperatura, pH e força iônica. O conhecimento de solubilidade macromolecular e destes parâmetros é um pré-requisito para o controle das condições de cristalização. Como as bases teóricas de solubilidade de proteínas ainda são controversas, especialmente no que se refere aos efeitos dos sais, os dados sobre a solubilidade quase sempre se originam de determinações experimentais. Nos últimos anos, métodos quantitativos permitiram tais determinações, usando pequenas quantidades de proteína (MIKOL; RODEAU; GIEGE, 1990; RIES-KAUTT e DUCRUIX, 1989).

As proteínas, embora de grande tamanho, podem formar cristais de modo similar aos sais (Figura 1.12) (McPHERSON, 1999). As técnicas envolvem geralmente a redução da quantidade de água disponível para que se aumente a concentração de um precipitante, o qual compete com a proteína pelas moléculas de água. A solubilidade de proteína continua diminuindo com o aumento da concentração do precipitante e quando a proteína excede o limite de solubilidade (linha contínua da Figura 1.12), penetra primeiro na região metaestável de supersaturação, eventualmente então penetrando na região instável de supersaturação (linha tracejada da Figura 1.12).

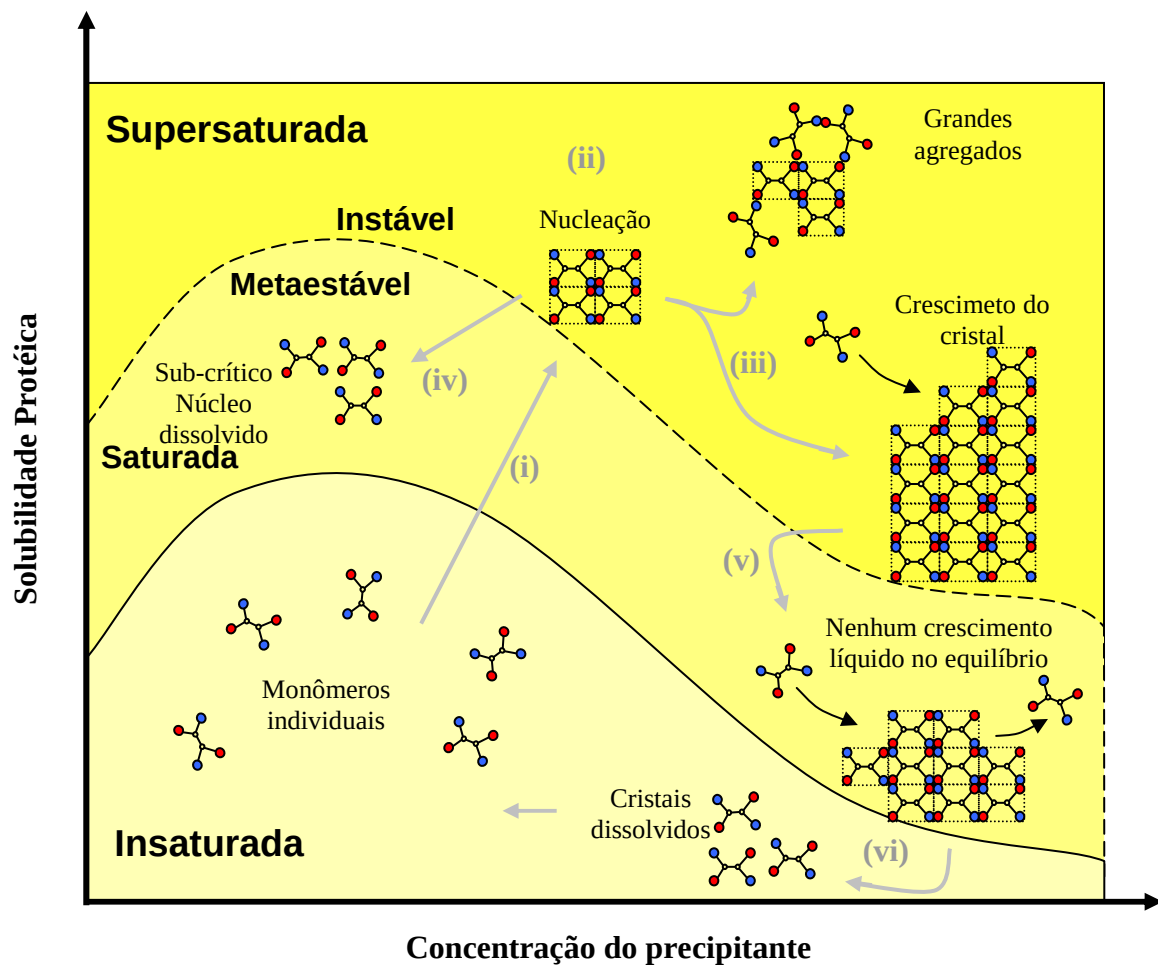


Figura 1.12 - Diagrama de fases para cristalização macromolecular. Enquanto a concentração do precipitante aumenta, a solubilidade da proteína diminui e a proteína torna-se saturada (acima da linha contínua) (i). À medida que a solubilidade da proteína diminui além da região instável supersaturada (acima da linha tracejada), os núcleos formam-se prontamente (ii) e crescem em grandes agregados ou em cristais (iii). O número de moléculas de proteínas dissolvidas diminui à medida que as moléculas se juntam à fase sólida e a solubilidade aumenta, retornando a proteína para a região metaestável. Nenhum núcleo novo pode se formar e os pequenos núcleos abaixo do tamanho crítico dissolvem-se (iv). Os cristais crescem até que a solubilidade aumente novamente para a fronteira entre a saturação e a insaturação e um equilíbrio final for alcançado (v). Se a solubilidade aumentar além disso, os cristais se dissolvem (vi) (McPHERSON, 1999).

Na região instável, o impulso termodinâmico para que a proteína adentre ao estado sólido é elevado e, como é possível superar a energia de ativação requerida para formar um estado sólido, um pequeno cristal é formado. As moléculas da proteína podem então unir-se ao estado sólido interagindo com o núcleo do cristal, gerando o crescimento de cristais

ordenados ou agregados em orientações aleatórias. Se a concentração do precipitante for muito elevada, muitos sítios de nucleações se formarão e cristais umedecidos ou grandes agregados são produzidos. Se a concentração do precipitante for exatamente correta, então somente alguns sítios de nucleações se formarão e as moléculas lentamente se unirão para gerar cristais.

Na região metaestável, novos núcleos não podem ser formados porque o impulso termodinâmico para que a proteína entre no estado sólido não é mais tão forte tal que a chance de superar a energia de ativação requerida e a probabilidade de formar uma fase sólida é baixa. Os núcleos menores que um tamanho crítico (algumas moléculas orientadas juntas) podem até mesmo redissolver-se. Os núcleos acima do tamanho crítico, entretanto, podem continuar crescendo e este continua até que as moléculas dissolvidas da proteína retornem à barreira entre a saturação e a instauração. Neste ponto, os cristais estão em equilíbrio com a solução e o número de moléculas dissolvidas que se somam ao cristal é igual ao número de moléculas do cristal que se dissolvem na solução. Este é geralmente, o ponto final da cristalização em um ambiente selado, mas, se aberto e a quantidade de água disponível aumentar, as moléculas dissolvidas de proteína encontrar-se-ão insaturadas e os cristais se dissolverão um pouco para reestabelecer o equilíbrio, ou podem se dissolver completamente se o equilíbrio nunca for alcançado.

Para se cristalizar uma macromolécula biológica em um dado solvente, portanto, é necessário induzir a solução a um estado supersaturado. Uma macromolécula biológica segue as mesmas leis termodinâmicas, como qualquer outro tipo de molécula inorgânica ou orgânica no que se refere à supersaturação, nucleação e crescimento de cristais (BOISTELLE; ASTIER, 1988).

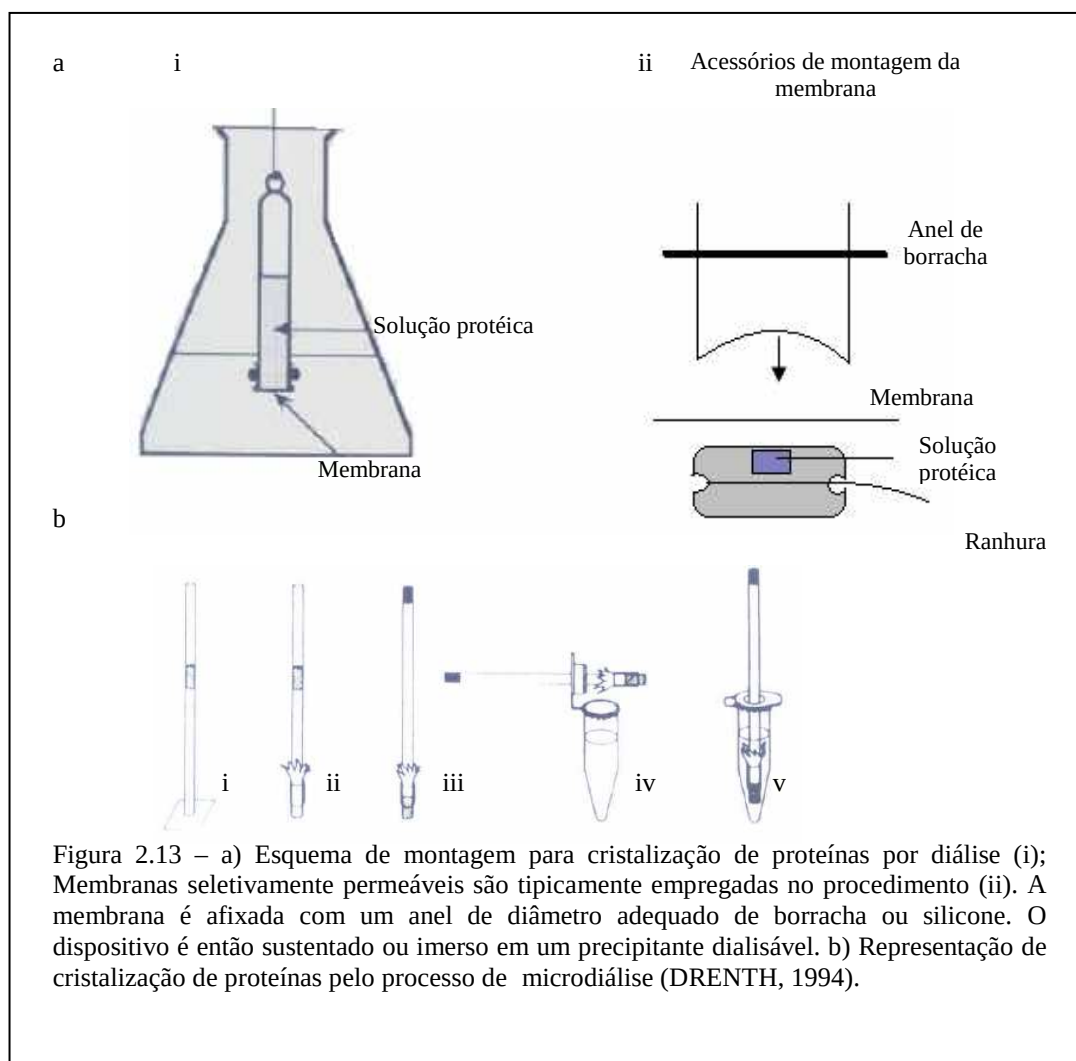
1.5.2.1 *Alguns Métodos para Produção de Cristais de Proteína*

Vários métodos para aumentar a quantidade de proteína disponível em relação à de água são adotados para a cristalização. Três métodos serão discutidos aqui: o método de diálise (o mais antigo), o método batch e o de difusão de vapor (mais simples).

1.5.2.1.1 Diálise

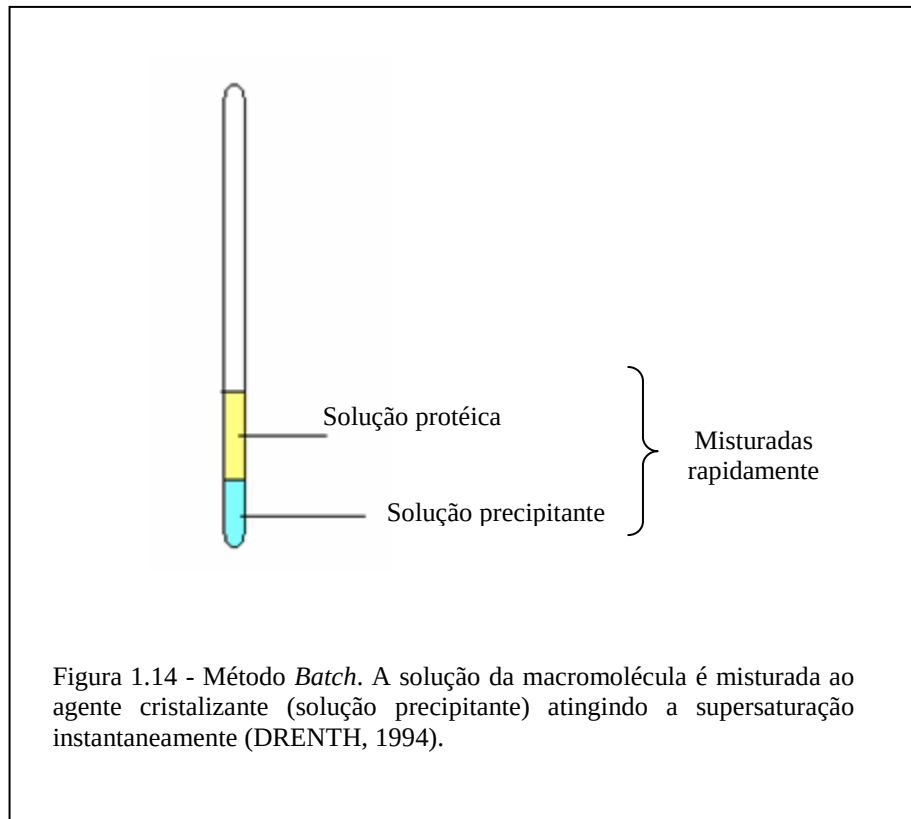
O procedimento de diálise permite uma abrangência de condições precipitantes serem automaticamente ensaiadas, porém, de modo diferente de outros métodos, nele a concentração da proteína permanece constante.

Membranas seletivamente permeáveis são tipicamente empregadas no procedimento, são usadas para conter a proteína em solução na parede grossa de tubos capilares ou em botões de microdiálise de plástico transparente (Figura 1.13). A membrana é segurada com um anel de borracha ou silicone com diâmetro adequado. O dispositivo é então sustentado e imerso em uma solução de precipitante dialisável, um tampão de baixa força iônica ou água (STRYER, 1999). As condições externas podem variar de uma maneira gradativa, com intervalos de equilíbrio de alguns dias entre os passos. Nos tubos capilares, precipitantes em gradiente de concentração elevado na solução protéica da coluna pode conduzir ao crescimento de cristais. Em geral, o método de diálise não é econômico em proteína, porém, tem a vantagem de que a solução precipitante pode ser facilmente trocada.



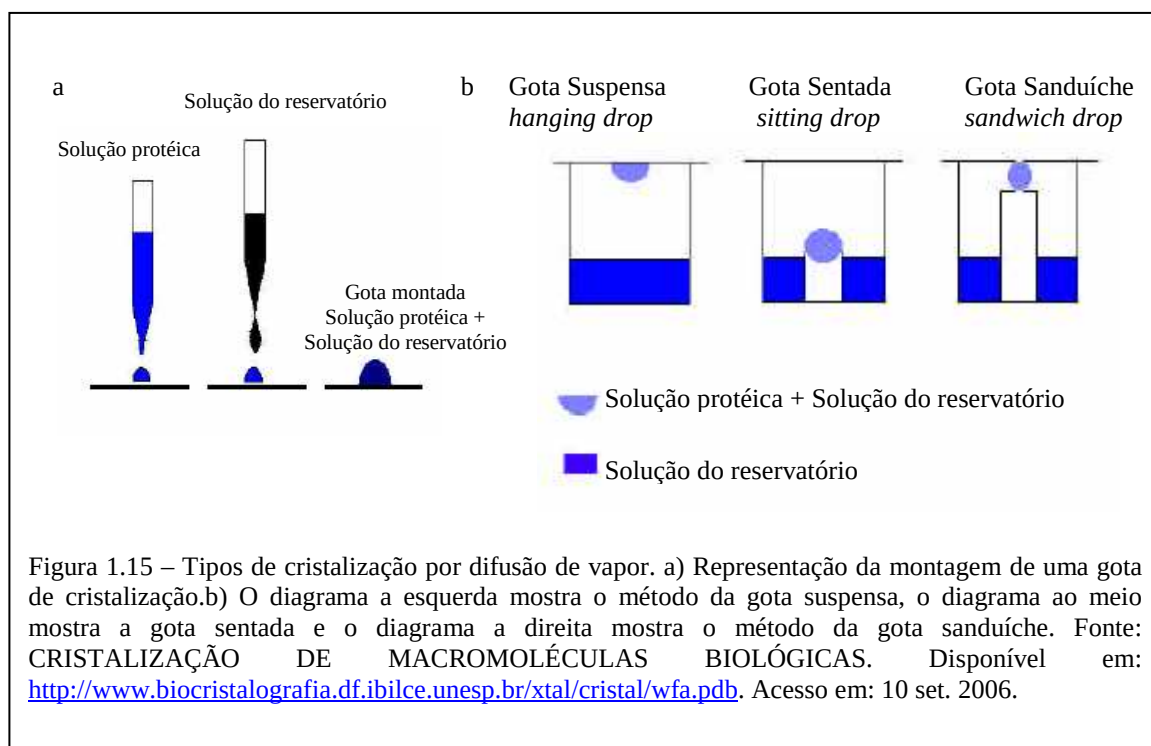
1.5.2.1.2 *Batch*

No método *Batch* uma solução instaurada de proteína é misturada com uma solução precipitante (McPHERSON, 1999) (Figura 1.14). A proteína adentra repentinamente a região instável de supersaturação, enquanto o precipitante compete pelas moléculas de água disponíveis. Os núcleos podem se formar e, se as concentrações de proteína e precipitante tiverem sido selecionadas apropriadamente, os sítios de nucleações se formarão e as moléculas se unirão formando cristais ao invés de grandes agregados (RAYMENT, 2002).



1.5.2.1.3 Difusão de Vapor

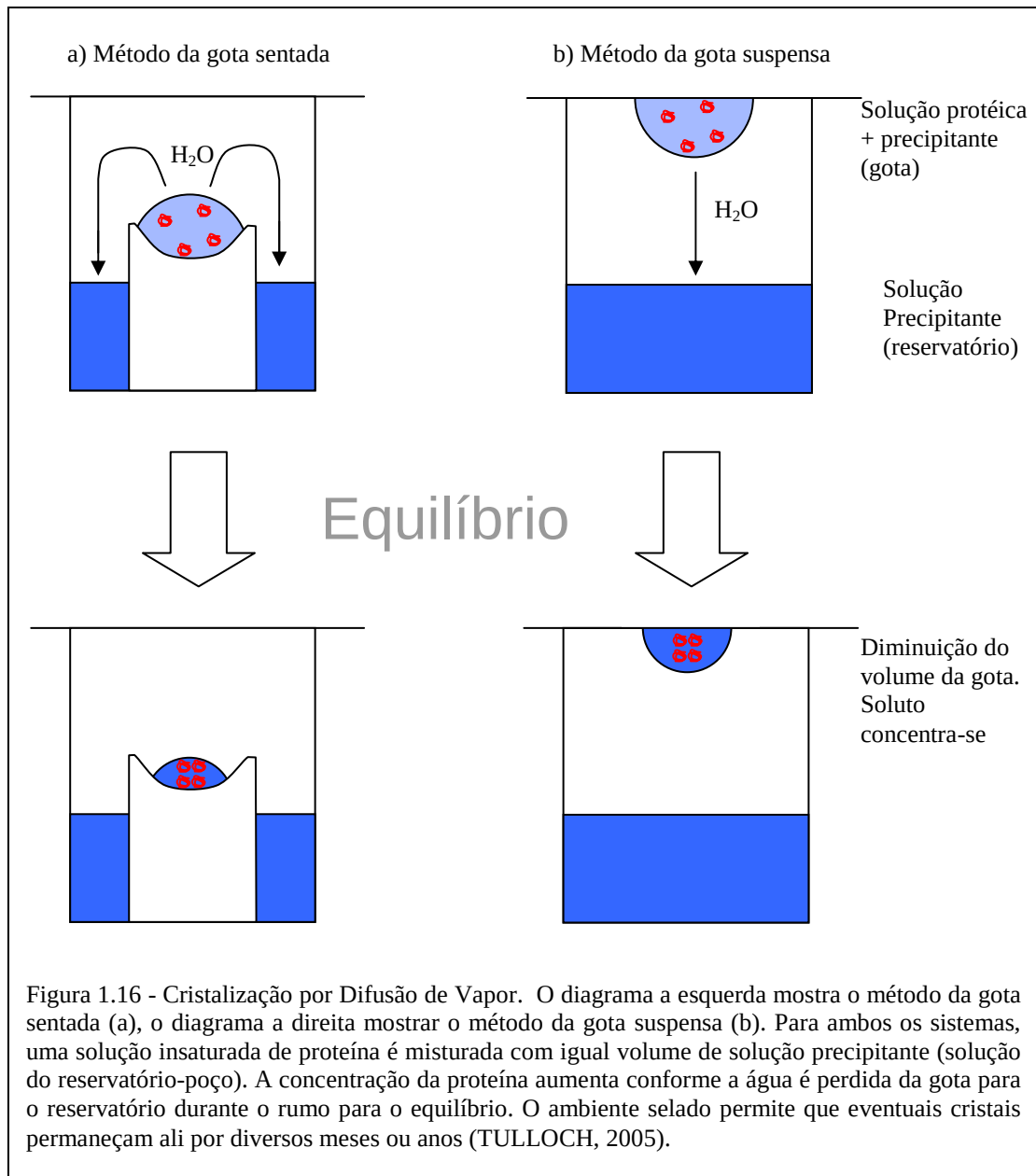
Este método foi utilizado pela primeira vez na cristalização do tRNA (HAMPEL et al., 1968). Três modalidades de cristalização por difusão de vapor são utilizadas: gotas suspensas *hanging drops*, gotas sentadas *sitting drops* e gotas sanduíche *sandwich drops* (Figura 1.15), e os princípios que se aplicam são aos mesmos.



Discorreremos sobre os dois métodos mais comuns de cristalização por difusão de vapor: as gotas suspensas *hanging drops* e gotas sentadas *sitting drops*. No método de difusão de vapor da gota sentada, uma pequena gota de solução da proteína instaurada (tipicamente 2 - 20 μL) é sustentada em uma plataforma cercada por um reservatório de solução do precipitante (solução-mãe) (Figura 1.16) (McREE, 1999). Um volume igual de solução-mãe é então misturado com a solução da proteína e o ambiente é selado por fora, colocando uma lamínula de vidro sobre a borda do poço lubrificado. No ambiente fechado, a gota sentada tem inicialmente uma osmolaridade maior do que o reservatório e a água é perdida para o reservatório por difusão do vapor. O resultado é a diminuição do volume da gota, ocorrendo a concentração tanto da proteína quanto do precipitante, e a proteína pode ser assim levada ao estado supersaturado e a formar cristais.

O método de difusão de vapor em gota suspensa funciona da mesma maneira, mas a gota de proteína é suspensa sobre o reservatório, ao invés de sentar-se em uma plataforma (Figura 1.16) (McPHERSON, 1999). A cristalização por difusão de vapor têm vantagens

sobre o *Batch*, uma delas é que a evaporação lenta da água da gota da proteína permite que a proteína se concentre vagarosamente na região instável de supersaturação, tendo por resultado menos e maiores cristais do que os geralmente produzidos pelo método *Batch*.



1.5.3 Obtenção de Cristais de Complexos Protéicos

Muitas proteínas associam se com pequenas moléculas como parte de sua função biológica, por exemplo: complexo enzima-inibidor, complexos proteína-carboidrato

(lectinas), complexos proteínas-ácidos nucléicos, complexos proteína-proteína e complexos anticorpo-antígeno. Cristais de complexos podem ser formados por *soaking* ou por co-cristalização sob condições controladas. A metodologia é similar à usada para a preparação de derivados de átomos pesados, sendo requerido conhecimento prévio sobre a estabilidade para a incorporação das moléculas adicionadas. Há uma preferência pela co-cristalização, por mais facilmente conduzir à ocupação dos sítios ativos pelos ligantes (INKPEN, PALMER, LADD, 2003).

1.5.3.1 Co-cristalização

A co-cristalização pode ser realizada *in situ* na gota suspensa e na gota sentada, ou em tubos testes onde o método *Batch* de cristalização é usado (INKPEN, PALMER, LADD, 2003). A co-cristalização pode produzir cristais de melhor qualidade do que os obtidos por *soaking*, mas mudanças de simetria e de cela unitária são mais prováveis de ocorrer como uma consequência das diferentes condições de cristalização quando se procura produzir derivados de átomos pesado; portanto, não é usual a co-cristalização ser o primeiro método de escolha para o procedimento substituição isomorfa, porém, ela é o método mais usual quando da ligação de ligantes comuns já que as condições de cristalização quase não mudam. O método consiste simplesmente em incubar a proteína com o ligante em solução antes da cristalização.

1.5.3.2 Soaking

Outro método para o preparo de complexos proteína-ligante é o *soaking*, que consiste em deixar o cristal em contato com uma solução-mãe artificial, que tem composição

basicamente igual à da solução-mãe original acrescida de um excesso do ligante; isto pode ser feito ao mesmo tempo com a concentração de um crioprotetor, se desejável e viável. A concentração do ligante tipicamente usada deve ser de 10 a 1000 vezes a constante de dissociação (K_d), se esta for conhecida. O *soaking* por 10 a 30 minutos deve ser suficiente para saturar os sítios de ligação, se estes forem acessíveis pelos canais de solvente. Se as moléculas de proteína empacotarem no cristal de tal forma que obstruam o sítio de ligação do ligante, ou se os cristais não tolerarem o *soaking* e se quebrarem ou ainda se dissolverem, então a co-cristalização com ligantes deve ser empregada (ROWLETT, 2005).

Este método é altamente sensível e pode causar (muitas vezes visível) deterioração da qualidade do cristal, mas não é provável induza mudanças na cela unitária e na simetria (INKPEN, PALMER, LADD, 2003).

1.5.3.2.1 Crioproteção e montagem no *loop*

O rápido resfriamento dos cristais às temperaturas criogênicas tornou-se um procedimento padrão em cristalografia macromolecular (GARMAN, 1999). A razão principal para o resfriamento é a redução drástica dos danos por radiação (GARMAN, 2002), minimizando a necessidade de cristais múltiplos para uma completa coleta de dados e conseqüente fusão de erros, uma segunda vantagem é o aumento da resolução devido à redução das vibrações térmicas.

A montagem do cristal precisa ser feita com um crioprotetor antes de ser rapidamente refrigerado *flash cooled* para prevenir o congelamento (isto é, a formação do gelo, o que destrói o cristal), devendo-se usar reagentes como; PEG, MPD ou GOL em alta e adequada concentração. Estes reagentes impedem a formação de gelo no líquido-mãe quando o cristal é colocado no difratômetro sob o feixe de nitrogênio resfriado.

Por razões não muito claras, nem sempre a crioproteção é bem-sucedida, sendo problemas comuns o aumento excessivo na mosaicidade e a perda de resolução. Numerosos procedimentos de *annealing* foram relatados que ocasionalmente reduzem a mosaicidade (KRIMINSKI et al., 2002; HANSON.; SCHALL; BUNICK, 2003), mas estes ainda não foram estabelecidos como procedimento padrão. Poucos estudos sistemáticos de procedimentos gerais de *annealing* aparecem na literatura; estes métodos são de grande relevância, porém, consomem tempo, riscos aos cristais e apresentam pouca sistemática (DEKKER, 2003).

1.6 Difração de Raios X, Coleta e Processamento de Dados

A principal técnica utilizada para a resolução de estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas tem sido a cristalografia por difração de raios X (BLUNDELL e JOHNSON, 1976; DRENTH, 1994).

1.6.1 Observação de Pequenos Objetos

A microscopia de luz é tipicamente usada para enxergar objetos muito pequenos, microscópicos, como, por exemplo, células. Em microscopia, o espalhamento de luz sobre as células é redirecionada por uma lente que cruza um ponto focal e imediatamente após isso a imagem pode ser observada (Figura 2.17) (BLOW, 2003).

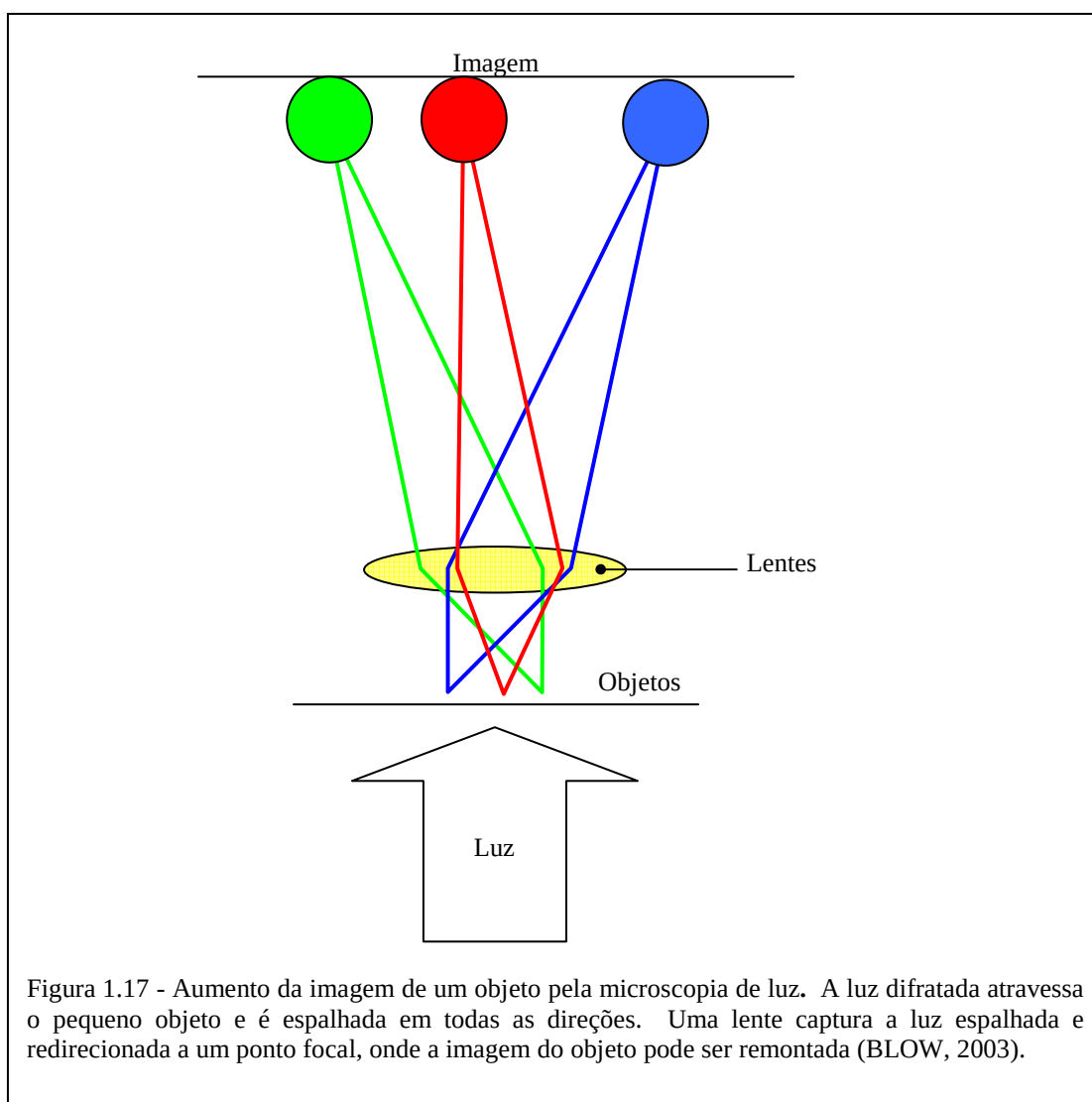
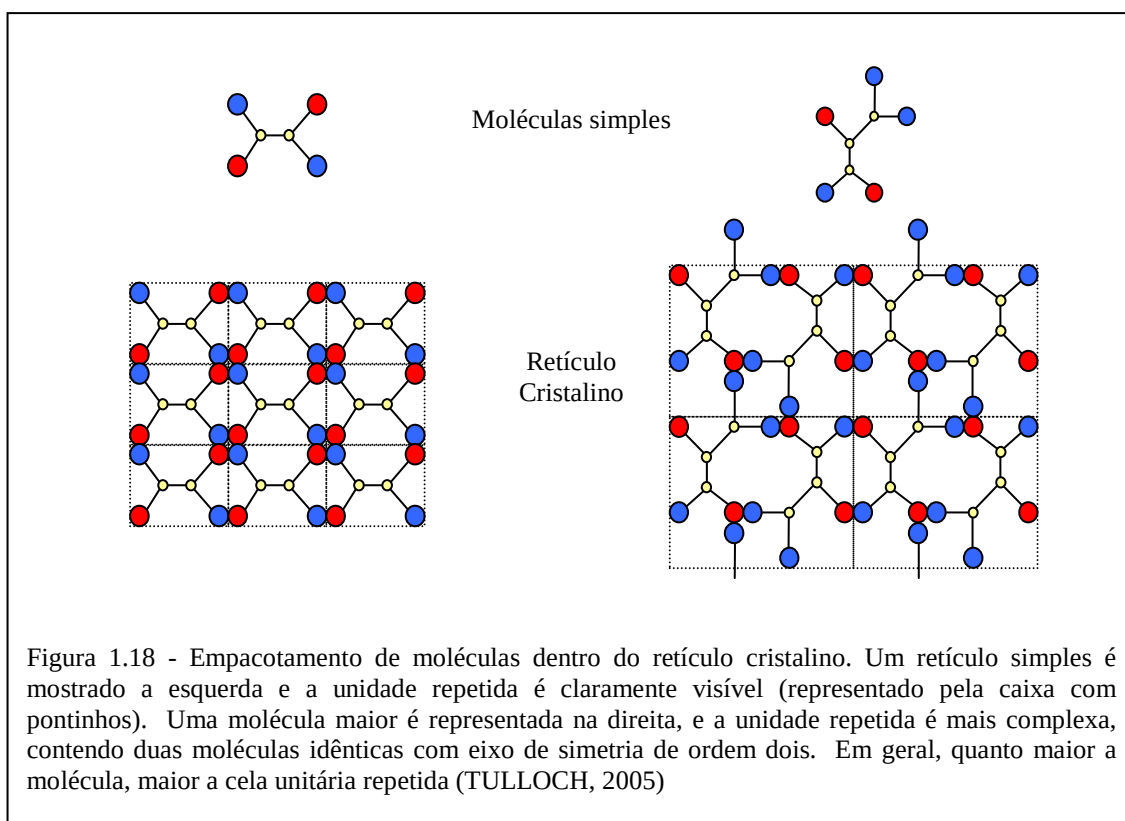


Figura 1.17 - Aumento da imagem de um objeto pela microscopia de luz. A luz difratada atravessa o pequeno objeto e é espalhada em todas as direções. Uma lente captura a luz espalhada e redirecionada a um ponto focal, onde a imagem do objeto pode ser remontada (BLOW, 2003).

A resolução com que os objetos que podem ser vistos usando a microscopia de luz é limitada pelo comprimento de onda que é usado; no caso da luz visível, este estende-se de 350 nm a 700 nm aproximadamente e, desde que os detalhes não podem ser resolvidos além desse comprimento de onda, a microscopia de luz não pode ser usada para objetos cuja dimensões sejam menores.

Para resoluções a nível atômico deve-se usar luz de menor comprimento de onda. Os raios X têm comprimento de onda ao redor de 1 nm ($10 \text{ \AA}$) e devem ser usados ao invés da luz visível para resolver moléculas a nível atômico, porém, há dois problemas fundamentais associados ao uso dos raios X, a seguir.

Os primeiros raios difratados por uma molécula simples são muito fracos e nunca seriam detectados acima do nível de ruído, além disso, os raios X danificam as moléculas e uma molécula simples poderia ser destruída antes que pudesse ser resolvida devido à difração (BLOW, 2003). Este problema pode ser superado pelo preferencial empacotamento das moléculas na forma cristalina em vez de moléculas simples (Figura 1.18). Em um cristal, o vasto número de moléculas empacotadas juntas, em uma mesma orientação, permite que a intensidade dos raios X difratados (espalhados) seja amplificada e detectada acima do nível do sinal de ruído. Os danos às moléculas são também menos severos, porque muitas delas estão presentes na mesma orientação.



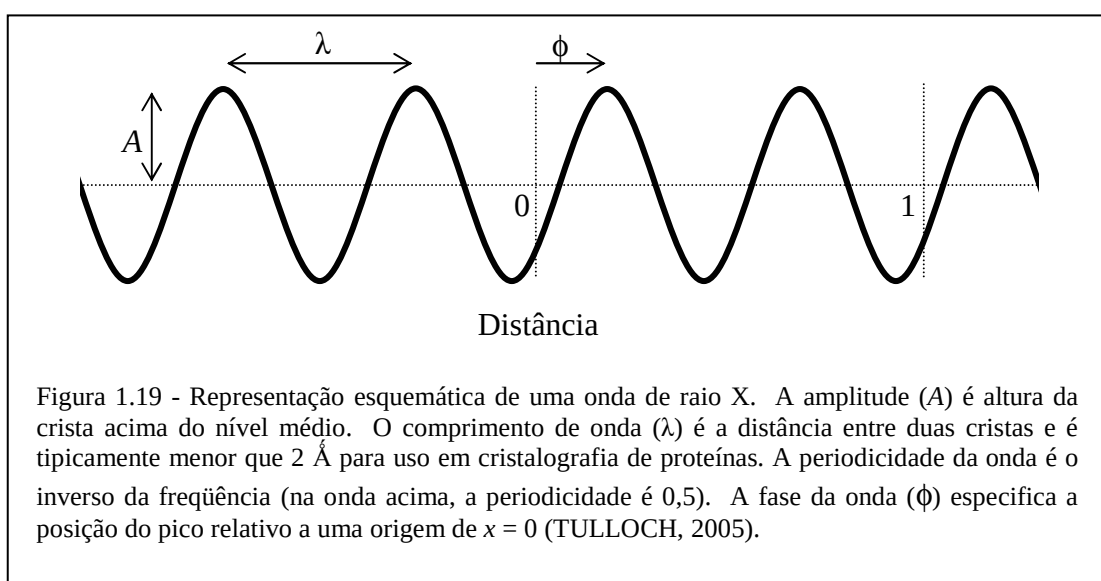
O segundo problema é que os raios X não podem ser redirecionados por uma lente cruzando um ponto focal (BLOW, 2003; BLUNDELL e JOHNSON, 1976). Além disso, desde que uma lente é composta por átomos que seriam danificados também pelos raios X, uma lente funcional para raios X jamais será produzida; porém, este problema pode ser

superado. As imagens difratadas chegam a um detector assim como elas chegam a uma lente, mas a imagem deve ser remontada com um computador. Para remontar a imagem das moléculas, deve-se saber a fase das ondas difratadas que chegam ao detector. Não há nenhuma forma de medir diretamente a fase e então métodos indiretos devem ser adotados para calcular a fase antes que a imagem da molécula possa ser determinada.

1.6.2 Difração de Raios X

1.6.2.1 As Características da Onda de Raios X

Os raios X são fótons de energia e têm aspectos de partícula e onda. A onda é sinusoidal), caracterizada por sua amplitude (A) e por seu comprimento de onda (λ) (Figura 1.19) (BLOW, 2003). Os raios X de comprimento de onda maior que 2 Å (frequentemente referenciados como raios X moles) são absorvidos fortemente pelo ar e pela água, mas os raios X de comprimento de onda mais curto que 2 Å são mais penetrantes e são usados com a finalidade de determinação estrutural cristalográfica de proteína.



A energia (E) de um único fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda (λ), diretamente proporcional à constante de Planck (h) e à velocidade da onda (c , a velocidade da luz) (Equação 1.1). Assim, quando os comprimentos de ondas dos fótons são conhecidos, suas energias também são.

$$E = hc/\lambda \quad \textbf{Equação 1.1}$$

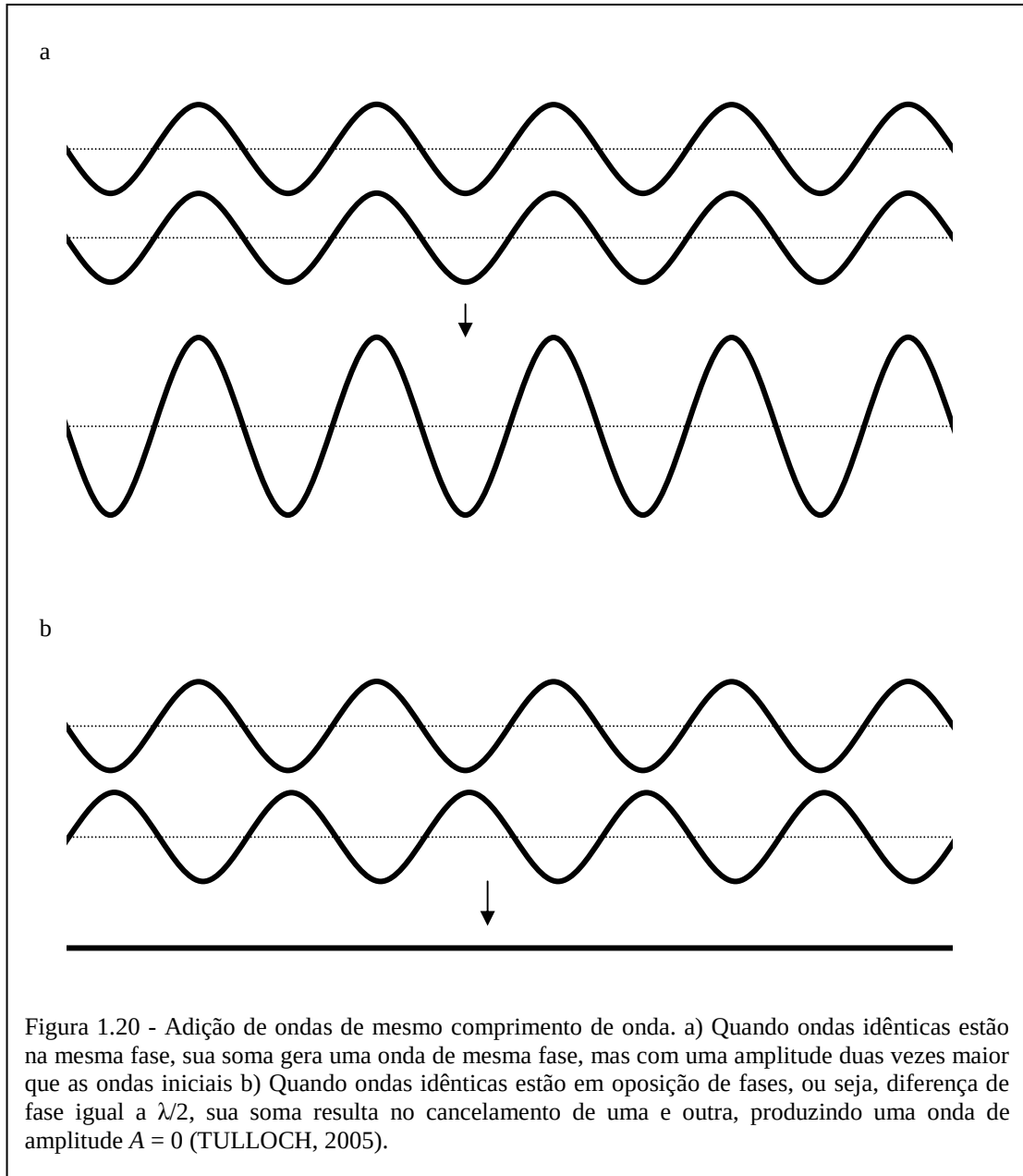
A medida que uma onda avança, a posição da crista da onda avança igualmente. A fase de uma onda (ϕ) especifica a posição da crista ou pico da onda relativo a origem de $x = 0$ e no tempo $t = 0$. O avanço da onda pode ser expresso matematicamente (Equação 1.2) de modo que a altura da onda (W) possa ser especificada em qualquer dado tempo (t).

$$W = A \cos[(2\pi(x-ct)/\lambda) + \phi] \quad \textbf{Equação 1.2}$$

1.6.2.1.1 Expressando a Onda como Vetores

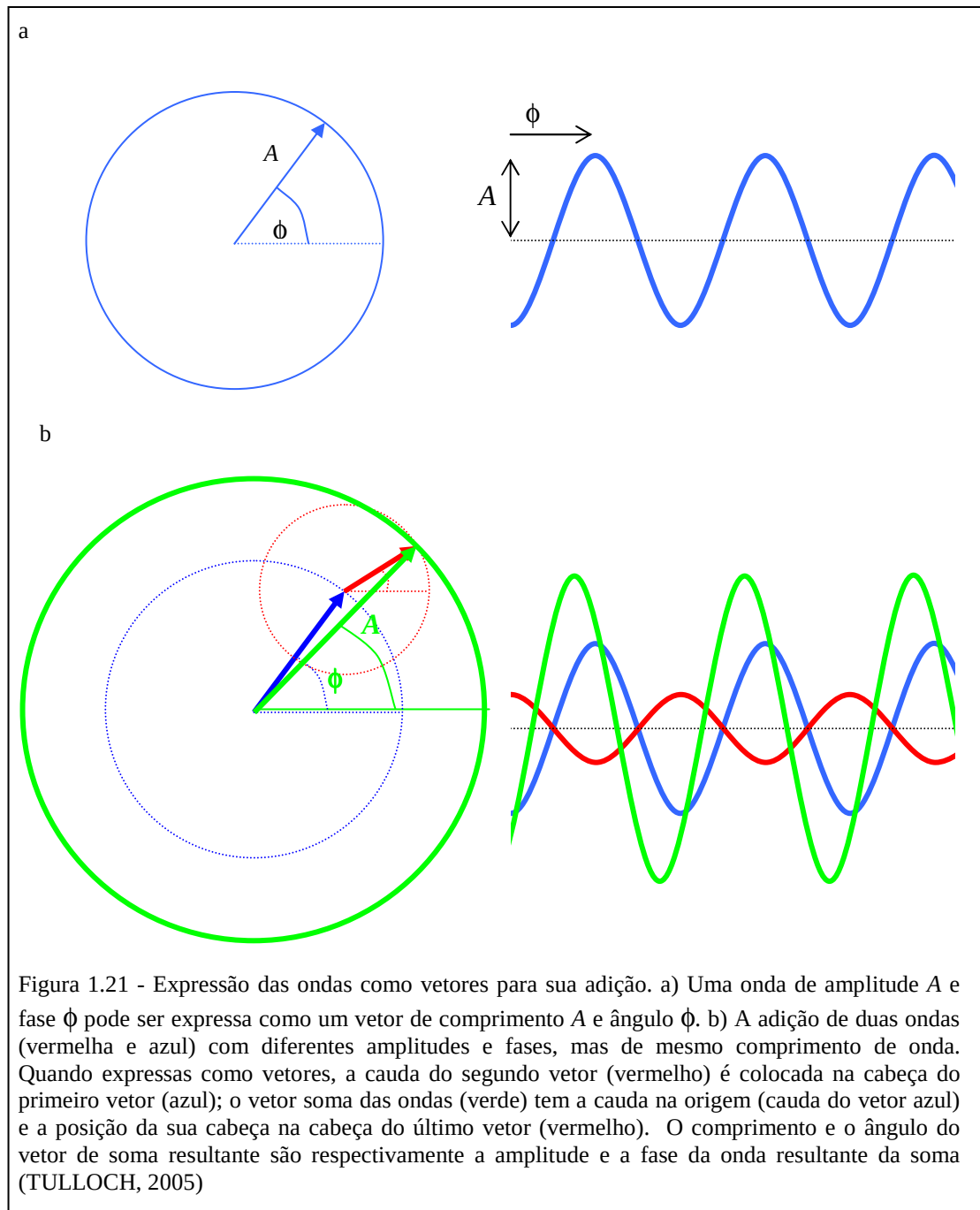
Quando duas ou mais ondas viajam ao longo do mesmo trajeto simultaneamente, suas ondas sobrepõem-se (Figura 1.20) (BLOW, 2003; BLUNDELL e JOHNSON, 1976; GIACOVAZZO et al., 1992). Se duas ondas idênticas (de mesma amplitude e comprimento de onda) estão na mesma fase, elas são somadas e a amplitude da onda resultante é o dobro daquela das ondas iniciais, enquanto o comprimento de onda e a fase permanecem inalterados. Se as duas ondas idênticas estiverem fora de fase pela metade do comprimento de onda, tais que as cristas de uma correspondam aos vales da outra, a adição das ondas resulta no cancelamento completo das mesmas. É fácil observar as ondas resultantes quando as ondas estão na mesma fase e com mesmo comprimento de onda ou fora de fase e com metade de um

comprimento de onda, mas torna-se mais difícil somar as duas ondas se suas fases diferirem por outros valores.



As ondas podem ser expressas como vetores, de maneira que a amplitude da onda é expressa como vetor e a fase da onda expressa como o ângulo do vetor (Figura 1.21a) (HELLIWELL, 1992). Uma onda de amplitude $A = A_1$ e fase $\phi = \phi_1$ pode ser somada a uma outra onda de amplitude $A = A_2$ e fase $\phi = \phi_2$ colocando a cauda do segundo vetor sobre a

cabeça do primeiro vetor (Figura 1.21b). Um novo vetor pode ser extraído da origem à cabeça do segundo vetor, e o comprimento do novo vetor expressa a amplitude da onda resultante e o ângulo do novo vetor expressa a fase da onda resultante.



1.6.2.1.2 Expressando a Onda como Números Complexos

Um número complexo é uma maneira de expressar a amplitude e a fase de uma onda por um único número (Figura 1.22) (BLOW, 2003; HELLIWELL, 1992). O número complexo z representa uma parte real, x , e uma parte imaginária, iy , ou uma amplitude, $|z|$, e uma fase, ϕ , e pode ser expresso por meio da Equação 1.3, 1.4 ou ainda 1.5.

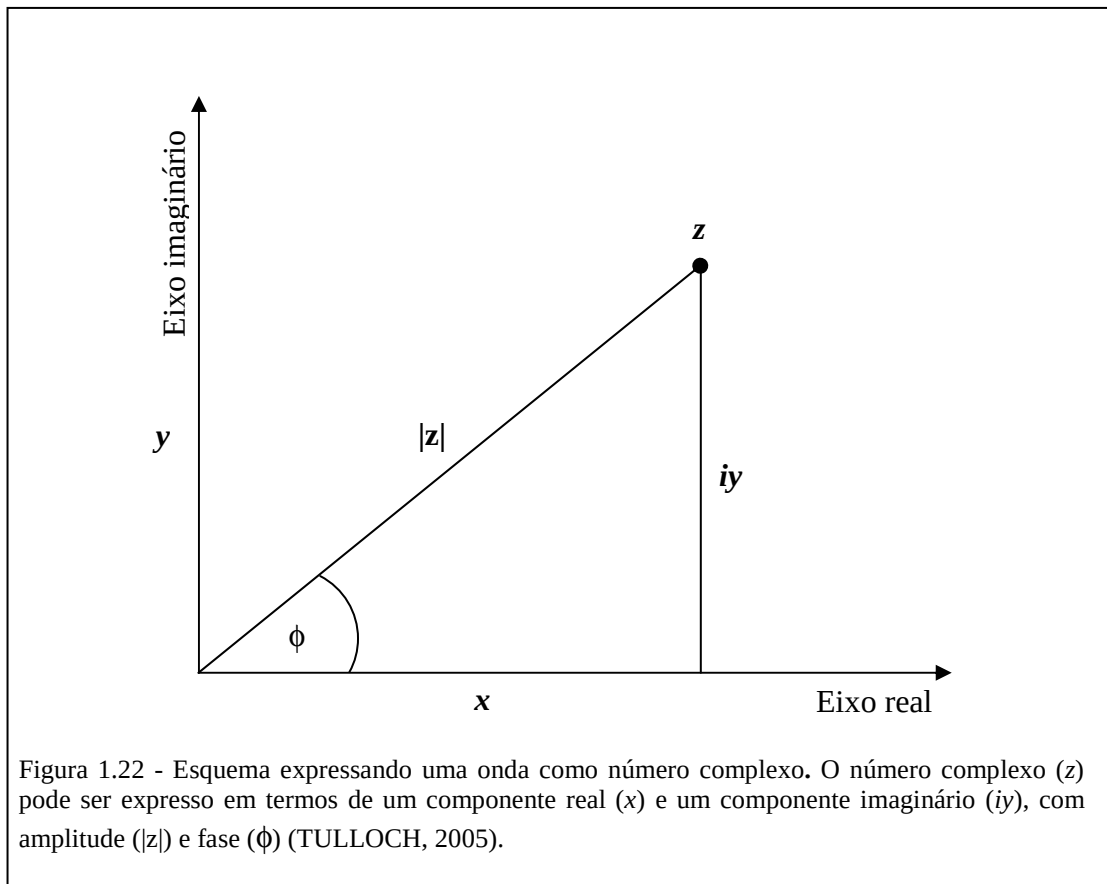
$$z = x + iy \quad \text{Equação 1.3}$$

$$= |z| (\cos \phi + i \sin \phi) \quad \text{Equação 1.4}$$

$$= |z| e^{i\phi} \quad \text{Equação 1.5}$$

Onde i é a raiz quadrada de -1. A vantagem de se expressar as ondas como números complexos é que podem ser facilmente somados ou multiplicados.

Sucintamente, a difração explica-se da seguinte maneira: quando um raio X atinge um elétron, o raio X é absorvido pelo elétron, fazendo com que esse vibre na mesma frequência que o raio X (BLOW, 2003). O elétron então emite um raio X idêntico àquele absorvido em praticamente todas as direções. Da mesma forma, um grande número de raios X (de onda incidente) que atingem um grande número de elétrons resultará em um espalhamento de raios X em todas as direções. As ondas de raio X espalhadas têm o mesmo comprimento de onda que a onda do incidente, e desde que aquelas espalhadas em todas as direções não se apresentem em fase uma com as outras, elas se cancelam. Todavia, quando em certas circunstâncias, as ondas espalhadas numa mesma direção têm a mesma fase, são amplificadas em pontos discretos em um padrão de difração (HELLIWELL, 1992).



1.6.2.2 Lei de Bragg

Um cristal de proteína é composto de repetidas unidades (as celas unitárias), as quais são empilhadas em três dimensões (GIACOVAZZO et al., 1992). Os vértices da cela unitária são relacionados através de séries de planos paralelos (planos do retículo ou planos de Bragg) que podem ser imaginados como espelhos que refletem os raios X. Quando os raios X refletem fora dos planos do retículo, eles estão geralmente fora de fase e se cancelam. Quando o ângulo de onda incidente é igual ao ângulo de reflexão, as ondas paralelas que atingem os planos do retículo em fase são também refletidas em fase (Figura 1.23a) (HELLIWEL, 1992). As ondas dos raios incidentes que estão em fase na posição **ab** são refletidas em fase na posição **bc** porque a distância de **a-c** = **b-d** e as ondas têm exatamente o mesmo comprimento

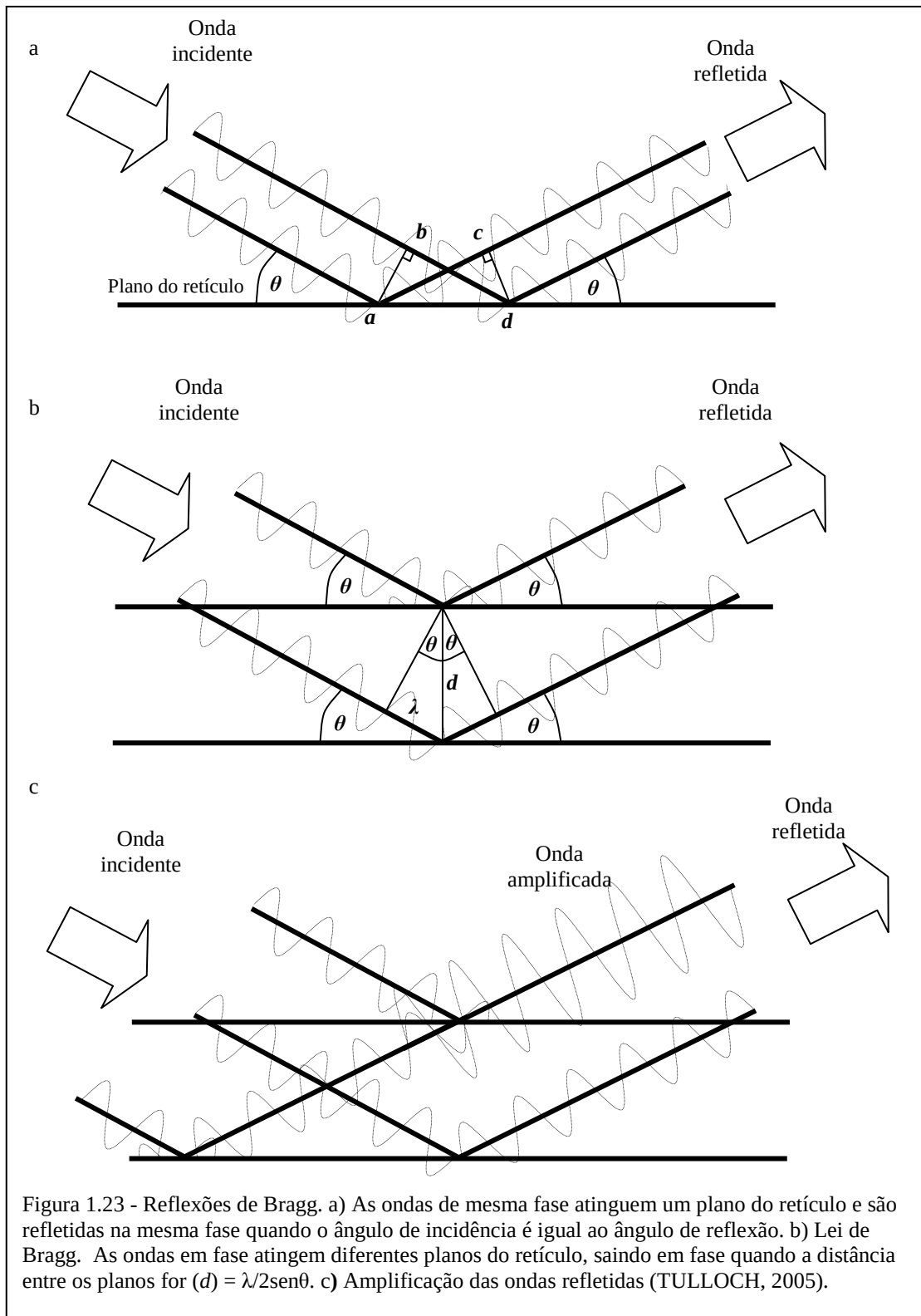
de trajetória. Assim, as ondas incidentes que estão em fase são refletidas em fase umas com as outras quando elas têm exatamente o mesmo comprimento de trajetória.

A maioria das ondas refletidas que têm comprimento de trajetória diferente estão geralmente fora de fase. Como a figura 1.23b mostra, é possível então elas estarem em fase uma com a outra quando a diferença de comprimento de trajetória delas for igual a um número inteiro de comprimento de onda (quando $2l = \text{um número inteiro}$). A lei de Bragg (Equação 1.6) mostra que, para que estas condições sejam encontradas, a distância entre os planos do retículo (d) está relacionada ao comprimento de onda (λ) e ao ângulo de incidência e de reflexão da onda (θ) (BLOW 2003; HELLIWELL 1992; STOUT e JENSEN 1989).

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad \textbf{Equação 1.6}$$

$$d = n \lambda / (2 \sin \theta) \quad \textbf{Equação 1.7}$$

Os cristalógrafos de proteína estão interessados nas distâncias entre planos do retículo e a lei de Bragg é frequentemente rearranjada para fazer de d o objeto da equação (Equação 1.7). A equação mostra que para que as ondas existam em fase a distância mínima entre planos do retículo é a metade do comprimento de onda, destacando a necessidade de um comprimento de onda curto (raios X) para a determinação de estruturas cristalinas protéicas. As equações mostram também que à medida que as distâncias entre planos adjacentes do retículo diminuem, o ângulo de incidência deve aumentar para que as ondas fiquem em fase.



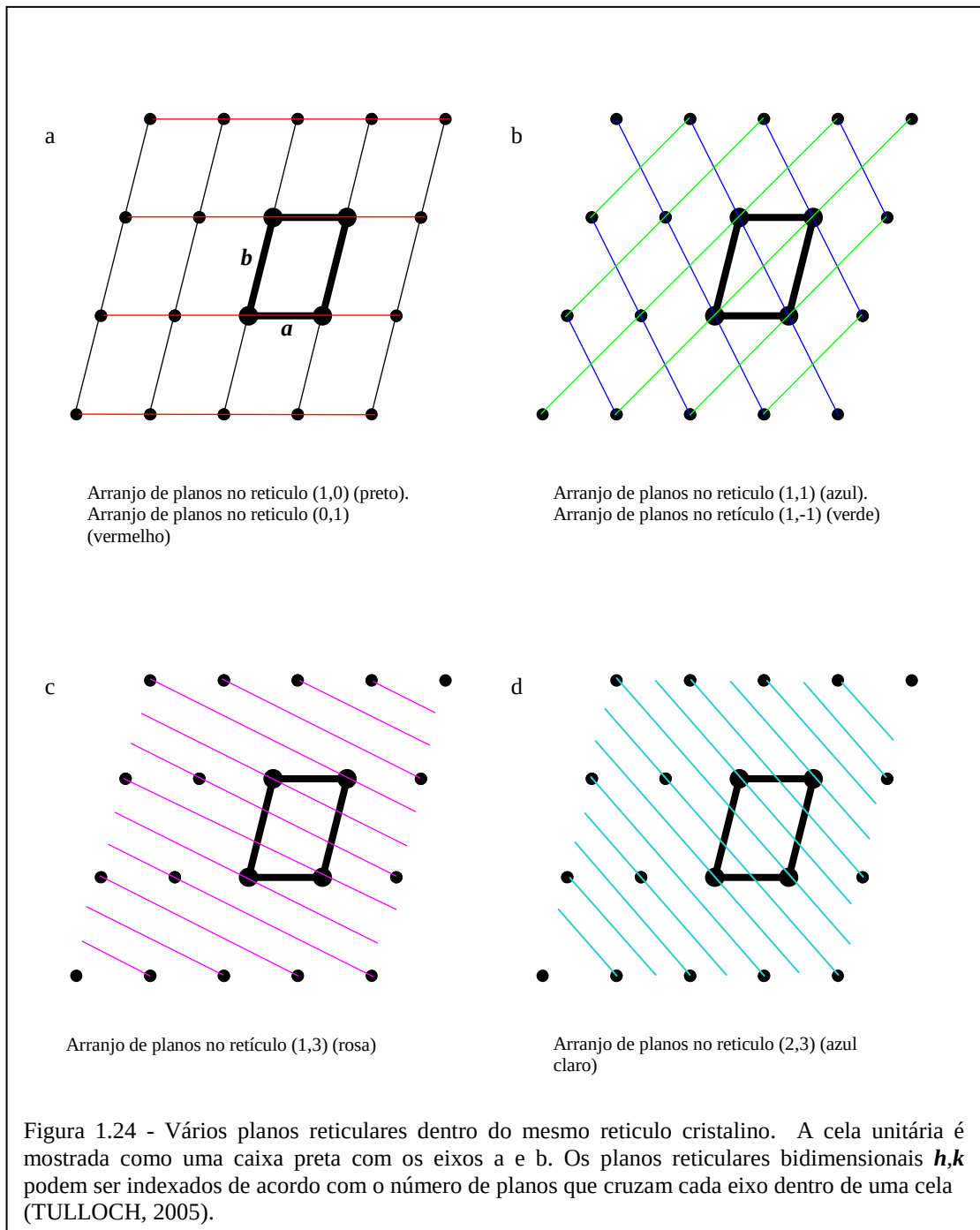
1.6.2.3 *Retículos Planos e Índices de Miller*

Os cristais contêm vários diferentes grupos de planos reticulares que são capazes de refletir os raios X (GIACOVAZZO et al., 1992). Os planos reticulares são planos que passam diretamente através dos pontos do retículo dentro do mesmo (Figura 1.24). Aqueles que conectam pontos adjacentes do retículo podem ser paralelos a uma ou mais arestas da cela unitária (Figura 1.24a) ou podem cruzar as celas unitárias diagonalmente através dos vértices das celas unitárias (Figura 1.24b). No primeiro caso, um exemplo bidimensional, os planos reticulares correm paralelamente ao eixo da cela (por exemplo, os planos vermelhos) nunca atravessando o eixo da cela (o eixo *a*), e somente um plano reticular passa pelo outro eixo (o eixo *b*) da cela unitária. Pela repetição de uma única cela unitária e de um único plano reticular dentro do restante dos pontos reticulares, todos os pontos reticulares serão cobertos com as celas unitárias e os planos reticulares.

Os planos reticulares bidimensionais podem ser indexados por índices de Miller (*h,k*) para mostrar o ponto fracionário por que passam em uma cela unitária (Equação 1.8) (BLOW, 2003). No caso em que os planos reticulares correm paralelamente à aresta da cela, nenhum plano cruza essa aresta da cela e o número correspondente a *h* ou *k* atribuído para o específico eixo da cela é 0, já que $1/0$ é infinito. Para os planos do retículo mostrados na Figura 1.24a, nenhum plano do retículo vermelho cruza o eixo *a* e somente um cruza o eixo *b* dentro de uma cela unitária, assim o grupo de planos reticulares vermelho são indexados por índices de Miller como $((1/0), (1/1))$ ou $(0,1)$. Os planos em preto correm paralelo ao eixo *b* nunca cruzando o eixo *b* e somente cruzando o eixo *a* uma vez dentro de uma cela unitária, identificando o conjunto de planos preto do retículo como $((1/1), (1/0))$ ou $(1,0)$.

((1 / planos através do eixo **a**), (1 / planos através do eixo **b**))

Equação 1.8



Planos que conectam diagonalmente pontos adjacentes do retículo através da cela unitária bidimensional cruzam ambos os eixos nos vértices da cela unitária (Figura 1.24b). Neste exemplo, somente um plano azul do retículo cruza o eixo **a** e somente um cruza o eixo

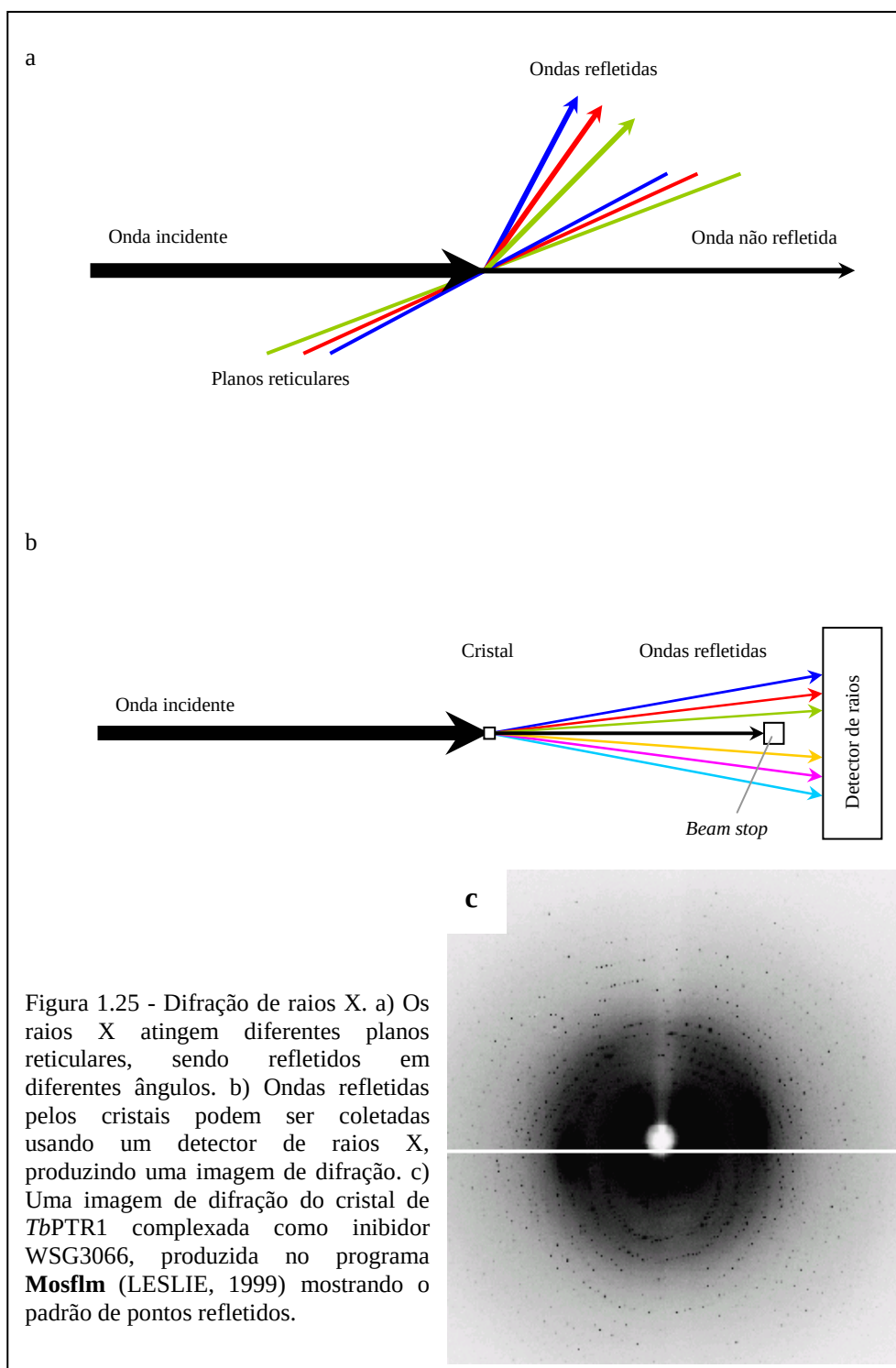
b dentro de uma cela e então o conjunto de planos azuis **h,k** são indexados como (1,1). O conjunto de planos verdes do retículo é similar, mas **h,k** são indexados como (1,-1) já que os planos do retículo correm em direções opostas.

Os planos reticulares não conectam somente pontos adjacentes do retículo, podem também conectar vários pontos reticulares de cela unitárias separadas (Figura 1.24c-d). Quando isto ocorre, muitos planos reticulares podem cruzar uma eixo da cela e são indexados **h,k** de maneira similar.

Os cristais de proteína são estruturas tridimensionais e seus pontos reticulares podem ser conectados por planos reticulares tridimensionais. Estes planos reticulares são similares aos bidimensional descritos acima, mas devem ser indexados no mínimo com um terceiro termo (**l**) para designar planos reticulares **h, k, l** (BLOW, 2003).

1.6.2.4 *O Padrão de Difração e a Cela Unitária*

Há muitos diferentes grupos de planos reticulares dentro de um cristal de proteína, cada um tendo um ângulo de orientação relativo diferente (Figura 1.25a); como são orientados em ângulos diferentes, as ondas refletidas de cada grupo de planos do retículo devem também serem refletidas em um ângulo diferente, para que estejam em fase (Figura 1.25b), e isto é o que causa o padrão de difração.



Um padrão de difração consiste em pontos discretos (também conhecidos como reflexões) arranjados de uma maneira peculiar. Cada ponto é o resultado da amplificação das ondas de raio X refletidas em fase para um único grupo de planos reticulares paralelos (Figura 1.25b). Enquanto um cristal gira em um feixe de raio X incidente, a orientação de cada um

dos planos reticulares move-se também com relação ao feixe de incidente. As ondas que são refletidas em fase mudam conseqüentemente assim como o respectivo grupo de planos reticulares enquanto o cristal gira, mudando as posições dos pontos (reflexões) em sucessivas imagens de difração (Figura 1.25c).

Como o padrão de pontos refletidos é diretamente relacionado às orientações dos planos reticulares e as orientações dos planos são diretamente relacionadas às dimensões da cela unitária, então, o padrão de pontos refletidos está também relacionado às dimensões da cela unitária (BLOW, 2003; STOUT e JENSEN, 1989). Cada ponto pode ser identificado por seus índices de Miller (***h, k, l***) e as distâncias entre os planos reticulares (espaçamento ***d***) podem ser calculadas pela distância entre os pontos e os respectivos ângulos de incidência (***θ***). As distâncias entre planos paralelos e perpendiculares aos eixos dão a dimensão da cela unitária.

1.6.2.5 *Intensidade dos Pontos no Padrão de Difração*

Apesar dos padrões de pontos de difração serem regulados pelas dimensões da cela unitária, as intensidades relativas dos pontos são reguladas pelas posições dos elétrons dentro da cela unitária (BLOW, 2003; STOUT e JENSEN, 1989). Os elétrons que se encontram nos mesmos planos reticulares espalham em fase um com o outro, aumentando a intensidade da reflexão (ou do ponto). Um ponto que tenha uma intensidade relativa grande indica que muitos elétrons se encontram neste grupo de planos reticulares gerando essa reflexão, enquanto um ponto com intensidade relativa baixa indica que poucos elétrons estão posicionados neste grupo de planos do retículo gerando essa reflexão. As intensidades relativas dos pontos são portanto o resultado da adição das ondas em uma direção particular e fornecem a informação a respeito das posições médias de todos os elétrons entre cada grupo de planos reticulares dentro do cristal.

1.6.2.6 Fatores de Estrutura e Transformada de Fourier

Cada ponto em um padrão de difração é produzido por uma onda (que é a soma das ondas refletidas por um grupo de planos reticulares) e pode conseqüentemente ser expresso como um número complexo, descrevendo a amplitude (a raiz quadrada da intensidade do ponto) e a fase (como na seção 1.6.2.1.2) (BLOW, 2003; HELLIWELL, 1992; STOUT e JENSEN, 1989). Temos, assim, a expressão do chamado fator de estrutura, que para cada reflexão é:

$$F(\mathbf{hkl}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i (\mathbf{h}x_j + \mathbf{k}y_j + \mathbf{l}z_j)] \quad \text{Equação 1.9}$$

onde f_j é chamado fator de espalhamento atômico e a somatória é feita com todos os j átomos (HELLIWELL, 1992). O fator de espalhamento diz respeito a quanto de radiação um átomo espalhará numa determinada direção. A equação acima é conhecida como uma transformada de Fourier porque é a soma de coeficientes de Fourier das ondas. Quando as fases (ϕ_{hkl}) são conhecidas bem como todas as amplitudes ($|F(\mathbf{hkl})|$) (calculada pelas intensidades dos pontos), é possível calcular o coeficiente de Fourier inverso das ondas como segue:

$$\rho(x,y,z) = (1/V) \sum_{hkl} \{ |F(\mathbf{hkl})| \exp(i\phi_{hkl}) \exp[-2\pi i (\mathbf{h}x_j + \mathbf{k}y_j + \mathbf{l}z_j)] \} \quad \text{Equação 1.10}$$

A equação acima é algumas vezes referenciada como equação de densidade eletrônica e este nome sugere que o coeficiente de Fourier inverso pode ser usado para calcular as coordenadas dos átomos dentro da cela unitária de um cristal usando a intensidade dos pontos e a respectiva fase (BLOW, 2003; HELLIWELL, 1992; STOUT e JENSEN, 1989).

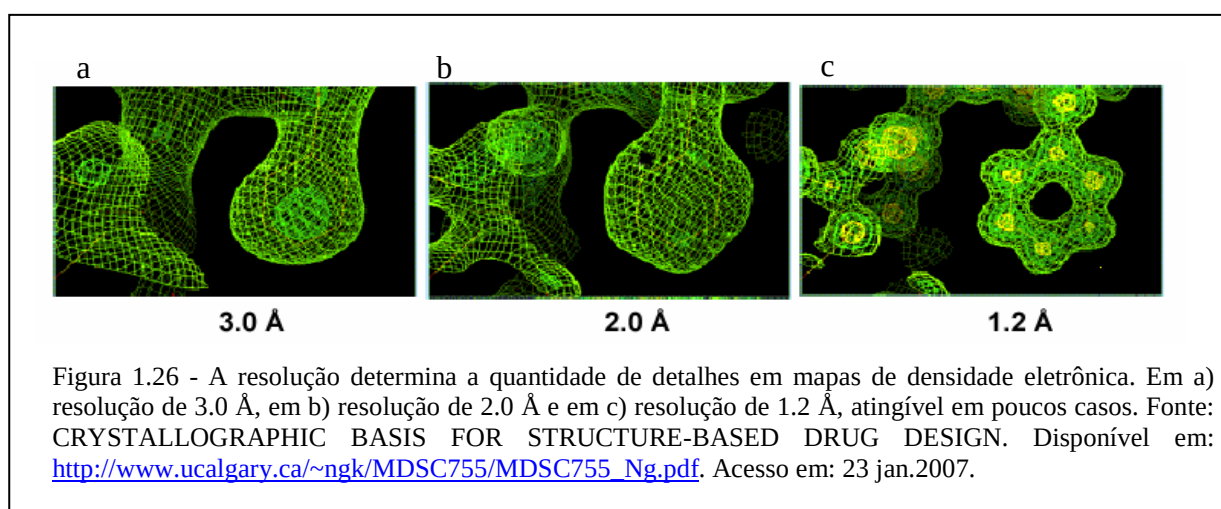
1.6.3 Coleta dos Dados de Difração

Antes do conjunto de dados poder ser coletado, para que a estrutura final da proteína possa ser deduzida, faz-se necessário montar um cristal no feixe de raios X de um difratômetro e verificar se ele difrata a uma resolução e qualidade suficientes para justificar a coleta completa de conjunto de dados. Um ensaio de coleta inicial pode ser realizado para determinar o grupo espacial do cristal e obter informações importantes para se planejar a coleta de dados (ROWLETT, 2005).

1.6.3.1 *Processamento dos Dados de Difração*

1.6.3.1.1 Resolução

As intensidades podem geralmente ser mensuradas até um certo limite de resolução, dado pela área do detector, a distância e a orientação deste em relação ao cristal, o comprimento de onda, os parâmetros da cela e a própria qualidade do cristal. Frequentemente, o objetivo é produzir mapas de densidade eletrônica da mais alta qualidade e a resolução estender-se tanto quanto possível (Figura 1.26) (BLOW, 2003).



1.6.3.1.2 Completeza

Idealmente, cada reflexão independente dentro da resolução escolhida deve ser incluída no cálculo do mapa de densidade eletrônica. Em quase qualquer orientação de um cristal em um eixo rotacional, algumas das reflexões requeridas são inacessíveis. Muito frequentemente, no mínimo duas orientações são usadas para obter uma cobertura total. Por outro lado, se o cristal tem alta simetria, haverá muitas reflexões relacionadas por simetria e então uma menor abrangência das orientações do cristal pode prover todas as reflexões únicas (reflexões necessárias para gerar um conjunto completo de reflexões pelas operações de simetria) (BLOW, 2003).

A completeza de um conjunto de intensidades de difração pode ser definida como o número de reflexões únicas mensuradas pelo número total de reflexões únicas. Expressa-se, todavia, mais comumente em porcentagem, multiplicando-se essa razão por 100. Frequentemente a completeza deve ser de 95% ou maior, se for menor que 95% para uma dada resolução, pode indicar que alguns problemas ocorreram durante a coleta de dados. Resumidamente, completezas menores que 60 % são pobres, 80-90 % são boas e maiores que 95 % são excelentes.

1.6.3.1.3 Redundância

O fator redundância ou multiplicidade da intensidade mensurada é definido como (BLOW, 2003) o número total de intensidades mensuradas dividido pelo número total de reflexões únicas mensuradas. Em outras palavras, a redundância ou multiplicidade mede o número de vezes em que o ponto de difração (ou o simetricamente equivalente) é medido.

1.6.3.1.4 R_{merge} ou R_{sym}

As diferenças entre as intensidade mensuradas simetricamente relacionadas podem ser usadas para calcular um fator R chamado R_{sym} ou R_{merge} . Se as intensidade mensuradas são acuradamente reprodutíveis, R_{sym} é pequeno. Qualquer erro aleatório ou sistemático na medida das intensidades aumentará o R_{sym} (BLOW, 2003). O R_{sym} é calculado pela Equação 1.11.

$$R_{\text{sym}} = \sum_{hkl} \frac{\sum_j |I_j(hkl) - [\bar{I}(hkl)]|}{\sum_j I_j} \quad \text{Equação 1.11}$$

onde $I_j(hkl)$ é uma das múltiplas medidas de intensidade do ponto de difração com índices de Miller hkl . R_{sym} pode ser entendido como o erro médio de uma intensidade medida comparado à intensidade média, promediado sobre o grupo de reflexões escolhidas.

R_{sym} varia fortemente com a resolução e é costumeiramente calculados para um pequeno número de faixas de resolução (conhecidas como *shells* ou *bins*), em outras palavras, R_{sym} determina a confiabilidade dos dados medidos.

1.6.3.1.5 Relação sinal / ruído, $I/\sigma(I)$

Dá a qualidade dos dados medidos em relação ao desvio padrão estimado. Normalmente é expresso como a razão da intensidade média pelo desvio padrão estimado médio dentro de uma faixa de resolução. A razão $\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$ é freqüentemente abreviada para $I / \sigma(I)$ (BLOW, 2003).

1.6.3.1.6 Wilson Plot

O fator de temperatura global B que mensura o efeito de desordem no cristal, em princípio em razão da vibração térmica, pode ser estimado usando um método onde as intensidades são divididas dentro de uma série de *shells* de acordo com a resolução $d [= \lambda / (2 \sin \theta)]$ sendo a intensidade média $\bar{I}$ calculada em cada shell. A variação da intensidade média com a resolução é comparada com a variação do f protéico médio pela comparação das duas médias $\bar{I}$ e $\bar{f}^2$. Um gráfico é desenhado de $\log_e (\bar{I} / \bar{f}^2)$ contra $(\sin \theta / \lambda)^2$. Idealmente esse gráfico dá uma linha reta com uma inclinação igual a $-B$ (oposto do fator de temperatura global). Este gráfico é freqüentemente referenciado como Wilson Plot, mas deveria ser chamado de fator temperatura Wilson plot para evitar confusões com outro tipo de Wilson plot (BLOW, 2003).

1.7 Resolvendo o Problema das Fases

1.7.1 O Problema das Fases

Quando uma lente é usada para redirecionar a luz difratada de um pequeno objeto, uma imagem maior do objeto será formada; a lente é capaz de fazer isso sem afetar as propriedades das ondas de luz (comprimento de onda, amplitude e fase) (BLOW, 2003). Como lentes que redirecionam os raios X para um ponto focal não existem, detectores de raios X devem ser usados para capturar os raios X difratados por um objeto pequeno (tal como um cristal da proteína). Quando os raios X monocromáticos (raios X de um comprimento de onda único e fixo) são usados para estudos de difração, o comprimento de

onda refletida é conhecido já que são de mesmo comprimento de onda da onda incidente. As intensidades de cada um dos pontos em um padrão de difração são relativo às amplitudes de cada um dos raios X que geram os pontos, então, pelo cálculo das raízes quadradas dos intensidades dos pontos, as amplitudes das ondas refletidas são também conhecidas. A única outra informação requerida para a reconstrução da estrutura molecular dentro de um cristal de proteína são as fases das ondas que atingem o detector de raios X. Os raios X viajam à velocidade da luz (cerca de $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-2}$) e já que eles são de comprimento de onda curto ($\sim 1 \text{ \AA}$ ou $\sim 1 \times 10^{-10} \text{ m}$), eles se movimentam em $\sim 3 \times 10^{-19} \text{ s}$ de ponto a ponto (BLUNDELL e JOHNSON, 1976). É, conseqüentemente, impossível medir diretamente as fases dos raios X difratados, então, métodos indiretos para obtê-las devem ser adotados (DRENTH, 1994; McREE, 1999). Há três métodos principais para resolução do problema das fases: substituição molecular (MR), substituição isomórfica múltipla (MIR) e dispersão anômala múltipla (MAD) (DRENTH, 1993).

1.7.1.1 *Substituição Molecular (MR)*

A estrutura desconhecida de uma proteína pode ser resolvida por substituição molecular quando a estrutura de uma proteína homóloga é conhecida e as duas estruturas são na maior parte muito parecidas. O processo funciona usando-se a estrutura conhecida como um modelo inicial para que as fases possam ser calculadas, acopladas às intensidades de difração observadas para a proteína desconhecida (BLOW, 2003). Entretanto, o modelo inicial deve primeiramente ser posicionado corretamente dentro da cela unitária tridimensional de modo que as fases possam ser calculadas. O posicionamento do modelo tridimensional é decomposto em dois componentes: uma função de rotação que envolve uma

rotação tridimensional da molécula na orientação correta e uma função da translação que envolve uma translação tridimensional do modelo orientado na posição correta.

1.8 Refinamento de estrutura protéicas

Uma vez que o problema das fases tenha sido resolvido, o passo seguinte é o refinamento da estrutura cristalográfica. É necessário refinar o modelo de modo a ajustá-lo melhor às observações cristalográficas, porque os fatores de estrutura calculados $F(hkl)$ (na Equação 2.10) para o modelo inicial ainda são um tanto distantes dos fatores de estrutura observados. Isto significa que o inverso da transformada de Fourier para os fatores de estrutura (Equação 2.11) gerará uma densidade eletrônica em posições ainda um tanto “erradas”. A medida que os átomos são movidos às posições melhores durante o refinamento, as fases calculadas do modelo estarão mais próximas das fases reais das ondas difratadas e a densidade eletrônica melhorará.

Em outras palavras, o processo de refinamento tem como um dos objetivos trazer os valores de F_{calc} o mais próximo possível de F_{obs} , variando-se as coordenadas atômicas e o fator de vibração térmica B entre outros parâmetros. Sob o ponto de vista computacional, o problema do refinamento é um problema de otimização não-linear. Existem vários métodos de refinamento: por mínimos quadrados, gradiente conjugado, recozimento simulado, máxima probabilidade, etc...

1.8.1 Os indicadores R e R_{free}

Um fator residual (fator R) é usado para medir o ajuste *goodness* de uma estrutura de proteína aos dados do difração; ele deriva da comparação entre as diferenças entre fatores de estrutura observados ($|F_{\text{obs}}|$) e os fatores de estrutura calculados ($|F_{\text{calc}}|$) (Equação 1.12). Uma estrutura que ajusta os dados de difração bem, terá um fator R próximo a zero (ou 0 %), enquanto que uma estrutura sem nenhuma correlação com dados de difração terá um fator R em torno de 0,59 (ou 59 %). Assim, um dos objetivos do refinamento é reduzir o valor do fator R tanto quanto possível de modo a melhor ajustar a estrutura aos dados de difração (BLOW, 2003).

$$R = \frac{\sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum_h |F_{\text{obs}}|} \quad \text{Equação 1.12}$$

Quando usa-se somente um fator R para o refinamento da estrutura, é possível que os ajustes dos dados realizem um abaixamento artificial no valor de R e, nesses casos, o modelo da proteína pode conter muitos erros. Para impedir que isso ocorra, tornou-se rotineiro separar aleatoriamente de 5 a 10 % dos dados de reflexão num conjunto a parte que não é utilizado no refinamento e com este calcular um fator R que é conhecido como R_{free} (BRUNGER, 1992). Esta forma de auto-validação permite o refinamento imparcial e aumenta a probabilidade de que o modelo esteja mais correto a cada ciclo de refinamento.

1.9 Validação do Modelo

A validação é uma etapa essencial que pode ser executada em diferentes níveis de organização estrutural. Deve-se avaliar a qualidade do empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estereoquímicos (JOHNSON et al., 1994).

1.9.1 Validação Geométrica

Logo que o processo refinamento/modelagem é finalizado, a avaliação de cada modelo é feita utilizando programas como **Procheck** (LASKOWSKI et al., 1993), **Whatcheck** (HOOFT et al., 1996), **Verify3d** (BOWIE et al., 1991; LUTHY et al., 1992) e **X-plor** (BRÜNGER, 1992). Algumas das funções dos programas **Procheck** e **Whatcheck** são: (i) determinar erros grosseiros nas estruturas, tais como cadeias laterais deslocadas, (ii) checar anormalidades locais da estereoquímica e (iii) produzir critérios para a qualidade estereoquímica global. O **Whatcheck** oferece informações sobre a formação de regiões centrais hidrofóbicas, a acessibilidade de resíduos e átomos a moléculas de solvente (água), a distribuição espacial de grupos iônicos, a distribuição das distâncias atômicas e das ligações de hidrogênio da cadeia principal para cada modelo. Portanto, ele retrata a estereoquímica, comprimentos de ligações, ângulos diedros, entre outras quantidades na forma de um relatório gerado no formato de arquivo “pdf”. O **Procheck** (LASKOWSKI et al., 1993), além de avaliar os comprimentos 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, fornece um gráfico de Ramachandran. (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968). O gráfico de Ramachandran é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis no tocante aos ângulos ϕ/ψ e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas (SANTOS FILHO; De ALENCASTRO, 2003).

1.9.2 Validação na Densidade eletrônica

O valor do residual no espaço real (RSR) foi introduzido por JONES et al., 1991. É obtido a partir de dois mapas, um “observado” (um mapa ponderado pelo índice SIGMAA (READ, 1986) produzido com os coeficiente $2 \text{ m F}_{\text{obs}} - D \text{ F}_{\text{calc}}$ e com as fases calculadas) e um “calculado” (um genuíno mapa de F_{calc}). Para cada resíduo, todos os valores de densidade dentro de uma certa distância (ou raio) de qualquer dos seus átomos constituintes são comparados em ambos os mapas. O valor de R no espaço real é então definido como:

$$RSR = \frac{\sum |\rho_{\text{obs}} - \rho_{\text{calc}}|}{\sum |\rho_{\text{obs}} + \rho_{\text{calc}}|} \quad \text{Equação 1.13}$$

Onde a soma estende-se para todos valores de densidade considerada. O raio que é usado depende da resolução do conjunto de dados, se a resolução é menor que 0,6 Å, o raio usado é 0,7 Å, se a resolução está entre 0,6 e 3,0 Å, o raio utilizado é $\{0,7 \text{ Å} + [(\text{resolução} - 0,6 \text{ Å}) / 3,0]\}$ e se a resolução for maior que 3,0 Å, o raio utilizado é $0,5 \times \text{resolução}$.

O valor do coeficiente de correlação do espaço real (RSCC), é calculado similarmente ao valor de R, exceto pelo fato de que o coeficiente de correlação linear entre a duas densidades é calculado. O valor estará sempre entre -1.0 (anti-correlação perfeita) e +1.0 (correlação perfeita). O coeficiente de correlação tem a vantagem de que a densidade calculada e a observada não precisa ser escalonadas conjuntamente. Uma pequena desvantagem é que uma densidade fraca que tenha uma distribuição de intensidade adequada levará a um valor alto de RSCC.

1.10 Busca de Novos Ligantes Inibidores

No passado, o sucesso na identificação de novas drogas foi mais por acaso do que por desenho racional e o mecanismo de ação da droga raramente era conhecido (KUBINYI 1999; RATTI e TRIST, 2001). Os avanços tecnológicos recentes têm aumentado o conhecimento dos organismos biológicos ao nível molecular e atômico, permitindo uma nova abordagem, o desenho racional de drogas (Figura 1.7).

1.10.1 Desenho de Drogas Baseado em Estrutura (SBDD)

As estruturas 3D de novas proteínas alvo relevantes terapeuticamente estão se tornando disponíveis numa razão crescente através da determinação de estruturas por cristalografia por raios X, RMN ou por modelagem molecular comparativa. Alguns necessidades são a identificação da localização do sítio ativo nessas estruturas e a possível geometria do ligante nesses sítios. Uma das metas a se alcançar dentro do processo é a classificação de uma série de ligantes relacionados em termos de sua afinidade ou de sua energia livre de ligação tão precisamente quanto possível (FOSTER, 2002).

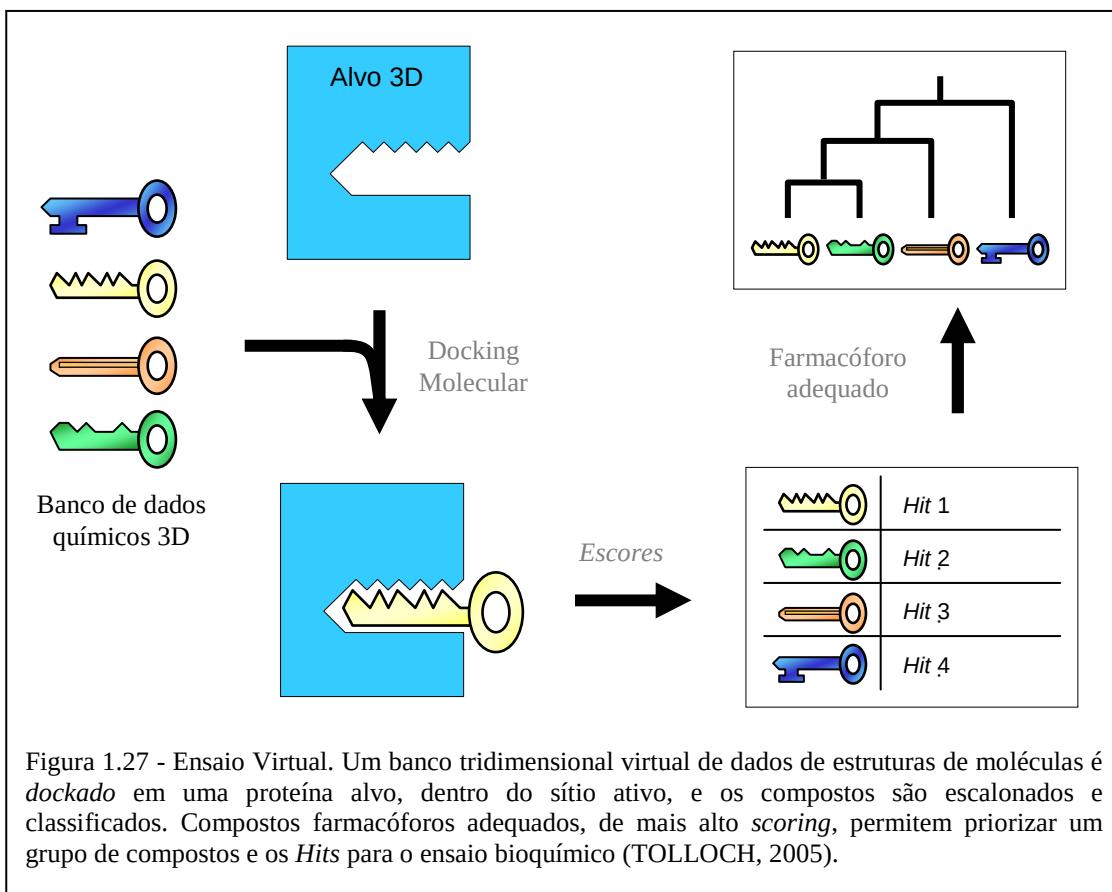
1.10.1.1 *Método Baseado em Ensaio Virtual*

1.10.1.1.1 Docking Tridimensional Molecular

Devido ao crescimento do conhecimento estrutural, os experimentos de *docking* estão se tornando cada vez mais importantes no desenho racional de drogas. Realizando um ensaio

virtual em bancos de dados de ligantes por métodos computacionais pode inclusive levar à identificação de novos alvos terapêuticos, além das moléculas ligantes.

O *docking* de ligantes a um receptor, tal como uma proteína, é uma das mais importantes técnicas utilizadas em conjunto com a modelagem molecular em biologia estrutural. Se a estrutura do receptor é conhecida, então a aplicação é essencialmente de um desenho de droga baseado em estrutura (FOSTER, 2002). É possível, assim, selecionar computacionalmente compostos, permitindo uma rápida identificação de tipos de moléculas que interagem com a proteína alvo sem a realização de bioensaios em larga escala (HTS) *High-Throughput Screening* (LYNE, 2002; WALTERS; STAHL; MURCKO, 1998) (Figura 1.27). Grandes bibliotecas químicas virtuais foram desenvolvidas e estão prontamente disponíveis (ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening (IRWIN e SHOICHET, 2005) para a seleção virtual dos compostos. A seleção virtual envolve acoplar ou *dockar* cada ligante de uma biblioteca virtual no sítio tridimensional receptor da proteína e classificar esses compostos para avaliar quão bons são esses ligantes à proteína (Figura 1.27). A classificação dos compostos separa aqueles que são estimados se ligar bem ao alvo daqueles que não se ligam, destacando candidatos apropriados para o ensaio bioquímico. Há numerosos pacotes de software de ensaios virtuais disponíveis e cada um difere na maneira que identifica, marca ligantes e em sua qualidade de combinação de escores para a seleção virtual de alto rendimento (LYNE, 2002)



1.10.1.1.1 Flexibilidade do Ligante

As moléculas absolutamente não são objetos rígidos. Podem girar suas ligações para interagir com outras moléculas, tais como proteínas, e é conseqüentemente necessário incluir a flexibilidade do ligante ao conduzir a seleção virtual.

A construção incremental, usado pelo programa **Dock** (EWING et al., 2001) e por **FlexX** (RAREY; WEFING; LENGAUER, 1996), envolve quebrar os compostos em pequenos fragmentos rígidos e reconstruí-los dentro da proteína receptora. Somente as conformações de baixa energia são utilizadas durante reconstrução dos ligantes.

Slide (SCHNECKE e KUHN, 2000) usa o método conformacional dos ensembles para a flexibilidade do ligante. Com este sistema, as conformações diferentes de cada ligante são pré-calculadas e orientadas para se sobreporem a um fragmento rígido comum. Todos os

conformeros dos ligantes são *dockados* simultaneamente como grupos, mas os escores são classificados de acordo com as melhores conformações.

Dois programas que abrangem o uso do sistema de flexibilidade do ligante e de busca exaustiva são **Glide** (SCHULZ-GASCH e STAHL, 2003) e **Dock** (EWING et al., 2001), porém, são computacionalmente intensivos.

O sistema de Monte Carlo para a flexibilidade do ligante é uma abordagem simulada de recozimento *annealing* usada por **QXP** (McMARTIN e BOHACEK 1997). Este sistema simula um aquecimento dos ligantes e, como ele permite um vagaroso resfriamento, dá forma a conformações energéticas mais favoráveis dentro da proteína receptora. Os métodos simulados de recozimento *annealing* frequentemente consomem mais tempo e são conseqüentemente inadequados para a seleção virtual de alto rendimento, mas podem ser eficazes para a seleção e modelagem em pequena escala.

O problema da flexibilidade do ligante no programa **eHits** (ZSOLDOS et al., 2006a) é dividido em dois problemas: busca de posição/conformação e a função de *scoring*. Para o sucesso da seleção virtual de alto rendimento, o algoritmo de busca deve ser rápido para encontrar a mais adequada posição e a conformação do ligante. O programa **eHits** é um exaustivo método de flexibilidade e *docking*, que sistematicamente cobre a parte conformacional e otimiza a posição evitando choques estéricos severos, produzindo posições altamente acurado em uma velocidade prática para a seleção virtual de alto rendimento *virtual high-throughput screening* (VHTS) (ZSOLDOS et al., 2006a).

1.10.1.1.1.2 Flexibilidade da Proteína

A ligação dos ligantes à proteína faz com que quase sempre a proteína altere sua forma tridimensional. As cadeias laterais da proteína movem-se geralmente para interagir com os

ligantes e, às vezes, a cadeia principal adota uma posição muito diferente. A flexibilidade da proteína é geralmente omitida da seleção virtual, pois além de ser computacionalmente intensiva, também consome muito tempo para considerar a flexibilidade da proteína, adicional à flexibilidade do ligante, sendo, portanto os ligantes *dockados* em uma estrutura cristalográfica rígida (EWING et al., 2001). Uma tentativa, contudo, de procurar levar em consideração aspectos de flexibilidade da proteína, é incluir os valores dos fatores de vibração térmica B desta durante o *docking*, como é feito no programa **eHiTS** (ZSOLDOS et al., 2006a).

1.11 Objetivos do Trabalho

O objetivo geral com efeitos de longo termo é a geração de informação estrutural que assistirá ou guiará o desenvolvimento de novas terapias contra a infecção por tripanossomatídeos. Especificamente, os objetivos alcançados de imediato são:

- i) Cristalização de diversos inibidores ligados à *TbPTR1*;
- ii) Caracterização e resolução das estruturas de inibidores ligados à *PTR1*;
- iii) Mapeamento do sítio ativo da enzima e caracterização das interações enzima-ligante usando métodos computacionais;
- iv) Identificação de várias outras moléculas, similares e não similares aos ligantes cristalizados, com potencial de inibição

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Expressão e Purificação da TbPTR1

A enzima TbPTR1 expressa e purificada foi gentilmente cedida pelo pesquisador Lindsay Brian Tulloch.

A estratégia utilizada por DAWSON et al. (2006) para a expressão e purificação da TbPTR1 encontra-se resumida a seguir. O gene *ptr1* de *Trypanosoma brucei* S427 (MITat1.4) foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos e posteriormente clonado no vetor pET15b, gerando o plasmídeo pET15b_TbPTR1. Após a verificação da integridade da sequência do gene, a proteína TbPTR1 foi superexpressa fusionada a cauda de histidina na região N-terminal em células de *E. coli* BL21(DE3). A proteína de interesse foi isolada por cromatografia em coluna de afinidade utilizando metal imobilizado, utilizando-se gradiente de imidazol 0 - 480 mmol / L em tampão Tris-HCl, pH 7,5 (50 mmol / L) contendo NaCl (250 mmol / L). As frações contendo a proteína TbPTR1 foram identificadas por SDS-PAGE, combinadas, dialisadas durante a noite contra 20 mmol / L de Tris-HCl pH 7,5 e então a proteína foi concentrada a 20 mg / mL. A alta pureza da amostra foi confirmada com SDS-PAGE e espectrometria de massa MALDI-TOF e o rendimento da enzima estabelecido como aproximadamente 25 mg por litro de cultura bacteriana (DAWSON et al., 2006). A atividade enzimática foi inicialmente investigada com um ensaio espectrofotométrico já estabelecido, sendo conduzido a 30 °C em tampão fosfato de sódio 50 mmol / L pH 6,0 (BELLO et al., 1994).

2.2 Preparação e Cristalização de Complexos com a TbPTR1

2.2.1 **Preparação dos Complexos Proteína-Ligante**

A enzima *TbPTR1* já se encontrava expressa e purificada segundo o protocolo estabelecido por DAWSON et al., 2006. O trabalho iniciou-se com a cristalização da enzima *TbPTR1* complexada com diversos ligantes, a maioria inibidores, a fim de se determinar as estruturas cristalográficas desses complexos.

Os inibidores foram inicialmente caracterizados mediante ensaios realizados pelo pesquisador Lindsay Brain Tulloch de acordo com BELLO et al., 1994.

2.2.1.1 Experimentos de Cristalização

2.2.1.1.1 Preparação da Solução Proteína-Ligante

A preparação da solução da proteína com o ligante envolveu várias etapas:

a) Solução da proteína: separou-se uma alíquota de 50 μ L de solução de *TbPTR1* de concentração 20 mg / mL em 20 mmol / L de Tris-HCl pH 7,5 do freezer e descongelou-se em banho de gelo para uso único.

b) Solução *ligand mix*, sendo para o ligante folato preparada temporaneamente, seguiram-se as especificações sugeridas pelo Pesquisador Doutor Lindsay Brian Tulloch, tabela 2.1.

Tabela 2.1- Proporções relativas das soluções para preparação do *ligand mix*

Componentes	Massa Molar / (g / mol)	Concentração / (mmol / L)	
		Na solução-estoque	No <i>ligand mix</i> (1/3 da conc. estoque)
NADP ⁺	765,4	6	2
DTT	154,2	120	40
Folato (a) ou	441,4 (a) ou	6 (a) ou	2 (a) ou
Ligante (b) +	vários (b) +	18 (b) +	6(b) +
DMSO	78,52	6 % (V/V)	2 % (V/V)

Todas as soluções-estoque citadas na tabela 2.1 foram preparadas em água, exceto as de ligantes e folato que também continham DMSO na concentração de 6 % (V/V), como explicitado.

O *ligand mix* foi preparado (300 μL) misturando-se 100 μL de NADP^+ 6 mmol / L com 100 μL de ligante 6 mmol / L e 100 μL de DTT 120 mmol / L. As concentrações finais no *ligand mix* foram de 2 mmol / L, 2 mmol / L e 40 mmol / L, respectivamente, além do DMSO em 2 % (V/V). Após utilização, as soluções-estoque foi guardada a -20°C .

c) Preparação da solução de proteína-ligante: conforme esquema na Tabela 2.2. As proporções relativas dependem do volume final desejado para a gota de cristalização e da concentração final de proteína nesta. Os dois volumes finais de gota utilizados foram 3,0 e 4,5 μL e as duas concentrações de proteína na gota utilizadas foram 6 e 10 mg / mL.

Tabela 2.2- Representação esquemática das proporções entre várias soluções para chegar-se a concentrações e volumes desejados na gota de cristalização.

Concentração final de proteína na gota	6 mg / mL		10 mg / mL	
$V_{\text{final gota}} (V_{\text{poço}} : V_{\text{sol. prot-lig}}) / \mu\text{L}$	3,0 (1,5: 1,5)	4,5 (1,5: 3,0)	3,0 (1,5: 1,5)	4,5 (1,5: 3,0)
Proporções em volume para preparação da solução proteína-ligante				
$V_{\text{sol. tampão}} / \mu\text{L}$	10,40	56,40	2,10	47,90
$V_{\text{ligand mix}} / \mu\text{L}$	22,90	22,90	22,90	22,90
$V_{\text{sol. proteína}} / \mu\text{L}$	12,50	12,50	20,80	20,80
$V_{\text{total}} / \mu\text{L}$	45,80	91,60	45,80	91,60

O ligante foi misturado com a proteína ainda em solução, pelo método de co-cristalização. Inicialmente, concentrações de proteína de 6 mg / mL e volume final de gota de 3,0 μL foram testadas.

A preparação do complexo (solução proteína-ligante) foi realizada pela adição em *eppendorf*, da solução tampão tris-HCl 20 mmol / L pH=7,5, a solução de proteína e, por último, o *ligand mix*. A mistura ficou em gelo por 1 hora para que a ligação ligante-proteína efetivamente ocorresse. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos e as placas de cristalização foram montadas.

Os ligantes testados foram folato, melanina, 6-tioguanina, WSG1012, WSG1034, WSG3065, WSG3066, WSG3067.

2.2.1.1.2 Placas de Cristalização

Realizaram-se 312 ensaios de cristalização da enzima *TbPTR1* com diferentes ligantes, compreendendo a montagem de 13 placas de cristalização com 8 diferentes ligantes (a Tabela 2.3 mostra a relação total dos ligantes testados e os respectivos códigos de placas de cristalização).

Tabela 2.3- Placas de cristalização e os diversos ligantes testados

Placa de Cristalização	Ligante
J11	Melamina
J12	WSG3066
J13	WSG1012
J14	WSG1012
J15	WSG3066
J16	6-Tioguanina
J17	Folato
J18	Folato
J19	WSG3065
J110	WSG3067
J111	Folato
J112	6-Tioguanina
J113	WSG1034

Para a preparação dos poços das placas de cristalização (solução precipitante) foram utilizados as seguintes soluções estoque: a) soluções tampão de citrato a 100 mmol / L, variando o pH de 4,5 – 6,0; b) acetato de sódio 4,5 mol / L (precipitante). Proporções adequadas destes foram misturadas em cada poço, para concentração final de 10 mmol / L de tampão. O pH varia verticalmente nas placas com intervalo de 0,5 unidades e a concentração do precipitante varia horizontalmente nas placas entre 1,5 e 2,5 mol / L, com intervalo de 0,2 mol / L, exceção da placa JI11, na qual a concentração variou entre 2,0 e 3,0 mol / L. O volume final de solução no poço foi 1000 μ L.

Para que as placas tivessem essa variação de concentração, procedeu-se da seguinte forma: a cada coluna da placa adicionaram-se primeiramente os seguintes volumes de H₂O: coluna 1 - 567 μ L, coluna 2 - 522 μ L, coluna 3 - 478 μ L, coluna 4 - 433 μ L, coluna 5 - 389 μ L e coluna 6 - 344 μ L. Posteriormente, adicionaram-se os seguintes volumes da solução de precipitante acetato de sódio: coluna 1 - 333 μ L, coluna 2 - 378 μ L, coluna 3 - 422 μ L, coluna 4 - 467 μ L, coluna 5 - 511 μ L e coluna 6 - 556 μ L. Adicionou-se então volume constante de 100 μ L da solução de tampão citrato, porém, variou-se o pH horizontalmente: linha A pH 4,5, linha B pH 5,0, linha C pH 5,5, linha D pH 6,0. A única exceção foi a placa JI11, descrita abaixo.

As Figuras 2.1 e 2.2 ilustram o pH e a concentração final de acetato de sódio em cada poço de uma placa de cristalização.

	1	2	3	4	5	6
A	4,5-1,5	4,5-1,7	4,5-1,9	4,5-2,1	4,5-2,3	4,5-2,5
B	5,0-1,5	5,0-1,7	5,0-1,9	5,0-2,1	5,0-2,3	5,0-2,5
C	5,5-1,5	5,5-1,7	5,5-1,9	5,5-2,1	5,5-2,3	5,5-2,5
D	6,0-1,5	6,0-1,7	6,0-1,9	6,0-2,1	6,0-2,3	6,0-2,5

Figura 2.1 - pH - concentração final (em mol / L) do precipitante, nos vários poços (A1 a D6) das placas de cristalização, exceto a J11.

Porém, para o ligante folato, na placa JI11, montada de acordo com a otimização descrita abaixo após o fato de que as caixas de cristalização 7 e 8 não apresentaram cristais,

aumentou-se a concentração do precipitante. Portanto, para se alcançar as devidas concentrações (esquematizadas na Figura 2.2) adicionaram-se aos poços os seguintes volumes de H₂O: coluna 1 - 456 µL, coluna 2 - 411 µL, coluna 3 - 367 µL, coluna 4 - 322 µL, coluna 5 - 278 µL e coluna 6 - 233 µL. Posteriormente, adicionaram-se os seguintes volumes da solução de precipitante acetato de sódio: coluna 1 - 444 µL, coluna 2 - 489 µL, coluna 3 - 533 µL, coluna 4 - 578 µL, coluna 5 - 622 µL e coluna 6 - 667 µL. Não se alterou o volume de 100 µL de solução tampão citrato, usando-se ainda os mesmos pH's das outras placas: linha A pH 4,5, linha B pH 5,0, linha C pH 5,5 e linha D pH 6,0.

	1	2	3	4	5	6
A	4,5-2,0	4,5-2,2	4,5-2,4	4,5-2,6	4,5-2,8	4,5-3,0
B	5,0-2,0	5,0-2,2	5,0-2,4	5,0-2,6	5,0-2,8	5,0-3,0
C	5,5-2,0	5,5-2,2	5,5-2,4	5,5-2,6	5,5-2,8	5,5-3,0
D	6,0-2,0	6,0-2,2	6,0-2,4	6,0-2,6	6,0-2,8	6,0-3,0

Figura 2.2 - Esquema de preparação da placa de cristalização J111 do ligante folato, pH e concentração final (em mol / L) do precipitante nos vários poços (A1 a D6).

Após a preparação dos poços da placa de cristalização, realizou-se a montagem da gota suspensa.

2.2.2 Cristalização por Difusão de Vapor em Gota Suspensa

Os métodos de cristalização utilizados foram de difusão de vapor por gotas suspensas *hanging drops*, que consiste em misturar poucos µL's da solução precipitante do poço com poucos µL's da solução do complexo protéico (proporções listadas na Tabela 2.2) sobre uma lamínula de microscopia, sendo esta posteriormente vertida sobre o poço e selada hermeticamente com graxa de silicone, de modo que a difusão de vapor ocorra de forma satisfatória (McPHERSON, 1999). A montagem das placas de cristalização é ilustrada abaixo (Figura 2.3).

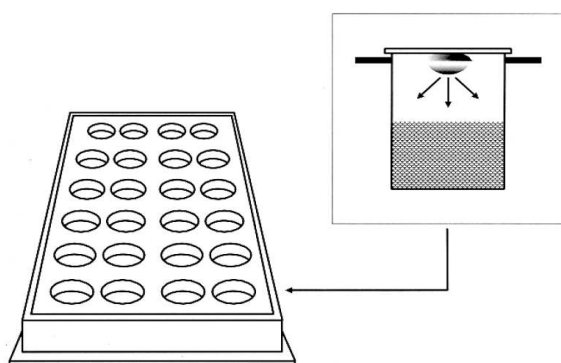


Figura 2.3 - Representação esquemática da montagem da gota suspensa na placa de cristalização. A esquerda: representação da difusão de vapor, para o cristal ser formado; a direita, a preparação de ensaios de cristalização.

Para a montagem da gota na placa de cristalização procedeu-se da seguinte maneira:

1. Pipetou-se 1,5 μL (ou 3,0 μL se necessário, segundo otimização) de solução proteína-ligante sobre uma lamínula de vidro redonda.
2. Posteriormente adicionou-se 1,5 μL da solução do poço sobre o qual a lamínula ficará, misturando 4 a 6 vezes a solução precipitante do poço com a proteína complexada, trocando a ponteira para cada gota feita sobre a lamínula de vidro. Procede-se da mesma forma para as demais 23 lamínulas a serem montadas sobre os respectivos poços.
3. Após o preparo da gota, a lamínula de vidro foi suavemente colocada sobre o poço com auxílio de uma pinça. Estes poços já continham uma camada fina de graxa de silicone sobre a borda, vagarosamente a lamínula foi empurrada sobre o poço, expelindo um pouco de ar, de modo obter um selamento hermético do poço contendo a gota e a solução precipitante.

A tabela 2.4 apresenta as fórmulas estruturais dos ligantes utilizados.

Tabela 2.4 - Fórmulas estruturais dos ligantes testados para cristalização

(continua)

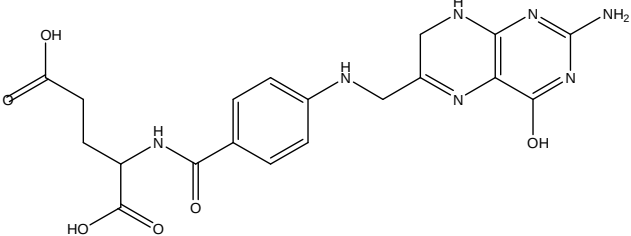
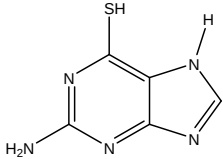
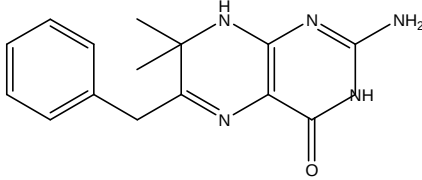
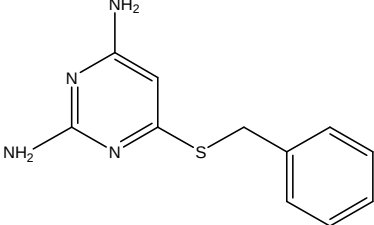
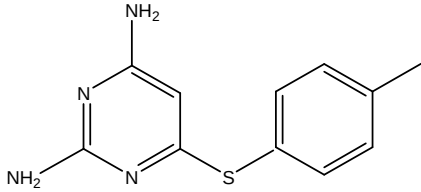
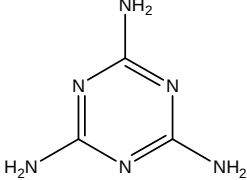
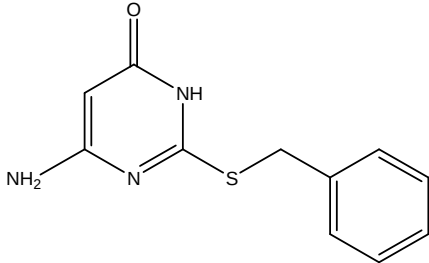
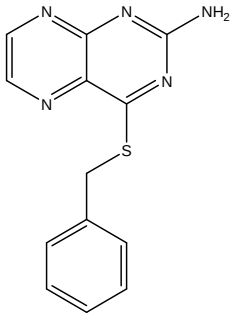
Ligante	Fórmula estrutural ou plana	Massa Molecular / Da
Folato		441,4
6-tioguanina		167,19
WSG1012		283,3
WSG3066		232,3
WSG3067		232,3
Melamina		126,12

Tabela 2.4- Fórmulas estruturais dos ligantes testados para cristalização
(conclusão)

Ligante	Fórmula estrutural ou plana	Massa molecular (Da)
WSG3065		233,3
WSG1034		285,3

As placas de cristalização foram mantidas por aproximadamente 1 mês em câmara de temperatura constante a 18 °C.

2.2.2.1 Avaliação das Placas

Periodicamente uma inspeção visual sob lupa foi realizada a fim de buscar cristais com morfologia e tamanho que permitissem o ensaio e posterior coleta completa de dados de difração de raios X.

As placas foram examinadas depois de um dia e a cada dia por uma semana, daí, a cada semana.

2.2.2.2 Otimização das Condições de Cristalização para Alguns Ligantes

Em alguns casos, não se obtiveram cristais satisfatórios nas primeiras tentativas.

Quando cristais satisfatórios não são obtidos, tenta-se uma ou mais das seguintes modificações:

- i) Aumento da concentração do precipitante a fim de forçar a proteína sair da solução (cristalização da *TbPTR1* com folato costuma requerer alta concentração de acetato de sódio);
- ii) Aumento da concentração da proteína para fazer um mais provável estado saturado;
- iii) Mudanças de pH na gota.

Apenas os dois primeiros procedimentos foram utilizados para o folato. Sem otimização, cristais não foram obtidos (placa JI7 - Tabela 2.3). Na placa JI11 a concentração precipitante das soluções do poço da placa (i) foi aumentada, como descrito anteriormente, e a concentração do complexo protéico (ii) foi aumentada de 6 mg / mL para 10 mg / mL (Tabela 2.2, última coluna à direita). A tentativa prévia utilizando a otimização (ii) foi insuficiente para obtenção de cristais, na placa JI8.

Para as placas JI12, JI4 e JI5 (Tabela 2.3) manteve-se a mesma concentração de proteína na gota (6 mg mL⁻¹), porém, o volume final da gota foi de 4,5 µL, sendo este formado pela mistura de 1,5 µL de solução do poço com 3,0 µL de solução de proteína-ligante (Tabela 2.2, terceira coluna à esquerda), já que em suas correspondentes anteriormente preparadas, placas JI6, JI3 e JI2 (Tabela 2.3), apenas pequenos cristais foram obtidos.

2.3 Coleta e Processamento dos Cristais de *TbPTR1*

2.3.1 Crioprotetor apropriado

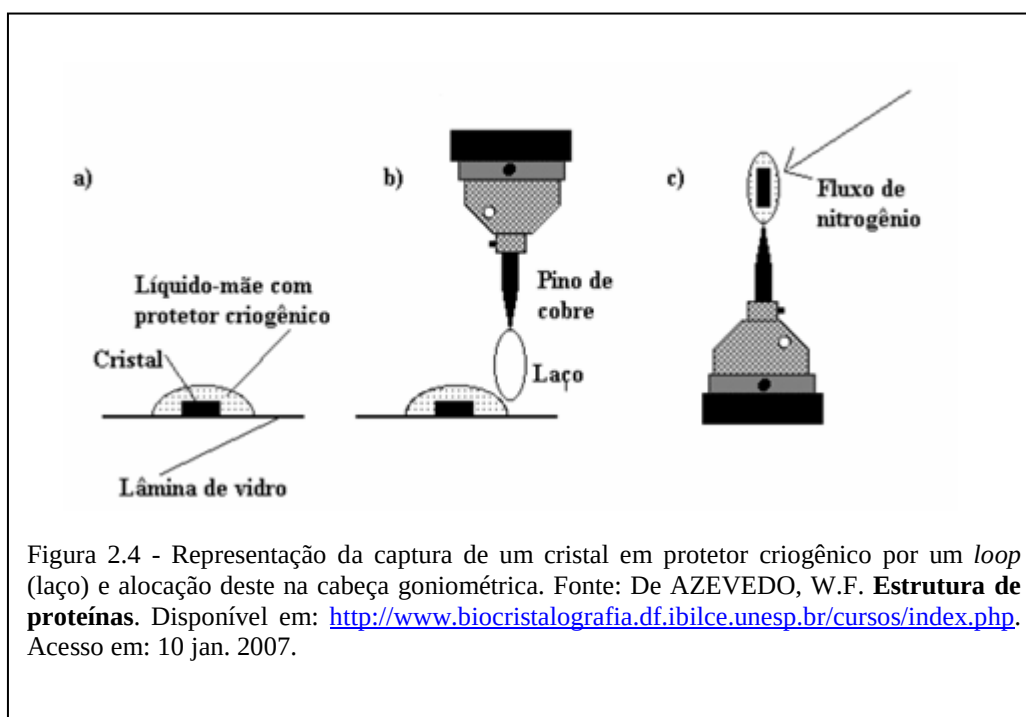
As coletas de dados de cristalografia de raios X foram realizadas a temperaturas baixas, tipicamente 100 K, sob feixe de nitrogênio resfriado (no difratômetro), para minimizar a degradação do cristal pelos radicais livres gerados, especialmente quando se usam fontes intensas de raio X tal como a radiação Síncrotron. A fim de impedir que os cristais trinquem

ao serem resfriados, foi necessário tratar-los com um crioprotetor. Este permite que o líquido-mãe que recobre a proteína e está dentro do cristal solidifique-se num estado amorfo, assim, os cristais sofrem danos minimizados, retendo as suas propriedades de difração (ROWLETT, 2005).

O crioprotetor utilizado nos ensaios de coleta para o complexo *TbPTR1* com ligantes, foi glicerol na concentração de 30% (V/V) adjunto à solução do poço (líquido- mãe).

2.3.2 Montagem do Cristal de Proteína no *loop*

Os cristais de proteína complexada foram montados para a difração em laços minúsculos de nylon entre 0,05 a 1,0 mm de diâmetro, denominados *loops*. Os *loops* são montados em hastes ocas que, por sua vez, são montadas em uma cápsula magnética para serem conectadas na cabeça goniométrica do difratômetro (Figura 2.4).



As placas de cristalização que continham cristais foram selecionadas e a gota em que o cristal seria capturado foi observado na lupa. Sem remover a lamínula, foi escolhido um *loop* de tamanho apropriado, compatível com o cristal selecionado. Procuraram-se aqueles de melhor morfologia externa, pois trata-se de um indício de uma estrutura interna ordenada, podendo ser bons difratadores. Posteriormente, foi aberta a lamínula que se encontrava selada sobre a solução do poço e capturou-se o cristal escolhido, tomando o cuidado de após a captura fechar novamente a lamínula sobre o poço.

Em seguida, o cristal foi embebido rapidamente na solução crioprotetora, colocado rapidamente na cabeça goniométrica do difratômetro sob o fluxo de nitrogênio que o resfria (Figura 2.4).

2.3.3 Coleta de Dados de Difração de Raios X

2.3.3.1 Ensaios de Difração dos Cristais

Foram realizados 44 ensaios de coleta, também denominados de *screening*. A tabela 2.5 mostra o número de ensaios, correspondendo ao número de cristais selecionados nas placas de cristalização dos complexos *TbPTR1* + ligantes (referenciados na tabela 2.3). Para os ensaios de coleta foi usado o difratômetro local pertencente a Universidade de Dundee, marca Rigaku modelo Micromax 007 com ânodo rotatório ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, 40 kV, 18 mA) e sistema detector de placa de imagem dual R-AXIS IV⁺⁺.

Tabela 2.5- Cristais ensaiados e suas respectivas placas de cristalização.

Placas de cristalização	Proteína + ligante	Número de cristais testados	Número de cristais resfriados para posterior coleta de dados
JI1	PTR1+ melamina	2	1
JI4	PTR1+ WSG1012	3	-
JI5	PTR1+ WSG3066	4	2
JI6	PTR1+ 6-tioguanina	5	-
JI9	PTR1+ WSG3065	2	1
JI10	PTR1+ WSG3067	2	1
JI11	PTR1+ folato	25	1
JI13	PTR1+ WSG1034	1	-
		Total=44	Total = 6

Ensaios foram realizados usando oscilações de 0,5 ° e com o tempo de exposição de 10 minutos por imagem, sendo normalmente duas imagens coletadas, uma a 0 ° e outra a 90 °.

Os cristais permaneceram estáveis aos raios X e aqueles que apresentaram pontos de difração intensos, bem definidos e de boa resolução, foram guardados em *Dewar* (contendo nitrogênio líquido) para posterior coleta completa (última coluna a direita da Tabela 2.5) no Síncrotron de Daresbury.

2.3.3.2 Coleta Completa dos Dados de Difração

A coleta completa foi realizada com radiação Síncrotron, pois os dados de difração da enzima complexada com diferentes ligantes precisam ser medidos a uma resolução tão alta quanto possível. Além disso, os benefícios de tal fonte envolvem a disponibilização de radiação com menores comprimentos de onda, reduzida absorção de raios X (conseqüentemente reduzido dano por radiação), reduzido espalhamento de fundo, melhor colimação e um feixe muito mais intenso, com tempos de exposição reduzidos.

A coleta dos cristais anteriormente ensaiados foi realizada no Síncrotron de Daresbury, (SRS – Synchrotron Radiation Source Daresbury Laboratory - Inglaterra) na estação B14.1,

comprimento de onda 1,488 Å, detector Quantum 4 ADSC, este com um único eixo axial de rotação (ϕ), e com um jato de 100 K de nitrogênio resfriado. Para a coleta utilizou-se 5 segundos de exposição com rotação de 1° para cada imagem, sendo coletado um total de 180°.

A tabela 2.6 mostra os cristais de complexos protéicos coletados e resoluções iniciais, referenciando as respectivas placas e gotas, bem como as resoluções alcançadas em alguns procedimentos de *annealing* realizados.

O *annealing* trata-se de um procedimento que consiste em bloquear por poucos segundos o fluxo de nitrogênio resfriado, permitindo, assim, um rearranjo das moléculas no estado cristalino, em muitos casos favorecendo uma reordenação deste estado. Assim, como consequência, pode-se observar pontos de difração mais fortes, menores e de melhor qualidade, inclusive podendo-se medir dados a maior resolução. Para o cristal JI5 realizou-se uma vez o *annealing* no SRS, com um tempo de 10 segundos de bloqueio do fluxo de nitrogênio, melhorando a resolução de 2,1 Å para 1,7 Å. Para os cristais JI9 e JI10 foram realizados três *annealing's* no difratômetro local da Universidade de Dundee, com um tempo de 10 segundos de bloqueio do fluxo de nitrogênio cada, passando a resolução de 2,3 Å para 1,7 Å e 2,4 Å para 1,6 Å, respectivamente.

Para o ligante folato JI11, também realizou-se o *annealing* no SRS, com um tempo de 10 segundos de bloqueio do fluxo de nitrogênio, porém houve danos ao cristal.

Esse procedimento, embora arriscado pela possibilidade de perda do cristal, revelou-se muito importante para a qualidade da coleta de dados dos complexos de TbPTR1, pois observou-se que a crioproteção necessária para resfriamento do cristal aumentava a mosaicidade e conduzia à perda de resolução, sendo esta restaurado, ao menos parcialmente, pelo *annealing*.

Tabela 2.6- Cristais que foram ensaiados no Síncrotron de Daresbury

Cristais das placas de cristalização	Ligante	Resolução (Å) Ensaio (<i>screening</i>)	Resolução posterior <i>Anneling</i> (Å)
JI11- poço D1	folato	2,20	-
JI5-poço C1	WSG3066	2,80	-
JI1- poço C3	melamina	2,20	2,20
JI5- poço A3	WSG3066	2,10	1,70
JI9-poço B2	WSG3065	2,30	1,70
JI10-poço A3	WSG3067	2,40	1,60

Os cristais cujos conjunto de dados de difração de raios X foram completamente coletados no SRS são mostrados na tabela 2.7.

Tabela 2.7- Conjuntos de dados coletados no SRS

Número do Conjunto de dados	Ligante	Resolução
1	WSG3065	1,70 Å
2	WSG3066	1,70 Å
3	WSG3067	1,60 Å
4	Melamina	2,20 Å

O conjunto de dados referente ao ligante melamina foi processado e refinado pelo Pesquisador Doutor Lindsay Brain Tulloch, da Universidade de Dundee, envolvido nos estudos estruturais e modelagem da *TbPTR1*. Os outros três conjuntos de dados referente aos cristais com os ligantes WSG3065, WSG3066 e WSG3067 (Tabela 2.7), somaram-se a outros dois conjuntos de dados anteriormente coletados pelo Pesquisador Doutor Lindsay Brain Tulloch (Universidade de Dundee) no Síncrotron de Grenoble (França), tratando-se da *TbPTR1* complexada com os ligantes triantereno e ciromazina, correspondendo a este trabalho então ao total de cinco diferentes estruturas de *TbPTR1* (quatro complexadas). Como a densidade eletrônica do ligante WSG3065 não foi encontrado nos mapas obtidos, esta estrutura foi denominada WSG3065_{ausente}.

2.3.3.3 *Análise dos Dados de Difração de Raios X*

Os três conjunto de dados coletados, anteriormente mencionadas, provenientes das placas JI5 - poço A3 (*TbPTR1* + WSG3066), JI9 - poço B2 (*TbPTR1* + WSG3065) e JI10 - poço A3 (*TbPTR1* + WSG3067) foram processados com os programas computacionais **Mosflm** (LESLIE, 1999) e **Scala** (Collaborative Computational Project nº 4) (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994).

Os outros dois conjuntos de dados de difração, correspondentes às estruturas de *TbPTR1* complexada com triantereno e ciromazina, foram processados com os programas computacionais **Xds** e **Xscale** (KABSCH, 1994), por serem estes mais adequados no caso de dados de imagens de menor qualidade.

Os programas / *softwares* utilizados no processamento das imagens de difração de raios X (**Mosflm** / **Scala** e **Xds** / **Xscale**), no refinamento e modelagem (**Refmac5**, **Coot**, **CNS**, **Phenix** – mencionados a seguir) e outros do pacote do **CCP4** são não comerciais, isto é, são gratuitos para uso acadêmico.

2.4 Substituição Molecular para Estruturas dos Complexos de *TbPTR1*

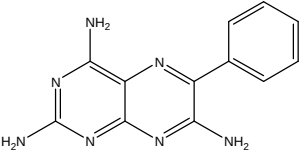
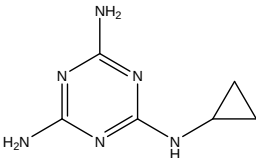
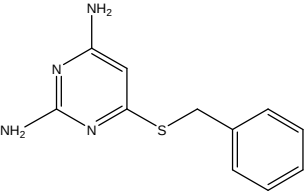
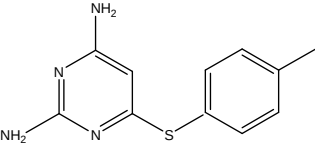
Como existia um modelo estrutural anteriormente para proteína *TbPTR1* (complexada com metotrexato) (DAWSON, et al., 2006), e como a cela unitária e o grupo espacial deduzidos dos padrões de difração coletados, foram os mesmos, provavelmente outras demais estruturas protéicas (*TbPTR1* complexada com os ligantes TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 e a WSG3065_{ausente}) estivessem na mesma posição. Assim, a estrutura da *TbPTR1* complexada ao metotrexato, foi utilizada como modelo para substituição molecular sem ligante e as águas, cada estrutura com seus respectivos ligantes foi refinada com o modelo para comprovar essa hipótese.

Posteriormente, a fim de retirar *bias* (isto é, tendenciosidade) da estrutura anterior, realizou-se um *annealing* computacional com o programa **CNS** (BRUNGER et al., 1998).

2.5 Refinamento das Estruturas de TbPTR1

Três conjunto de dados obtidos na coleta de dados no Síncroton em Daresbury (TbPTR1 complexadas com WSG3066, WSG3067 e a WSG3065_{ausente}) foram refinados e mais outros dois conjunto de dados (TbPTR1 complexadas com CYR e TTR), perfazendo um total de cinco estruturas refinadas, cujas fórmulas estruturais dos ligantes encontram-se na tabela 2.8.

Tabela 2.8- Fórmulas estruturais dos ligantes refinados

Nome do ligante	Fórmula	Massa Molecular (Da)
Triantereno		253,23
Ciromazina		166,19
WSG3066		232,3
WSG3067		232,3

Foram refinadas as coordenadas posicionais x, y e z e os fatores de temperatura B isotrópicos de cada átomo. O refinamento foi do tipo *restrained* e aplicaram-se modelos de TLS e NCS quando adequados. O escalonamento entre os fatores de estrutura observados e calculados utilizou um modelo de máscara para a região de *bulk solvent*.

2.5.1 Programas Computacionais Utilizados para Modelagem e Refinamento

Devendo o trabalho de refinamento de estruturas protéicas ser cuidadoso, o refinamento completo de cada estrutura foi realizado usando protocolos de “cozimento” simulado, programa computacional **CNS** (BRUNGER et al., 1998), em combinação com métodos de máxima probabilidade, programa computacional **Refmac5** (MURSHODOV; VAGIN; DODSON, 1997), e inspeção computacional gráfica de modelos e densidade eletrônica, programa computacional **Coot** (EMSLEY e COWTAN, 2004).

Para cada estrutura foram ensaiados vários modelos de restrições de NCS. O melhor modelo para cada uma foi o utilizado no refinamento final da respectiva estrutura, a saber: cadeia A com cadeia B e cadeia C com cadeia D para a TTR, entre todas as cadeias, A, B, C e D para CYR e cadeia A com cadeia D e cadeia B com cadeia C para WSG3065_{ausente}, tomando-se o cuidado de retirar os *loops* flexíveis dos modelos. Para as estruturas WSG3066 e WSG3067, não se utilizou restrições de NCS.

Ainda, refinaram-se parâmetros de TLS para as estruturas WSG3065_{ausente}, WSG3066 e WSG3067, tendo-se considerado um corpo rígido independente cada cadeia polipeptídica com sua coenzima e seu inibidor associados, este último exceto para a estrutura WSG3065_{ausente}.

O trabalho de refinamento e modelagem foi realizado ciclicamente até não se poder adicionar mais átomos estruturados quimicamente justificáveis.

2.5.1.1 *Adição de ligantes ao modelo*

Durante a modelagem molecular houve a busca dos respectivos inibidores ligados a *TbPTR1*, isto é, determinar se esses ligantes encontravam-se realmente ligados à enzima alvo. Se a densidade indicava a presença do ligante, então foi modelado na mesma o respectivo ligante (Tabela 2.8). Para seu refinamento, porém, faz-se necessário a elaboração de bibliotecas de restrições geométricas. Alguns softwares usados para esse fim foram o pacote CCP4 (Collaborative Computational Project nº 4) (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994) e o site *PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes*, disponível em: <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/>. (SCHUETTELKOPF e VAN AALTEN, 2004).

Além disso, nas cinco estruturas refinadas, realizou-se a busca por outros ligantes com o próprio programa de modelagem **Coot** (EMSLEY e COWTAN, 2004), tais como glicerol (GOL), etilenoglicol (EDO), ditiotreitól (DDT), ditiotreitól oxidado (DTO), acetatos (ACT), íons como sódio (NA) e outros. A busca foi realizada com ajuda de um módulo do programa **Coot** (EMSLEY e COWTAN, 2004), já que para esses ligantes comumente encontrados em estruturas protéicas há bibliotecas do **Refmac5** (MURSHODOV; VAGIN; DODSON, 1997) prontas, bibliotecas essas utilizadas pelo **Coot**.

2.5.1.2 *Adição de moléculas de água ao modelo*

As moléculas de água foram adicionadas ao modelo utilizando-se o programa **WARP** (PERRAKIS et al., 1997) do pacote de programas de cristalografia CCP4 (The CCP4 suite:

programs for protein crystallography, 1994); algumas moléculas que não foram encontradas pelo programa foram colocadas manualmente nas suas respectivas densidades eletrônicas.

2.6 Validação das Estruturas dos complexos de *T.brucei*

2.6.1 Programas Utilizados para Validação

Alguns programas computacionais não comerciais (gratuitos) que foram utilizados para validação das estruturas antes de serem depositadas no PDB *Protein Data Bank* foram: **Procheck** (LASKOWSKI et al., 1993), **Whatcheck** (HOOFT et al., 1996), **Sfcheck** (VAGUINE et al., 1999), **ValidationPDB** (WESTBROOK et al., 2003), **Mapman** (KLEYWEGT; JONES, 1996) e **Wasp** (NAYAL; DI CERA, 1996).

2.7 Busca Computacional de Novos Inibidores da *TbPTR1*

Pode-se selecionar, de acordo com conveniências, subconjuntos de moléculas das bases de dados. Uma das principais bases de dados não comercial é a ZINC (IRWIN e SHOICHET, 2005). Neste trabalho, optou-se inicialmente por filtrar (selecionar) esta base de dados para somente as moléculas com uma parte da estrutura em comum com os ligantes cristalográficos mediante o uso de *smiles* (WEININGER, 1988). Posteriormente, pode-se realizar uma busca parcial num subconjunto próprio do database, no qual as moléculas obedecem um critério de propriedades tipo droga, o chamado subconjunto *drug-like* (LIPINSKI, 2000).

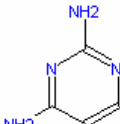
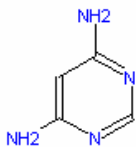
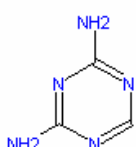
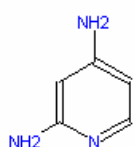
A estrutura cristalográfica do receptor *TbPTR1* utilizada nos ensaios de *docking* foi a do monômero A da WSG3066, pois esta tratava-se da estrutura de melhor resolução com 100

% de ocupação do ligante. Ademais, de forma geral, todas as estruturas apresentavam sítios ativos estruturalmente semelhantes. Para o procedimento de *docking*, foi retirado da estrutura o ligante WSG3066 e, então, recortado o sítio ativo selecionado.

2.7.1 Busca com uso dos *Smiles*

Smiles (WEININGER, 1988) (Tabela 2.9) das partes comuns das estruturas cristalograficamente determinadas dos ligantes CYR, WSG3066 e WSG3067 foram determinados e submetidos ao ZINC para preparação de um subconjunto.

Tabela 2.9 – *Smiles* para construção no banco de dados do ZINC

<i>Smiles</i>	Estruturas	<i>Smiles</i>	Estruturas
<chem>N1ncnc(N)n1</chem>		<chem>NC1cc(N)ncn1</chem>	
<chem>Nc1ccnc(N)n1</chem>		<chem>Nc1ccnc(N)c1</chem>	

O subconjunto produzido com ligantes compreendendo os *smiles* (WEININGER, 1988) (tabela 2.9) contém 2685 estruturas.

Fez-se usou do programa computacional gratuito à academia **eHiTS** (ZSOLDOS et al., 2006b) para o *docking*, utilizando primeiramente os pesos *default* do programa e posteriormente pesos treinados com as estruturas cristalográficas refinadas.

2.7.2 Busca com uso do subconjunto *Drug-Like*

Um segundo procedimento de ensaio virtual utilizou o subconjunto *drug-like* (LIPINSKI, 2000) do ZINC (IRWIN e SHOICHET, 2005), com 2.066.906 compostos, ou seja, compostos com propriedades típicas de fármacos. Fez-se uso do programa computacional **eHits** (ZSOLDOS et al., 2006b) para o *docking*, utilizando o peso *default* do programa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Cristalização dos Complexos

Cristais de complexos nas condições iniciais de cristalização nas placas de cristalização JI1, JI9, JI10 e JI13, correspondentes aos ligantes melamina, WSG3065, WSG3067 e WSG1034 foram obtidos.

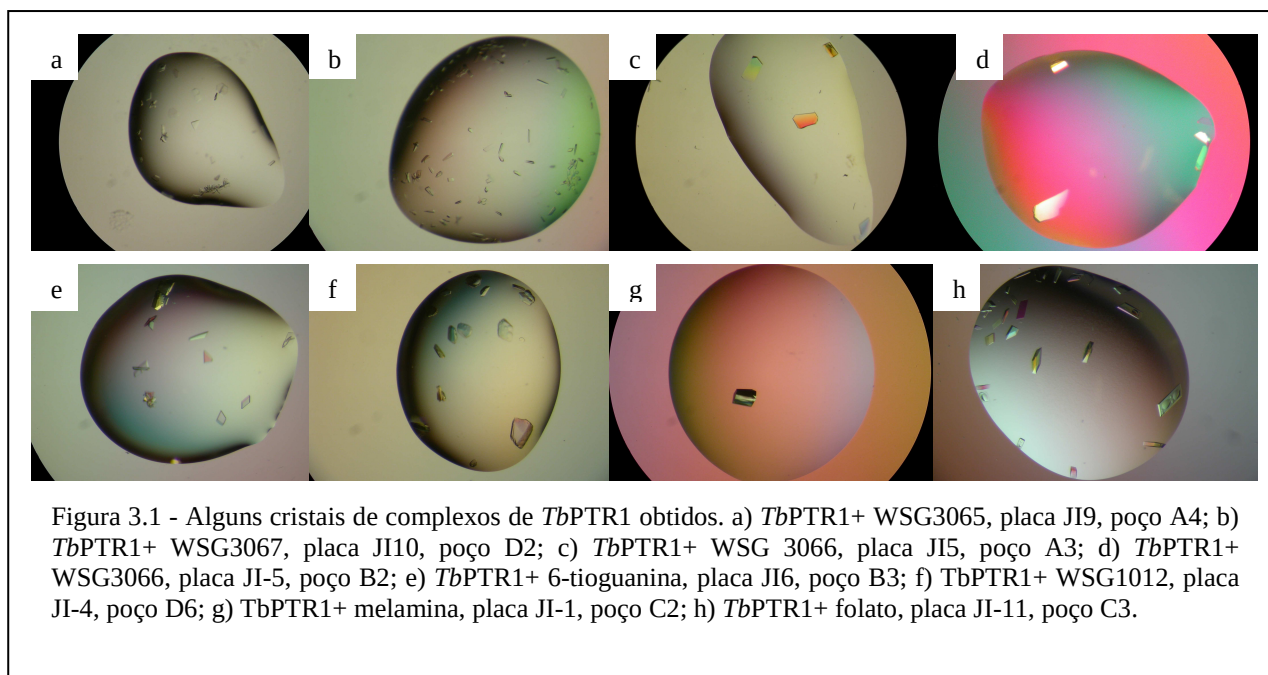
Após o insucesso relativo das placas JI2, JI3, JI6, JI7 e JI8, prepararam-se as placas JI5, JI4, JI12 e JI11 otimizando-se as condições de cristalização (descritas em materiais e métodos), obtendo-se então cristais, relacionado aos ligantes WSG1012, WSG3066, 6-tioguanina e folato.

3.2 Determinação das Estruturas por Difração de Raios X

3.2.1 Coleta de Dados de Difração e Processamento

3.2.1.1 Cristais Coletados

Vários cristais de complexos *TbPTR1* foram obtidos (Figura 3.1), e a coleta completa dos dados foi realizada para os cristais que difratavam fortemente em presença dos ligantes WSG3065, WSG3066, WSG3067 e melamina.



A tabela 3.1 mostra o resumo dos dados coletados dos cristais da proteína *TbPTR1* em presença dos ligantes WSG3066, WSG3067 e WSG3065_{ausente}, juntamente aos dados dos cristais preparados com triantereno e ciromazina, cedidos pelo Pesquisador Lindsay Brian Tulloch. A indexação mostrou que estes cristais pertencem ao mesmo grupo espacial, $P2_1$, primitivo monoclinico, com parâmetros de cela finais, após refinamento, semelhantes.

A unidade assimétrica da *TbPTR1* contém um tetrâmero de peso molecular 113881,92 kDa, conseqüentemente o coeficiente de Matthews é $2,23 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ e a porcentagem em volume do solvente no cristal igual a 44,78% .

Tabela 3.1- Resumo da coleta de dados dos cristais *TbPTR1* em presença de diferentes ligantes

	TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Resolução (máx - min) / Å	2,26 - 74,12	1,98 - 75,59	1,70 - 74,54	1,70 - 74,54	1,60 - 74,54
Parâmetros da cela a / Å =	74,2271	73,8400	74,7112	74,7228	74,7302
b / Å =	90,4534	87,500	90,8248	91,162	90,9869
c / Å =	81,9521	84,2300	82,7140	82,8317	82,8185
$\alpha / ^\circ = \gamma / ^\circ$	90	90	90	90	90
$\beta / ^\circ =$	115,2331	116,083	115,7685	115,721	115,7873

Cento e oitenta imagens foram coletadas para cada cristal, obtendo-se 42300, 61175, 88770, 119087, 91395 reflexões independentes para as estruturas de *TbPTR1* com TTR, CYR, WSG3066, WSG3067 e WSG3065_{ausente}, respectivamente. A partir do conjunto original de reflexões de cada estrutura de *TbPTR1* complexada 5 % das reflexões foram marcadas para serem utilizadas no cálculo de R_{free} .

3.2.1.2 Resultados do Processamento das Imagens

As estatísticas do processamento dos dados são apresentadas na tabela abaixo.

Tabela 3.2- Resumo dos dados estatísticos de processamento das imagens.

	TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
Número de reflexões únicas	42300	61175	91395	88770	119087
R_{merge} (%)	12,0 (38,3)	10,7 (39,3)	6,5 (56,7)	5,5 (14,7)	4,7 (39,3)
I / σ	9,63 (3,3)	14,12 (4,1)	8,9 (1,3)	8,4 (4,3)	12,2 (2,4)
Completeza (%)	96,93 (81,04)	96,0 (90,93)	88,11 (79,69)	85,50 (89,86)	95,68 (89,45)
Multiplicidade	*	3,8 (3,6)	3,2 (3,1)	5,6 (5,5)	3,5 (3,3)

Obs.: Os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução. *Indisponível.

3.3 Substituição Molecular e Refinamento

3.3.1 Substituição Molecular

Dadas as estruturas dos complexos da *TbPTR1* estarem praticamente na mesma posição da estrutura de *TbPTR1* anteriormente resolvida (DAWSON et al., 2006), realizou-se refinamento com a utilização do programa **Refmac5** (MURSHODOV; VAGIN; DODSON, 1997), inicialmente como corpo rígido utilizando-se o tetrâmero completo, no que os valores de R e R_{free} já caíram (Tabela 3.3). Após, um refinamento do tipo *restrained* foi realizado usando o mesmo programa e, na seqüência, para retirar qualquer tendenciosidade do modelo de substituição molecular, utilizou-se o método de *Simulated Annealing* com uso do programa **CNS** (BRUNGER et al., 1998); finalmente, o modelo obtido por este último procedimento foi refinado novamente com o uso do programa **Refmac5** (MURSHODOV; VAGIN; DODSON, 1997) obtendo-se assim os valores de R e R_{free} mostrados na Tabela 3.3, o que indica que o procedimento de substituição molecular estava correto.

Tabela 3.3 – Valores de R e R_{free} obtidos no refinamento de corpo rígido, após este refinamento do tipo *restrained* e finalmente refinamento *restrained* realizado após o *Simulated Annealing*.

Estruturas	Refinamento de corpo rígido		Refinamento do tipo <i>restrained</i>		Refinamento <i>restrained</i> após o <i>Simulated Annealing</i>	
	R (%)	R_{free} (%)	R (%)	R_{free} (%)	R (%)	R_{free} (%)
TTR	33,996	35,040	27,008	31,900	27,147	33,077
CYR	36,270	35,176	23,954	29,033	24,080	29,412
WSG3065_{ausente}	31,437	32,477	21,190	26,056	22,658	27,850
WSG3066	32,000	33,097	22,033	26,484	22,497	27,105
WSG3067	32,433	33,009	21,397	24,845	22,910	25,983

3.3.2 Refinamento das Estruturas Cristalinas

Os modelos estruturais *TbPTR1* + TTR, *TbPTR1* + CYR, *TbPTR1* + WSG3065_{ausente}, *TbPTR1* + WSG3066 e *TbPTR1* + WSG3067 finais apresentaram 4 monômeros com aproximadamente 268 resíduos cada e 364, 544, 927, 1352 e 1254 moléculas de água, respectivamente, por unidade assimétrica. Os ligantes foram encontrados durante o trabalho cíclico de refinamento pelo programa **Refmac5** (MURSHODOV; VAGIN; DODSON, 1997) e modelagem com o programa gráfico **Coot** (EMSLEY e COWTAN, 2004), visualizando-se os mapas de densidade eletrônica e Fourier diferença. Das cinco estruturas refinadas, quatro apresentaram densidade eletrônica compatível com o esperado inibidor (TTR, CYR, WSG3066, WSG3067), mas na estrutura WSG3065 não se observou densidade eletrônica para seu inibidor. Além destes, durante o refinamento e a modelagem, observou-se que os conteúdos dos sítios ativos protéicos eram muito complexos, apresentando ligantes em ocupações parciais e oxidação parcial do resíduo Cys168.

3.3.2.1 Resultados Estatísticos de Refinamento

As estatísticas finais do trabalho de refinamento das estruturas são apresentadas na tabela

3.4.

Tabela 3.4 – Resumo dos dados estatísticos obtidos do refinamento das estruturas cristalinas

	TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
R (%)	25,358	20,579	13,806	12,346	11,836
Rfree (%)	31,976	26,738	18,319	17,157	15,029
FOM	0,744	0,771	0,904	0,892	0,930
Fator B médio / Å ²	32,366	24,048	19,31*	10,712*	12,156*

* Residual, descontados tensores TLS.

As estruturas WSG3065_{ausente}, WSG3066 e WSG3067 foram refinadas usando parâmetros de TLS com os modelos citados na seção Metodologia.

As estruturas TTR, CYR e WSG3065_{ausente} foram refinadas usando restrições de simetria não cristalográfica (NCS), como também citado na seção Metodologia.

3.4 Validação dos Modelos Refinados Cristalograficamente

3.4.1 Gráfico de Ramachandran

A qualidade estereoquímica do modelo foi estimada utilizando-se os programas **Sfcheck** (VAGUINE et al., 1999), **Whatcheck** (HOOFT et al., 1996) e **Procheck** (LASKOWSKI et al., 1993).

Os gráficos de Ramachandran (não mostrados) resultantes da validação por **Procheck** (Tabela 3.5) revelam que o modelo final de cada uma das estruturas apresenta-se excelente quanto aos ângulos ϕ/ψ , com no mínimo 99,4 % dos resíduos presentes nas regiões central e permitida, ficando os demais na região generosamente permitida, isto é, nenhum na região não permitida.

Tabela 3.5- Dados dos Gráficos de Ramachandran

	TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
Região central (%)	86,90	86,90	89,10	88,60	89,80
Permitida (%)	12,60	12,60	10,50	10,90	9,90
Generosamente permitida (%)	0,60	0,50	0,50	0,50	0,30
Não permitida (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

3.4.2 Desvio Médio Quadrático de Comprimentos de Ligação (rmsbl), Ângulos de Ligação (rmsba) e Restrições de Centros Quirais (rmscc)

Os modelos finais apresentam outros excelentes parâmetros estereoquímicos, os desvios médios quadráticos dos comprimentos de ligação iguais a 0,007 Å, 0,006 Å, 0,018 Å, 0,018 Å e 0,0016 Å, os desvios médios quadráticos do ângulos de ligação iguais a 1,092 °, 2,028 °, 1,743 °, 1,754 °, 1,644 ° e os desvios de restrições de centros quirais iguais a 0,054 Å³, 0,107 Å³, 0,097 Å³, 0,103 Å³, 0,094 Å³, respectivamente, para as estruturas TTR, CYR, WSG3065_{ausente}, WSG3066, WSG3067.

3.4.3 Ajuste na Densidade Eletrônica

Foi calculado para cada estrutura o valor do residual no espaço real (RSR) e o valor do coeficiente de correlação do espaço real (RSCC) pelo programa **Mapman** (KLEYWEGT; JONES, 1996), obtendo os gráficos 3.2 – 3.6.

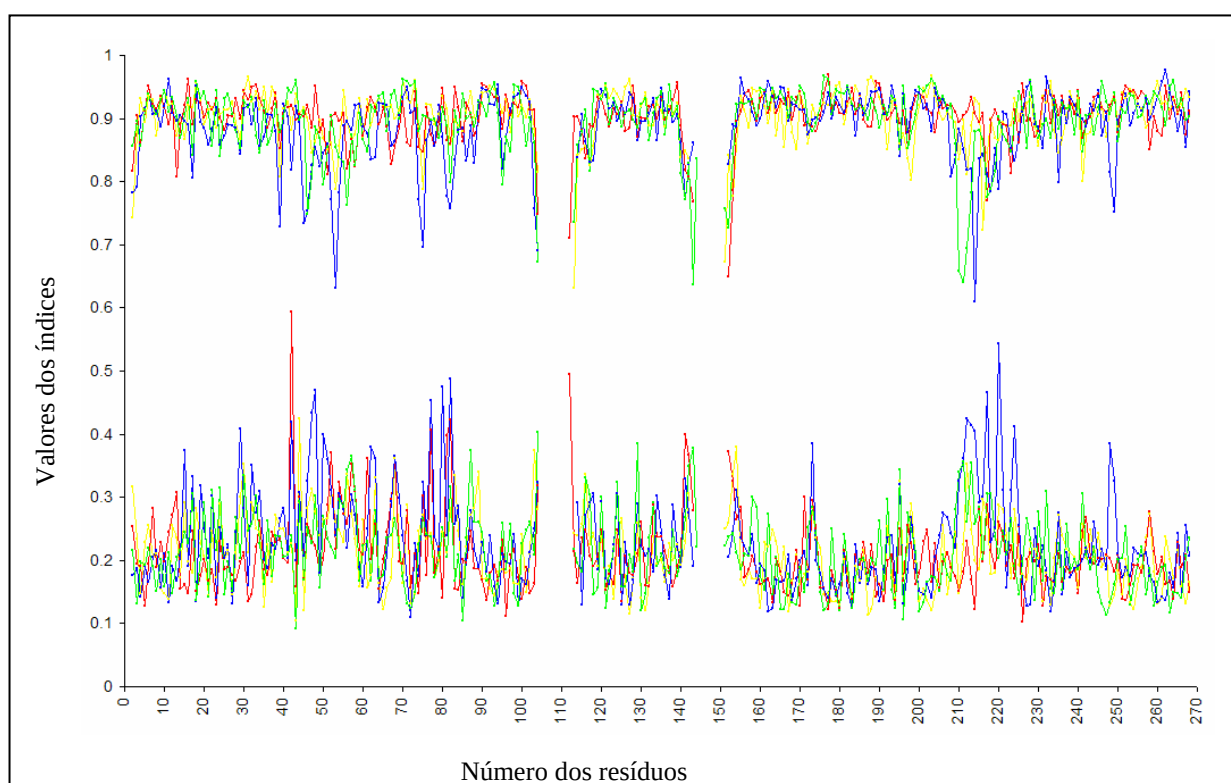


Figura 3.2 – Qualidade de ajuste da estrutura TTR na densidade eletrônica. Os índices RSCC e RSR estão na parte de cima e na parte de baixo do gráfico, respectivamente, com valores na ordenada, enquanto que o número dos resíduos está na abscissa. O monômero A está em amarelo, o monômero B em vermelho, o monômero C em azul e o monômero D em verde. Valores calculados com o programa **Mapman** (KLEYWEGT; JONES, 1996).

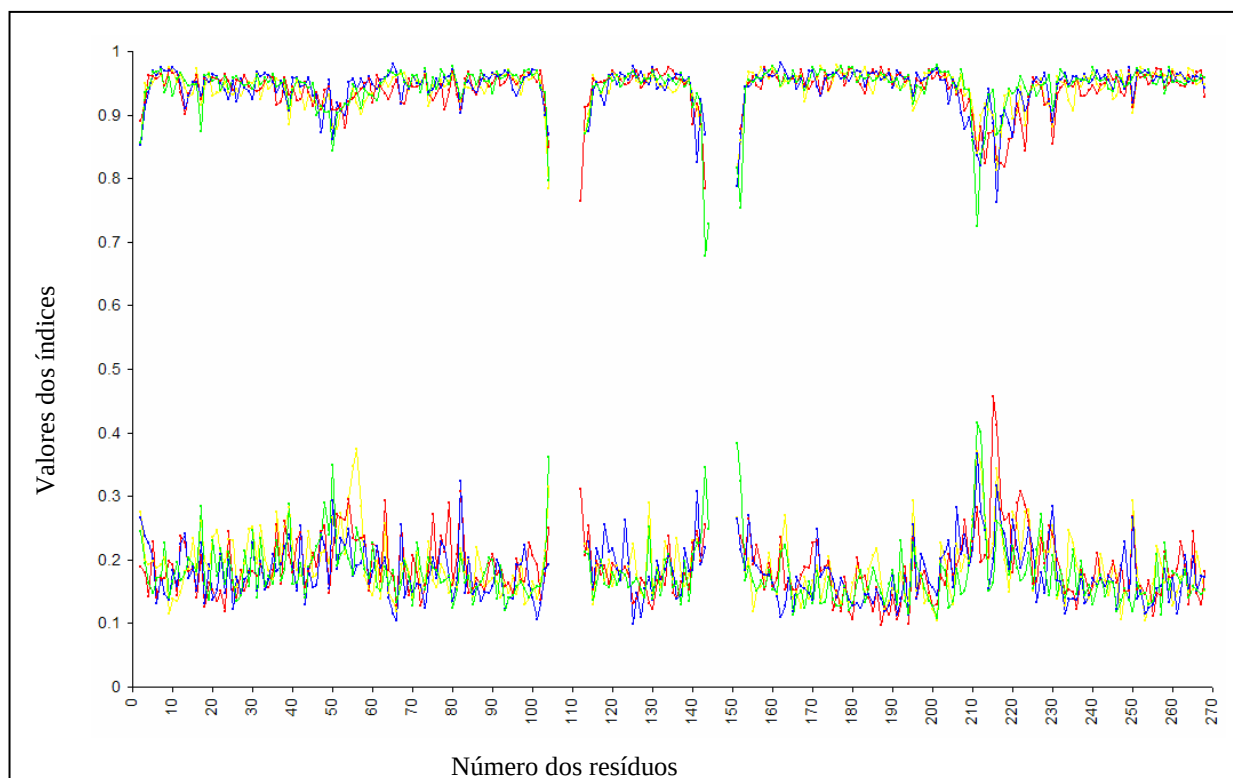


Figura 3.3 – Qualidade de ajuste da estrutura CYR na densidade eletrônica. Os índices RSCC e RSR estão na parte de cima e na parte de baixo do gráfico, respectivamente, com valores na ordenada, enquanto que o número dos resíduos está na abscissa. O monômero A está em amarelo, o monômero B em vermelho, o monômero C em azul e o monômero D em verde. Valores calculados com o programa **Mapman** (KLEYWEGT; JONES, 1996).

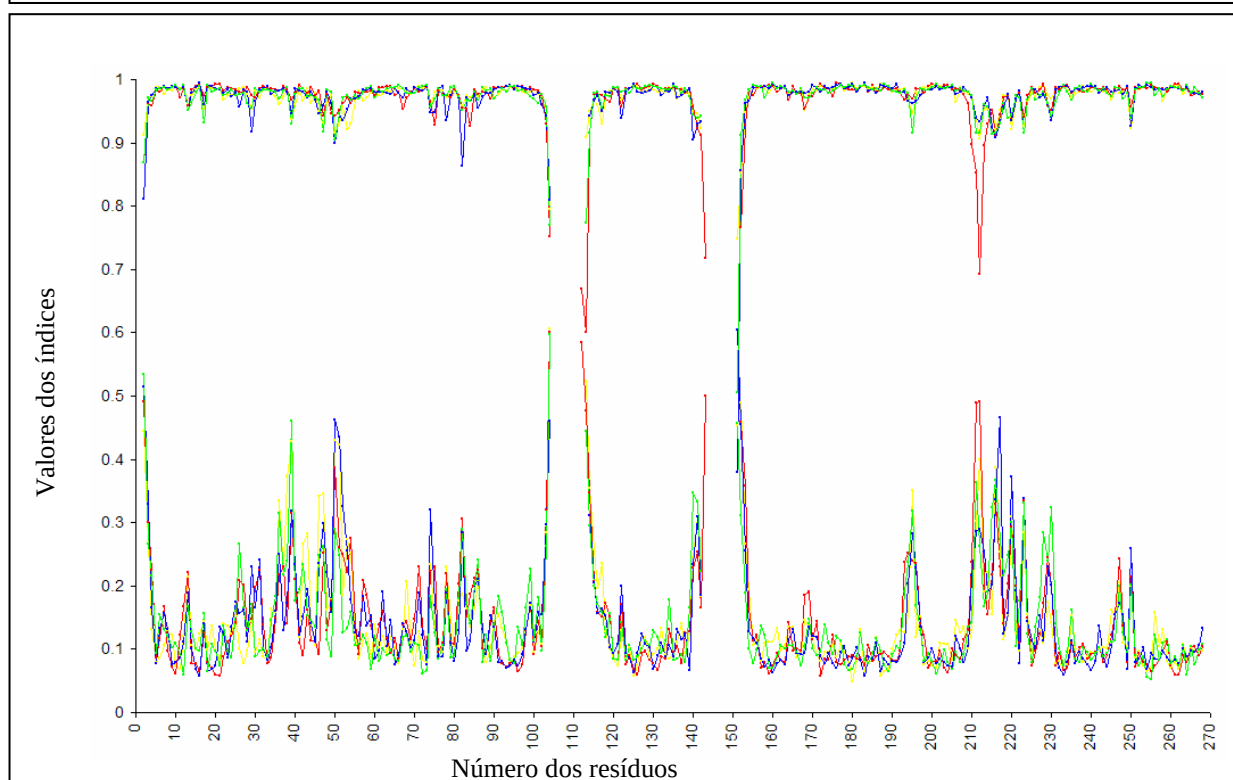
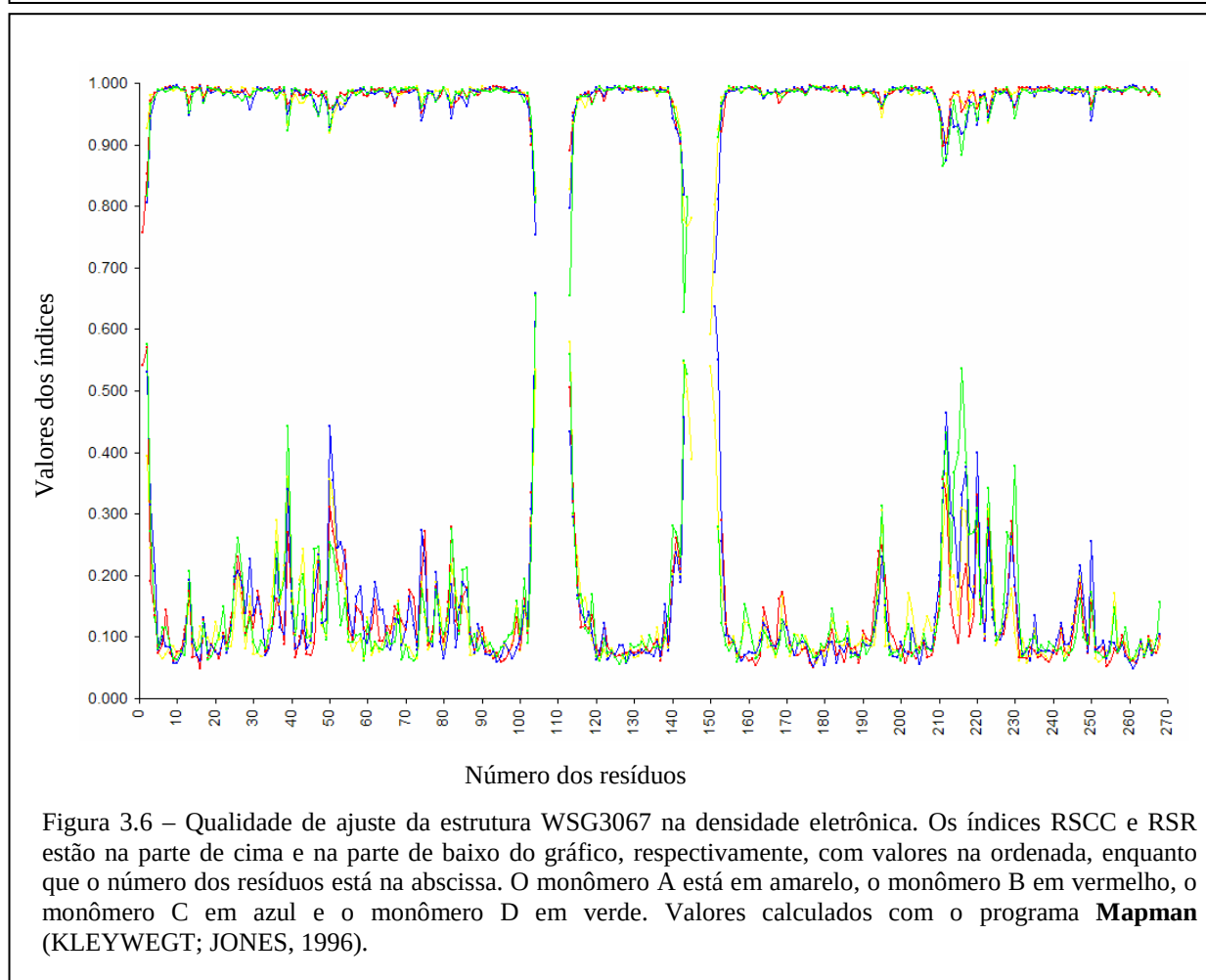
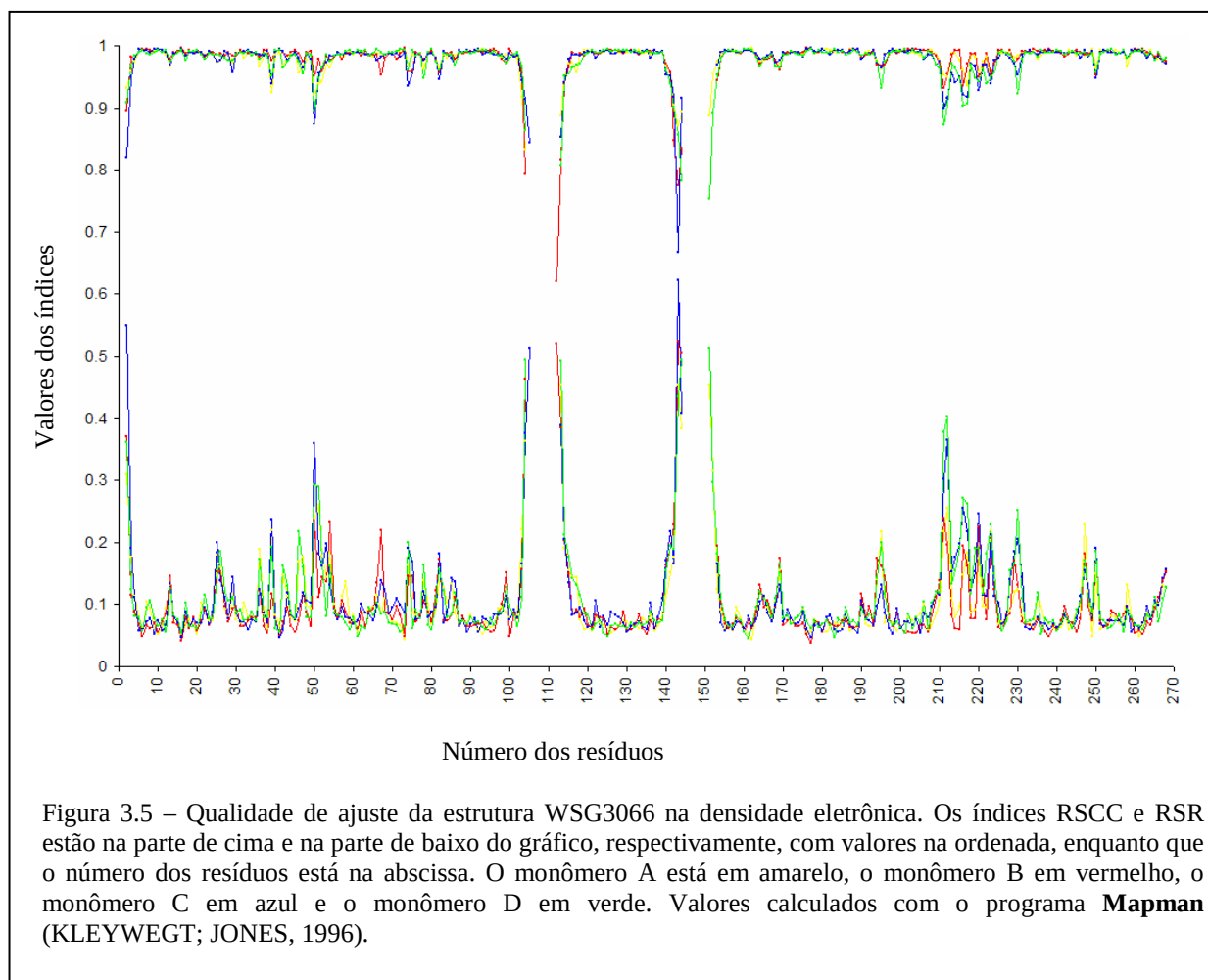


Figura 3.4 – Qualidade de ajuste da estrutura WSG3065 na densidade eletrônica. Os índices RSCC e RSR estão na parte de cima e na parte de baixo do gráfico, respectivamente, com valores na ordenada, enquanto que o número dos resíduos está na abscissa. O monômero A está em amarelo, o monômero B em vermelho, o monômero C em azul e o monômero D em verde. Valores calculados com o programa **Mapman** (KLEYWEGT; JONES, 1996).



Nos gráficos observam-se regiões onde os valores de RSR apresentam-se altos enquanto que os de RSCC apresentam-se baixos; estas estão relacionadas às regiões flexíveis da enzima e onde há interrupções na cadeia. Particularmente, há duas interrupções em cada monômero da proteína e essas regiões correspondem aos resíduos de 104 a 113 e de 143 a 151, variando em um ou dois resíduos a mais ou a menos conforme estrutura. Essas regiões devem ter alta flexibilidade e tratar-se de *loops*. De fato, nas regiões circunvizinhas, o fator B médio é relativamente alto.

3.5 Análises Estruturais

3.5.1 Estrutura global

A figura 3.7 mostra o modelo estrutural do tetrâmero da proteína *TbPTR1*, presente numa unidade assimétrica, sendo cada monômero representado por uma cor distinta. O tetrâmero funcional tem simetria pontual 222, com dois sítios ativos separados por aproximadamente 25 Å em cada lado do conjunto. A subunidade A participa de interações extensas com as subunidades B e C. A interface formada com a subunidade D recobre uma área muito menor e envolve o C-terminal de cada subunidade (A e D) colocado entre um *loop* β - α e o C-terminal da subunidade parceira. Esta interface (A-D) coloca um resíduo básico, Arg287 em *LmPTR1*, His267 em *TbPTR1*, de uma subunidade próxima ao centro catalítico da subunidade parceira.

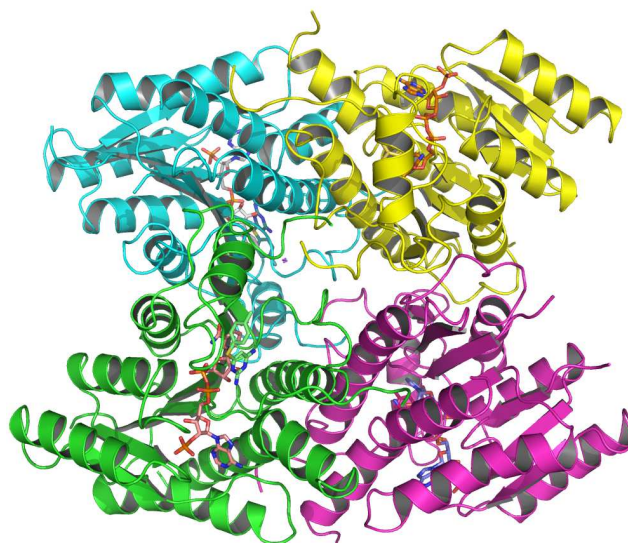


Figura 3.7 - Representação do tetrâmero funcional de *TbPTR1*; cada monômero é representado em uma cor diferente. Figura produzida pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

Cada subunidade de *TbPTR1* compreende um único domínio α/β , constituído de uma folha- β paralela “sanduichada” entre dois grupos de α -hélices (DAWSON et al., 2006). Esta estrutura é típica da superfamília SDR (*short-chain dehydrogenase/reductase*, dehidrogenase/redutase de curta cadeia) (DUAX et al., 2003; OPPERMANN et al., 2003).

Um alinhamento das seqüências de *TbPTR1* e de *LmPTR1* baseado nas estruturas demonstra que têm 51% de identidade (DAWSON et al., 2006) (Figura 3.8a) . A topologia da *TbPTR1* é muito próxima da relatada para *LmPTR1*. A seqüência da *TbPTR1* é mais curta do que a da *LmPTR1* devido a duas deleções e a um truncamento do N-terminal. Na *TbPTR1* o loop $\beta 3$ - $\alpha 3$ (Figura 3.8b) é mais curto e bem ordenado enquanto que em *LmPTR1* o *loop* tem 13 resíduos a mais e geralmente apresenta-se desordenado (SCHÜTTELKOPF et al., 2005). Uma segunda e menor deleção de quatro resíduos ocorre no segmento do C-terminal do loop que liga $\beta 4$ e $\alpha 4$ (Figura 3.8b) em *TbPTR1*. Esse *loop* tem a superfície exposta e desordenada em ambas *TbPTR1* e em *LmPTR1*.

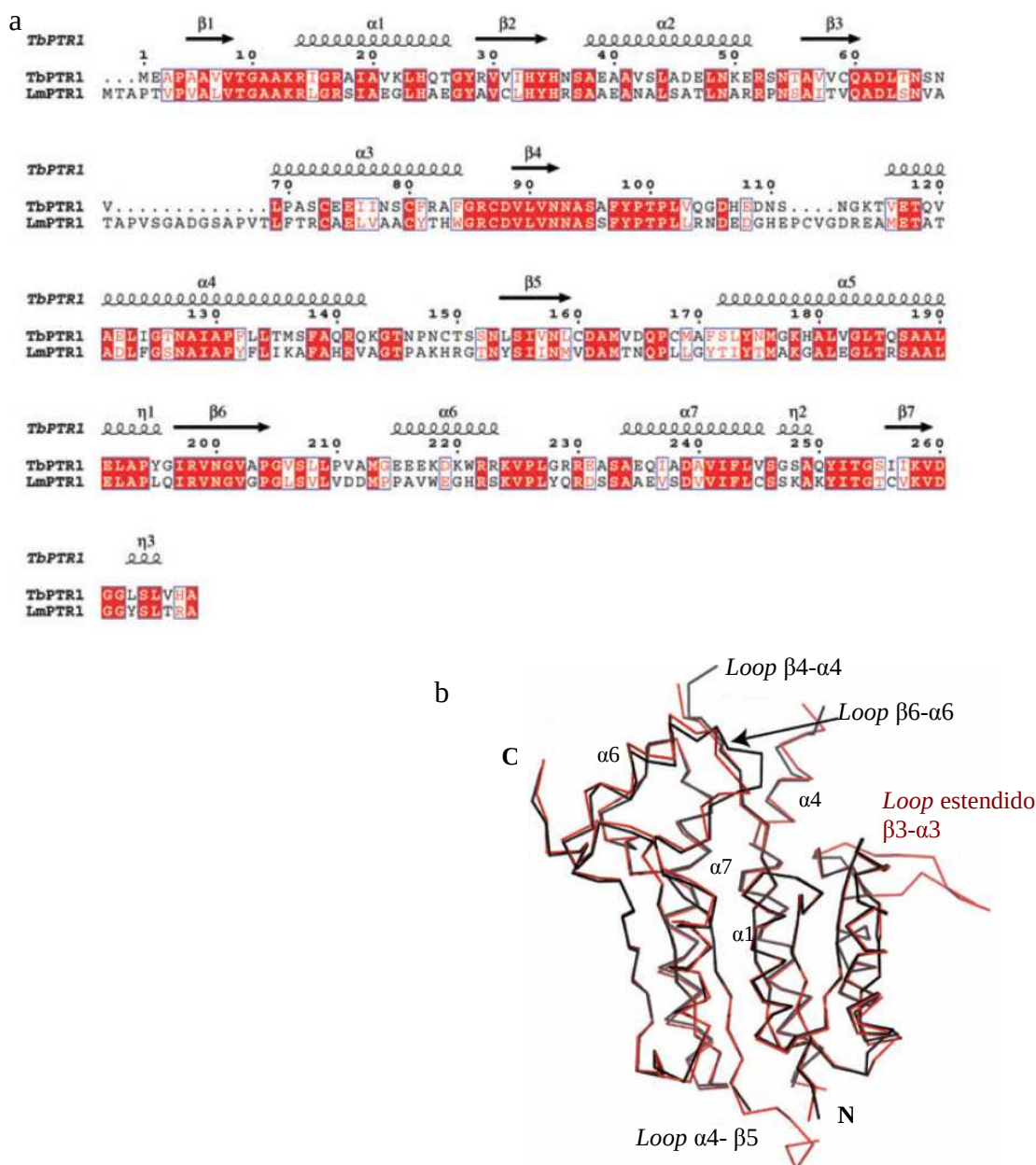


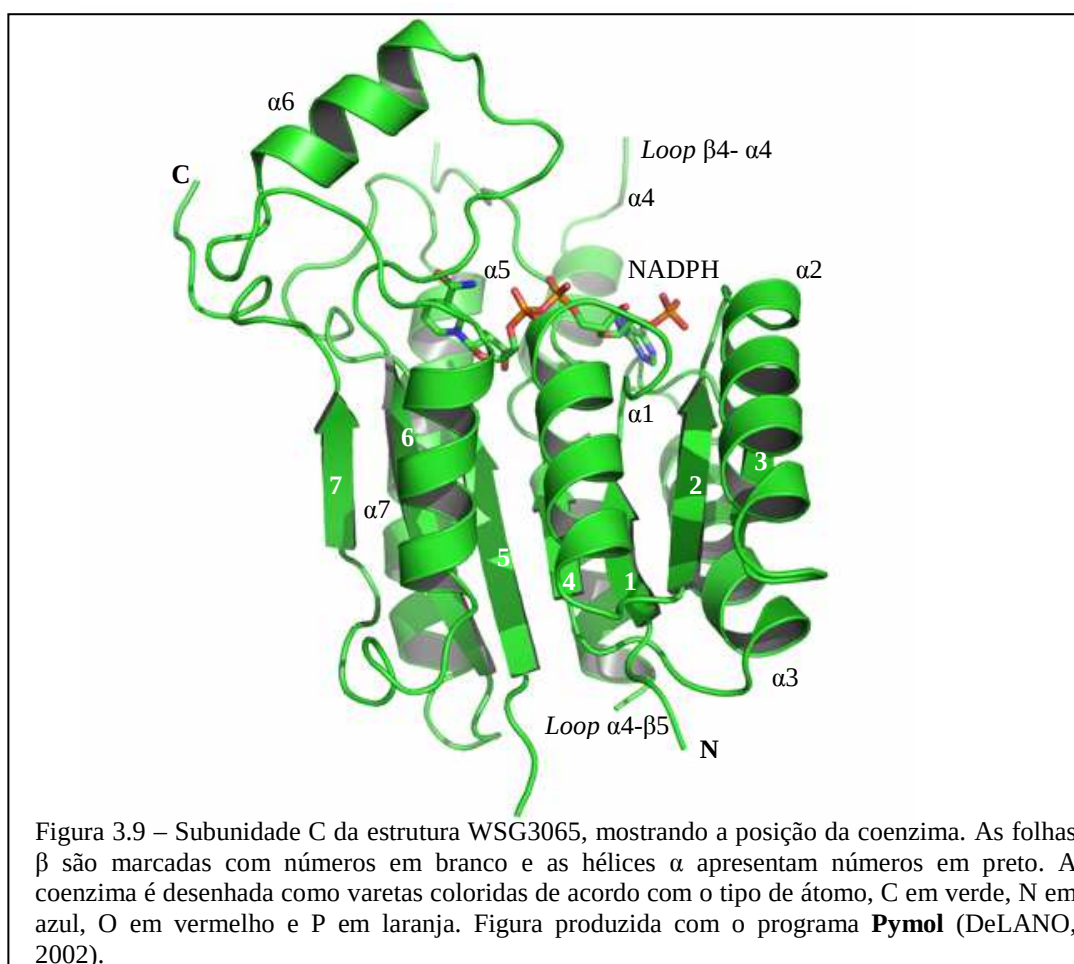
Figura 3.8 – Comparações entre a *TbPTR1* e a *LmPTR1*. a) Alinhamento das seqüências de *TbPTR1* e *LmPTR1* baseado nas estruturas, mostrando as estruturas secundárias. Resíduos mostrados em branco com fundo vermelho são rigorosamente conservados; substituições conservativas são mostradas em vermelho com fundo branco. Figura preparada usando o programa ESPrict (GOUET et al., 1999). b) Traçados sobre as posições dos Ca's mostram a superposição de uma subunidade da *TbPTR1* (em preto) e uma subunidade da *LmPTR1* (em vermelho). Algumas fitas β e hélices α são numeradas (DAWSON et al., 2006).

Os alinhamentos baseados na seqüência e na estrutura indicam uma forte conservação na seqüência em elementos de estrutura secundária e nas seções da proteína envolvidas na ligação da coenzima e centro catalítico. Uma exceção é o *loop* $\beta 6$ - $\alpha 6$ (Figura 3.8b) e a própria

hélice α_6 , os quais estão estabelecidos adjacentes ao centro catalítico (DAWSON et al., 2006).

3.5.1.1 O Sítio Ativo

O sítio ativo da *TbPTR1* é uma depressão em forma de L com quase de 30 Å de comprimento, 22 Å de largura e 15 Å de profundidade, formado pelo C-terminal de uma folha- β , onde a coenzima liga-se em uma conformação estendida. O sítio ativo é gerado pelos resíduos do C-terminal, regiões da fita β_4 e da hélice α_5 , pelos dois loops entre β_5 - α_5 e entre β_6 - α_6 , junto com a nicotinamida (Figura 3.9). O modelo das ligações de hidrogênio formadas pelos membros da família de SDR e coenzimas é, em geral, bem conservado (DUAX et al., 2003).



A parte adenina é localizada em uma fenda bem definida, formada por contribuições de resíduos das fitas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e hélice $\alpha 4$, “saduichada” entre um fundo hidrofóbico criado por três cadeias laterais, Leu63, Ala94 e Thr126, e a cadeia lateral aromática de His35. Quatro associações por ligações hidrogênio envolvem o fosfato 2' da adenina e contribuem significativamente para a ligação da coenzima (Figura 3.9). Em geral, dois resíduos fundamentais, um par arginina e lisina, ligam-se a este fosfato e são reconhecidos como o principal fator na diferenciação para a utilização de NADPH na família NADH (DUAX et al., 2003). Este não é o caso na *TbPTR1*, com a especificidade provida por um bolsão ligante de fosfato formado principalmente pelo loop entre a fita $\beta 2$ e a hélice $\alpha 2$, o uso de grupos amida da cadeia principal contribuídos por His35, Asn36, Ser37 e a cadeia lateral hidroxila da Ser37. Os resíduos correspondentes em *LmPTR1* são His38, Arg39 e Ser40. As interações ligações de hidrogênio com a parte adenina da coenzima são altamente conservadas entre *TbPTR1* e *LmPTR1*, com uma exceção. Em *LmPTR1*, o grupo amina N6 da adenina doa uma ligação de hidrogênio ao grupo carboxila da cadeia lateral do Asp142. Este tipo de resíduo é conservado em *TbPTR1*, Glu122, mas a cadeia lateral adota uma orientação diferente para interagir com a Lys114 próxima que, através disso, remove uma ligação de hidrogênio com o N6 da adenina.

As análises cristalográficas de complexos ternários de *LmPTR1* com os substrato e produtos, biopterina, DHB e THB, mostram esses ligantes pterina em uma única orientação participando de interações virtualmente idênticas com a enzima e a coenzima (SCHÜTTELKOPF et al., 2005). Essas estruturas definem um mecanismo de redução de dois passos seqüencial e os papéis representados por três resíduos, Asp181, Tyr194 e Lys198 em *LmPTR1*, que na primeira etapa catalítica assemelha-se àquele proposto para outros membros da família SDR. Estes resíduos são conservados em *TbPTR1* (Asp161, Tyr174 e Lys178) e servem para posicionar a nicotinamida da coenzima para a transferência do hidreto (Lys178), adquirir um próton do solvente (Asp161) e passar este próton para o substrato (Tyr174). A

segunda etapa de redução, que ocorre no lado oposto da pterina, é similar àquela postulada para DHFR. A nicotinamida fornece outra vez um hidreto e uma água ativada fornece o próton (GOURLEY et al., 2001).

3.5.2 Ligantes e Coenzima nas Estruturas Cristalinas

Apresentaram-se bem definidos no sítio ativo da enzima e com ocupação total os ligantes TTR (Figura 3.10a), CYR (Figura 3.10b), WSG3066 (Figura 3.10c). O ligante WSG3067 (Figura 3.10d), embora revelado em mapas de densidade eletrônica em cada um dos sítios ativos, refinou-se cristalograficamente com ocupação parcial, tratando-se o monômero C do sítio de maior ocupação com 70 % e os demais com 30 %.

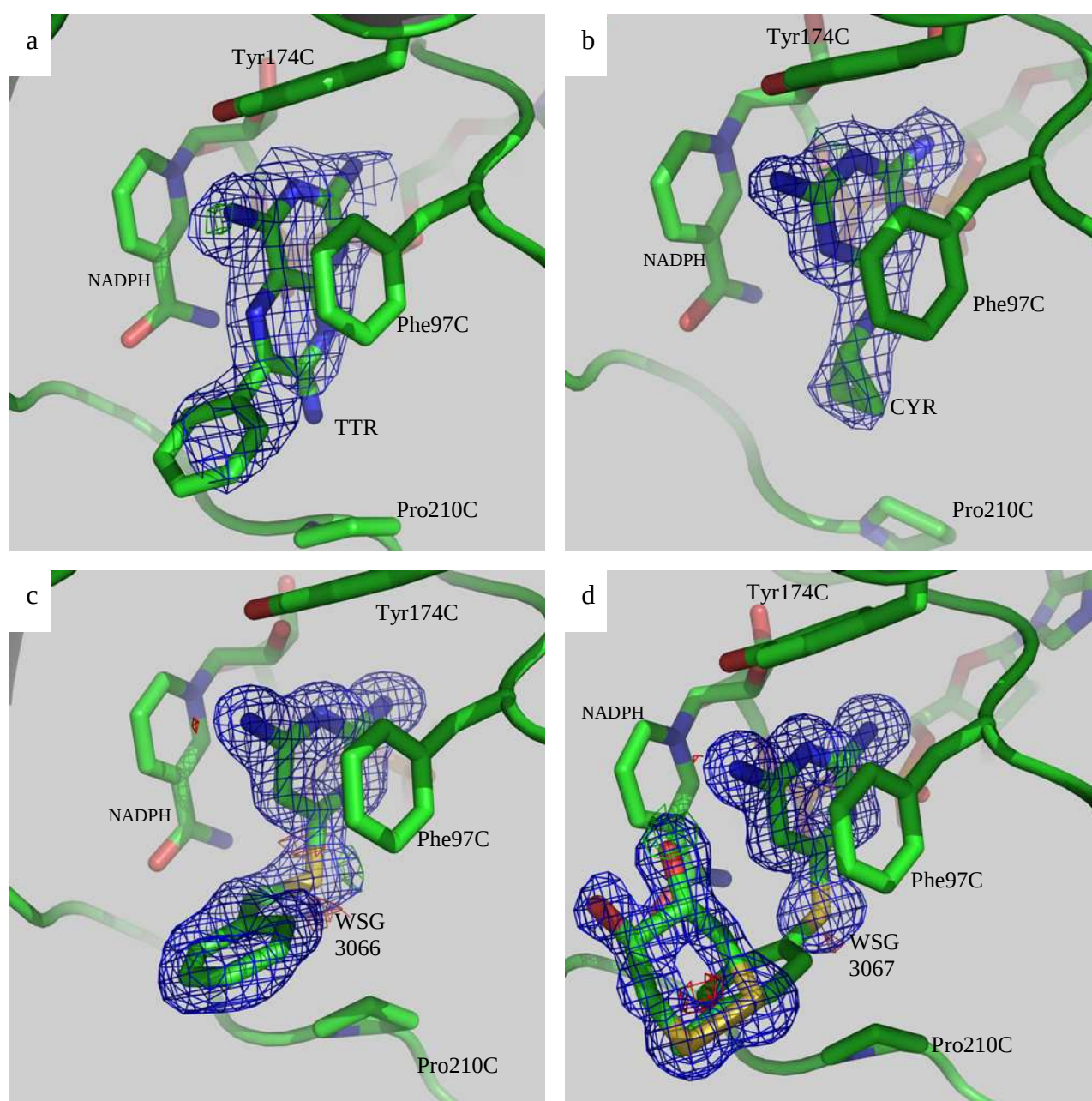


Figura 3.10 - Sítios ativos com ligantes, monômero C representado em todos os casos. a) TTR, b) CYR, c) WSG3066 e d) WSG3067. Os ligantes TTR, CYR, WSG3066 apresentaram ocupação total em todos monômeros. O ligante WSG3067 apresentou ocupação parcial, estando presente em maior porcentagem no monômero C, com 70% de ocupação, sendo os 30% restantes ocupados por ditiotreitol oxidado superposto a parte do ligante. Sistematicamente, todos os ligantes estão “sanduichados” entre o resíduo Phe97 e a coenzima NAP. Alguns resíduos importantes na interação do ligante são mostrados. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1 σ de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3 σ (verde) e -3 σ (vermelho). Figuras produzidas pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

Em contraste com as demais, na estrutura cujo ligante seria o WSG3065, não observou-se densidade eletrônica compatível com o mesmo no sítio ativo. Mesmo assim, para

teste, o ligante foi adicionado ao modelo, mas após refinamento os mapas de Fourier diferença confirmaram sua ausência.

A coenzima NADPH apresentou unívoca densidade eletrônica em todos os monômeros de todas as estruturas, tendo sua ocupação sempre 100 %.

A Figura 3.11 mostra os ligantes ditiotretitol e glicerol ocupando o sítio ativo onde supostamente estaria o WSG3065.

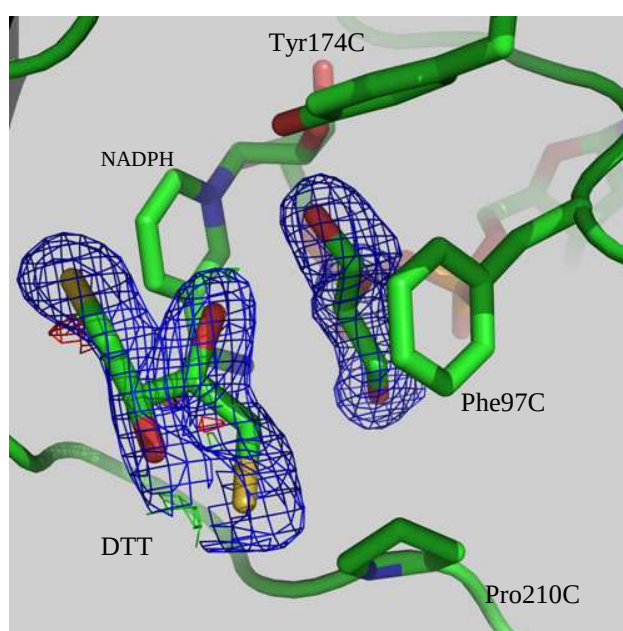


Figura 3.11 - Sítio ativo do monômero C, estrutura WSG3065, na verdade este ausente e em sua posição esperada os ligantes glicerol e ditiotretitol. O mapa de densidade eletrônica (azul) foi desenhado com 1 σ de contorno, mapa de Fourier diferença com contorno em + 3 σ (verde) e - 3 σ (vermelho). Figura produzida pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

Para confirmar a presença desses ligantes realizou-se o procedimento de *annealing* virtual com a utilização do pacote computacional **Phenix** (ADAMS et al, 2004), produzindo-se *omit maps* em que os próprios ligantes foram omitidos. As figuras 3.12a-d confirmam nos mapas de densidade eletrônica e Fourier diferença a presença dos ligantes TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 nas estruturas.

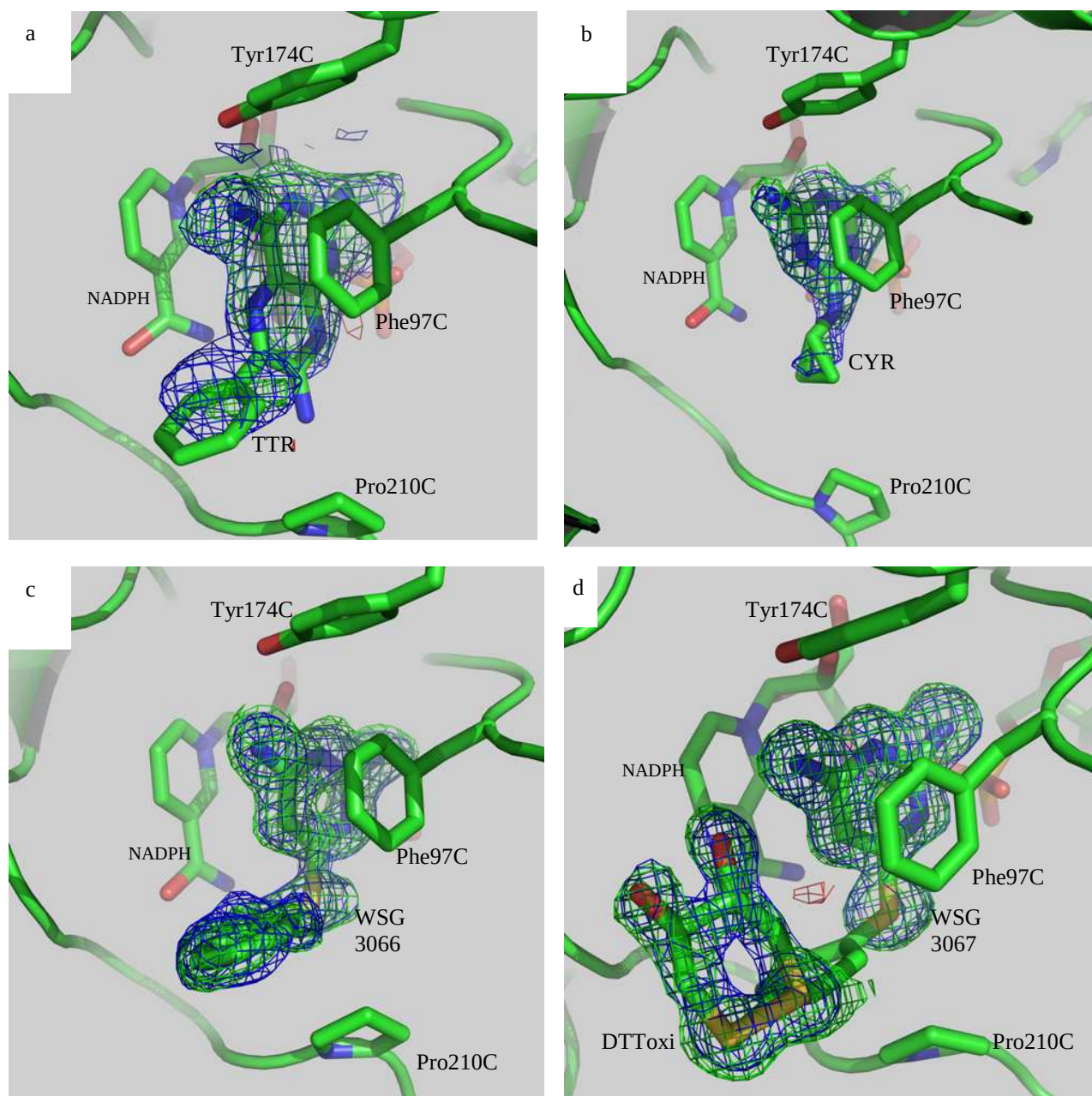


Figura 3.12 - Sítio ativos do monômero C com os ligantes a) TTR, b) CYR, c) WSG 3066 e d) WSG 3067. As figuras ilustram os mapas de densidade eletrônica e mapas Fourier diferença calculados omitindo-se as coordenadas dos ligantes *omit maps*, com *bias* retirado mediante o procedimento de *annealing*. As posições finais refinadas dos ligantes são mostradas para referência. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1 σ de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3 σ (verde) e -3 σ (vermelho). Figuras produzidas pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

Na literatura encontramos as estruturas de *TbPTR1*, *LmPTR1* e *TcPTR2* ligadas ao metotrexato, um inibidor padrão antifolato. No caso da primeira enzima, o metotrexato

apresenta-se bem definido (DAWSON et al., 2006), enquanto nas outras enzimas o MTX encontra-se pobremente definido (GULEY et al., 2001, SHORMANN et al., 2005). Ainda, na estrutura de *LtPTR1* o MTX não foi localizado (ZHAO e NARAYAN, 1993).

Todos estes ligantes são semelhantes quanto ao anel pteridina, pois como trata-se de uma inibição competitiva com o folato, devem apresentar propriedades estruturais mínimas que permitam o acesso ao sítio ativo da enzima, porém, sem promover a resposta biológica, bloqueando a ação agonista do folato e, ao ligar-se ao sítio ativo da enzima, desempenhando uma ação antagonista, isto é uma atividade oposta ao agonista natural ou substrato. Em outras palavras, não permitindo que o folato ligue-se à enzima, desse modo, não ocorrendo a redução deste no metabolismo do parasita para as formas dihidrofolato e tetrahydrofolato, este último requerido para replicação do DNA e, assim, ocasionando a morte do parasita.

3.5.2.1 *Tratamento dos loops*

Todos os monômeros das estruturas refinadas apresentaram duas interrupções na cadeia, a primeira geralmente entre os resíduos 104 e 113 e a segunda geralmente entre os resíduos 143 e 151, variando um ou dois resíduos dependendo da estrutura ou do monômero, como mencionado no item 3.4.3.

Para se modelar essas regiões flexíveis utilizaram-se três procedimentos principais:

- Realizou-se um *annealing computacional* dando energia e permitindo mobilidade para um possível ajuste desses resíduos.
- Tentou-se colocar os resíduos faltantes nas regiões verificando se os mapas de densidade eletrônica calculados posteriormente corroboravam a presença; em caso contrário, por exemplo, mapas de Fourier diferença (negativo) na região, o mesmo era retirado. Em

média exigia-se um contorno de pelo menos $0,5 \sigma$ nos mapas de densidade eletrônica para manutenção do resíduo.

- Com respeito à segunda interrupção, além dos procedimentos anteriores, usou-se o programa **Coot** (EMSLEY e COWTAN, 2004) para reproduzir uma cópia de alguns monômeros eventualmente mais organizados sobre os demais monômeros, a fim de guiar eventual modelagem destes.

3.5.2.2 *Interações dos inibidores com a enzima e a coenzima*

A tabela 3.6 lista as interações da enzima com os ligantes inibidores e inclui as do metrotexato anteriormente descritas na literatura (DAWSON et al., 2006), para comparação, tomando-se como referência o monômero C já que as diferenças são pequenas em relação aos demais monômeros.

As tabelas 3.6 e 3.7, construídas a partir dos resultados do programa **Ncont** do pacote CCP4 (The CCP4 suite: programs for protein crystallography, 1994) trazem um resumo dos contatos dos inibidores com a enzima e a coenzima até $3,5 \text{ \AA}$, auxiliando a discussão das interações globais e específicas de cada ligante.

Tabela 3.6 - Contatos (interações) ($\leq 3,5$ Å) entre a proteína e os inibidores MTX, TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 com o monômero C da *TbPTR1*.

MTX		TTR		CYR		WSG3066		WSG3067	
MTX	<i>TbPTR1</i>	TTR	<i>TbPTR1</i>	CYR	<i>TbPTR1</i>	3066	<i>TbPTR1</i>	3067	<i>TbPTR1</i>
C7	O Leu208			CAD	NH2 Arg14				
				CAD	O Leu208			CAE	CG Pro210
								CAE	CD Pro210
								CAA	CG1 Val206
								CAD	CD2 Leu209
								CAF	O Leu208
								CAF	CD Pro210
C2	CB Phe97	C2	CB Phe97	CAJ	CB Phe97	C2	CB Phe97	C2	CB Phe97
NA2	O Ser95			NAB	O Ser95				
NA2	CB Ser95			NAB	CB Ser95				
NA2	OG Ser95			NAB	OG Ser95				
NA2	CB Phe97								
						CAG	CE2 Phe97		
N3		N3	OH Tyr174	NAE					
C4		C4	OH Tyr174	CAI	OH Tyr174				
		C4	CD1 Phe97	CAI	CD1 Phe97				
NA4	CZ Tyr174	N4	CZ Tyr174	NAA	OD2 Asp161	NAA	OH Tyr174	NAB	OH TYR174
NA4	OH Tyr174	N4	OH Tyr174	NAA	CZ Tyr174				
NA4	CE2 Phe97	N4	CD1 Phe97	NAA					
		N4	CE1 Phe97						
								CAG	CE2 Phe97
								CAG	CG Pro210
								CAG	CD Pro210
		N2	CB Ser95	NAB		NAB	CB Ser95	NAC	CB Ser95
		N2	OG Ser95			NAB	OG Ser95	NAC	OG Ser95
		N2	O Ser95					NAC	O Ser95
		NAB	NH2 Arg14						
		NAB	N Pro210						
		NAB	CG Pro210						
		NAB	CD Pro210						
		N1	CB Phe97						
N8	NH1 Arg14							SAK	NH2 Arg14
O1	CG Pro99								
O1	CD Pro99								
		CAF	CD2 Leu209						
								CAO	CG Pro210
								CAO	CD Pro210

Os caracteres em negrito indicam a natureza dos átomos. Enfatizados temos os resíduo Phe97 em vermelho, Tyr174 em azul e Ser95 em verde, que interagem de modo semelhante com os cinco ligantes. Numa mesma linha da tabela estão os átomos posicionalmente correspondentes entre os ligantes.

Os principais resíduos de interação até 3,5 Å com o ligante, além da coenzima NADPH, compreendem a Phe97, que com a coenzima sanduicha o ligante mediante interações hidrofóbicas, a Ser95 e a Tyr174 (Phe97 e Tyr174 mostrados nas Figuras 3.10a a 3.12d). A Pro210 (Figuras 3.5a-d) apresenta interações significativas junto aos ligantes TTR e WSG3067.

Já a Arg14, um resíduo motivo da família SDR, apresenta contatos até 3,5 Å com os ligantes MTX, TTR, CYR e WSG3067 e um pouco acima desta distância com o WSG3066. O motivo de ligação da coenzima da maioria de membros da família SDR, GlyX₃GlyXGly, onde X é qualquer tipo do aminoácido (DUAX et al., 2003), é substituído na PTR1 por GlyX₃ArgXGly, com a cadeia lateral da arginina (Arg14 em *TbPTR1*, em Arg17 em *LmPTR1*) interagindo diretamente com o pirofosfato do NADP⁺. Esta interação, junto com duas ligações de hidrogênio doadas aos grupos carbonil de Leu208 e Leu209, forçam a cadeia principal a adotar uma conformação desfavorável; Arg14 é o único resíduo que está em uma combinação generosamente permitida de ϕ/ψ no gráfico Ramachandran (DAWSON et al., 2006). Assim, tanto na estrutura com o MTX (DAWSON et al., 2006) quanto com os ligantes TTR, CYR, WSG3066, WSG3067 (e mesmo sem o ligante, estrutura WSG3065_{ausente}), a Arg14 apresenta-se em conformação desfavorável no gráfico Ramachandran.

Comparando as enzimas *LmPTR1* e *TbPTR1* no que diz respeito às interações com a arginina, em *LmPTR1* o Asp232 interage com Arg17. Esta interação é inexistente em *TbPTR1*, já que o resíduo correspondente nesta é a Pro210 (DAWSON et al., 2006).

A Leu208 participa de interações até 3,5 Å com os ligantes MTX, CYR, WSG3067. Porém um resíduo próximo, Leu 209, interage com o ligante TTR.

A Tabela 3.7 mostra as interações dos ligantes com a coenzima NADPH e ainda com algumas moléculas de água próximas. Observam-se mais moléculas de água interagindo junto ao ligante MTX; isto pode ser explicado devido a sua grande extensão.

Tabela 3.7 - Contatos (interações) ($\leq 3,5$ Å) entre a coenzima (NADPH), os inibidores MTX, TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 e moléculas e água no monômero C da *TbPTR1*

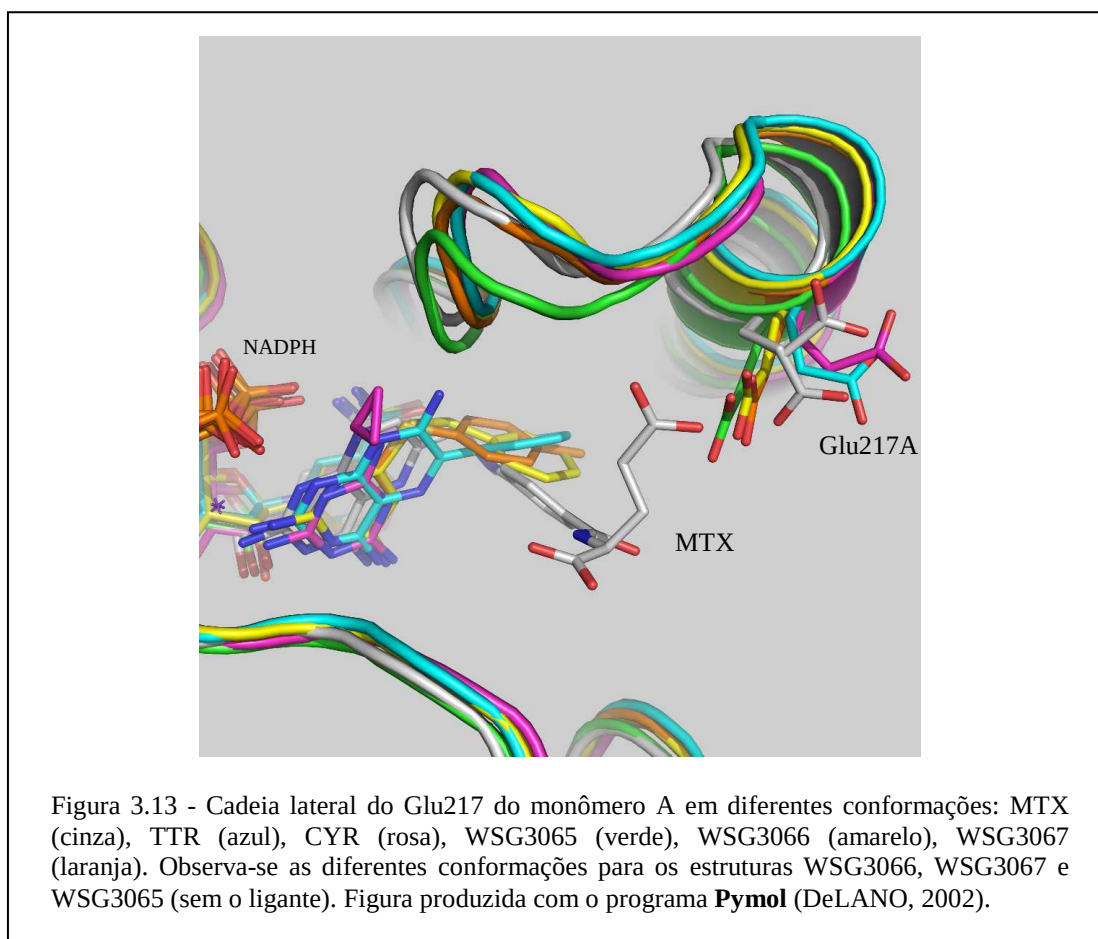
MTX		TTR		CYR		WSG 3066		WSG 3067	
MTX	NADPH	TTR	NADPH	CYR	NADPH	3066	NADPH	3067	NADPH
N1	NO2	N1	NO1	NAG	NO1	N3	NO1		
N1	AO2	N1	AO1	NAG	AO1	N3	AO1		
C2	AO2	C2	NC2	CAJ	NC2	C2	NO2	C2	NO2
		C2	NO2	CAJ	NO2				
				CAJ	AO1				
NA2	AO2	N2	NC2	NAB	NO2				
		N2	NO2	NAB	AO1	NAB	NO2	NAC	NC2
		N2	AO1			NAB	AO1	NAC	NO2
								NAC	AO1
N3	NC2	N3	NC2	NAE	NC2	N1	NC2	N1	NC2
N3	NO2	N3	NO2	NAE	NO2	N1	NO2	N1	NO2
		N4	NC5	NAA	NC5	NAA	NC5	NAB	NC5
				NAA	NC6	NAA	NC6		
N5	NC3								
N5	NC7								
C6	NO7								
C6	NC7								
C6	NN7								
N8	NO2								
C8A	NO2								
C9	NO7								
				CAI	NO2				
								CAF	NC7
								CAF	NO7
								CAF	HOH
								CAD	NO7
								CAD	HOH
NA4	HOH					NAA			
		N8	NO1						
						CAI	NC7		
						CAI	NN7		
						CAI	NO7		
						N3	HOH	N3	NO1
								N3	AO1
								CAL	HOH
								CAA	HOH
								CAO	HOH
O	HOH								
N	HOH								
O1	HOH								
O2	2HOH								
OE1	HOH								
OE2	2HOH								
N5	HOH								
CM	HOH								
CT	HOH								

Os caracteres em negrito indicam a natureza dos átomos.

3.5.2.3 Diferenças estruturais entre a proteína ligada ao MTX e aos demais ligantes

Ao contrário da estrutura com o MTX, a proteína não apresenta cadeia lateral alternada com duas conformações para o resíduo Glu217 nas estruturas com os ligantes TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067. Na estrutura com o MTX, apenas o monômero C não apresenta este resíduo com cadeia lateral alternada.

A figura 3.13 mostra as conformações do resíduo Glu217A para as estruturas TTR, CYR, WSG3066, WSG3067, MTX e WSG3065_{ausente} (figura feita com base no monômero A, sendo os monômeros B e D similares a este). O ligante MTX é extenso e na parte em que difere dos demais aproxima-se muito do Glu217A, impedindo este de assumir um valor de Chi1 de cerca de 170°, o qual é viável para os ligantes WSG3065_{ausente} (174,47°), WSG3066 (165,67°) e WSG3067 (170,45°).



3.5.2.4 *Conformações dos principais resíduos das estruturas com os inibidores*

Baseando-se o estudo no monômero C, comparando as estruturas com os ligantes TTR, CYR, WSG3066 e WSG3067 referentes as cadeias laterais dos resíduos Phe97C, Tyr174C, Ser95C, resíduos esses participantes da interação do ligante ao sítio ativo da enzima, todos apresentam-se basicamente na mesma conformação. O anel nicotinâmico do NADPH de todas as estruturas também possuem conformações semelhantes.

Ainda pode-se destacar conformações distintas das cadeias laterais dos resíduos Met213C, Glu231C e Leu209C na estrutura com a CYR, enquanto nas demais estruturas para o resíduo Met213C as conformações eram muito próximas; para Glu231C nas estruturas WSG3065_{ausente} e com WSG3066 e WSG3067 foram observadas conformações iguais, enquanto que para a estrutura com TTR a conformação desse resíduo foi similar à estrutura com MTX; para Leu209C as conformações foram similares nas estruturas WSG3066 e WSG3067, novamente apresentando a estrutura TTR uma conformação similar à MTX, e WSG3065_{ausente} apresentando uma conformação diferenciada aos demais.

3.5.2.5 *Estruturas superpostas*

Analisando-se os inibidores superpostos, pode-se concluir que o modo de ligação ocorre de maneira semelhante, isto é, os ligantes apresentam-se em orientações semelhantes (Figura 3.14).

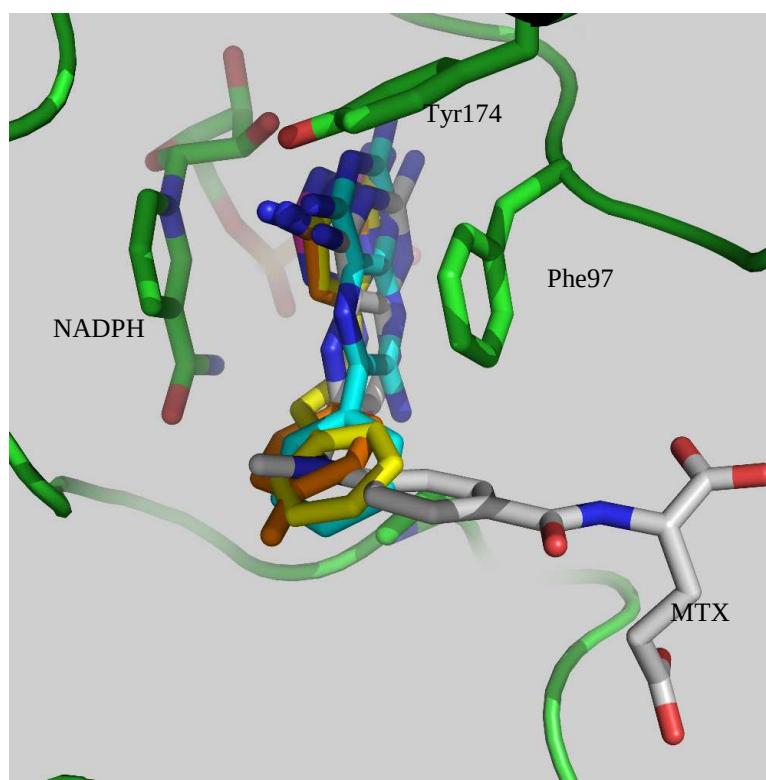


Figura 3.14 - Representação do sítio ativo da *TbPTR1* com os ligantes TTR (azul), CYR (rosa), WSG3066 (amarelo), WSG3067 (laranja) superpostos ao MTX (cinza). Várias interações chaves estão presentes na maioria das estruturas, especialmente o empilhamento formado pelo ligante, anel nicotinâmico da coenzima NADPH e a cadeia lateral da Phe97. Figura produzida com o programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

Ainda, a análise das tabelas 3.5 e 3.6 informa que alguns átomos dos ligantes se superpõem havendo certa correspondência entre eles. Nas tabelas, estes são indicados por estarem na mesma linha.

Além da presença ou ausência (ligante WSG3065) dos ligantes inibidores no sítio ativo, ainda encontrou-se outros ligantes, localizados fora e no próprio sítio ativo. Esses ligantes são espécies químicas que foram usadas na montagem das placas de cristalização como aditivos, agentes precipitantes ou ainda como crioprotetores junto à solução-mãe.

3.5.2.6 Outros Ligantes Presentes nos Sítios Ativos

A tabela 3.8 traz um resumo do conteúdo final refinado de cada sítio ativo das estruturas TTR, CYR, WSG3065_{ausente} (sem a presença do ligante), WSG3066 e WSG3067.

Tabela 3.8 - Ligantes inibidores e outros ligantes nos sítios ativos

	TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
Ligantes Inibidores (ocupação)	100%	100%	Ausente	100 %	Parcial 30-70 %
Outros ligantes no sítio ativo					
MONÔMERO A		GOL	DTT e GOL	DTT	DTO
MONÔMERO B		EDO e GOL	DTT e 2 GOL's	NA	DTO e GOL
MONÔMERO C		GOL	2DTT's e GOL	2GOL's	DTO
MONÔMERO D	EDO	GOL	2GOL's	DTT	DTO

ACT - acetato, DTO - ditioneitol oxidado, DTT - ditioneitol, EDO - etilenodiol, GOL - glicerol, NA - íon sódio.

A presença do etilenoglicol em algumas estruturas é explicada pelo fato deste ser um contaminante comum junto ao glicerol (KENYON et al., 1998).

3.5.2.7 Outros Ligantes, Fora do Sítio Ativo

A tabela 3.9 mostra um resumo dos ligantes encontrados fora do sítio ativo.

Tabela 3.9- Ligantes encontrados fora do sítio ativo

TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
EDO	ACT 2 EDO's 2 GOL's	6 ACT's 2 GOL's 5 NA's	2 ACT's	7 ACT's 2 GOL's NA

3.5.3 Cisteínas Modificadas

A tabela 3.10 mostra o resumo da situação das cisteínas 168. Vale ressaltar que essas cisteínas são próximas ao sítio ativo.

Tabela 3.10 - Situação das cisteínas 168 nas várias estruturas por monômeros.

CISTEÍNA168 / MONÔMERO	TTR	CYR	WSG3065_{ausente}	WSG3066	WSG3067
Cys168 / A	Normal	Oxidada	Oxidada	Alternada, oxidada e ligada covalentemente a DTT	Ligada covalentemente ao DTT
Cys168 / B	Normal	Normal	Oxidada	Normal	Ligada covalentemente ao DTT
Cys168 / C	Normal	Normal	Oxidada	Normal	Ligada covalentemente ao DTT
Cys168 / D	Normal	Normal	Oxidada	Alternada, oxidada e ligada covalentemente a DTT	Ligada covalentemente ao DTT

Oxidada com o sentido específico de reação com oxigênio.

Com exceção da estrutura com TTR cujas Cys168 não apresentaram alterações, todas as demais estruturas apresentaram alguma alteração em pelo menos um dos monômeros. A estrutura com o ligante CYR apresentou-se oxidada apenas no monômero A e é mostrada na Figura 3.15a. Já na estrutura sem ligante WSG3065_{ausente}, todos os monômeros apresentaram as Cys168 oxidadas (Figura 3.15b).

Na estrutura com o ligante WSG3066, as Cys168's dos monômeros B e C apresentaram-se normais enquanto que as dos monômeros A e D encontraram-se em duas conformações, uma oxidada e outra conformações ligada covalentemente a DDT (Figura 3.15c).

Na estrutura com o ligante WS3067, as Cys168's de todos os monômeros apresentaram-se ligadas covalentemente a DDT (Figura 3.15d).

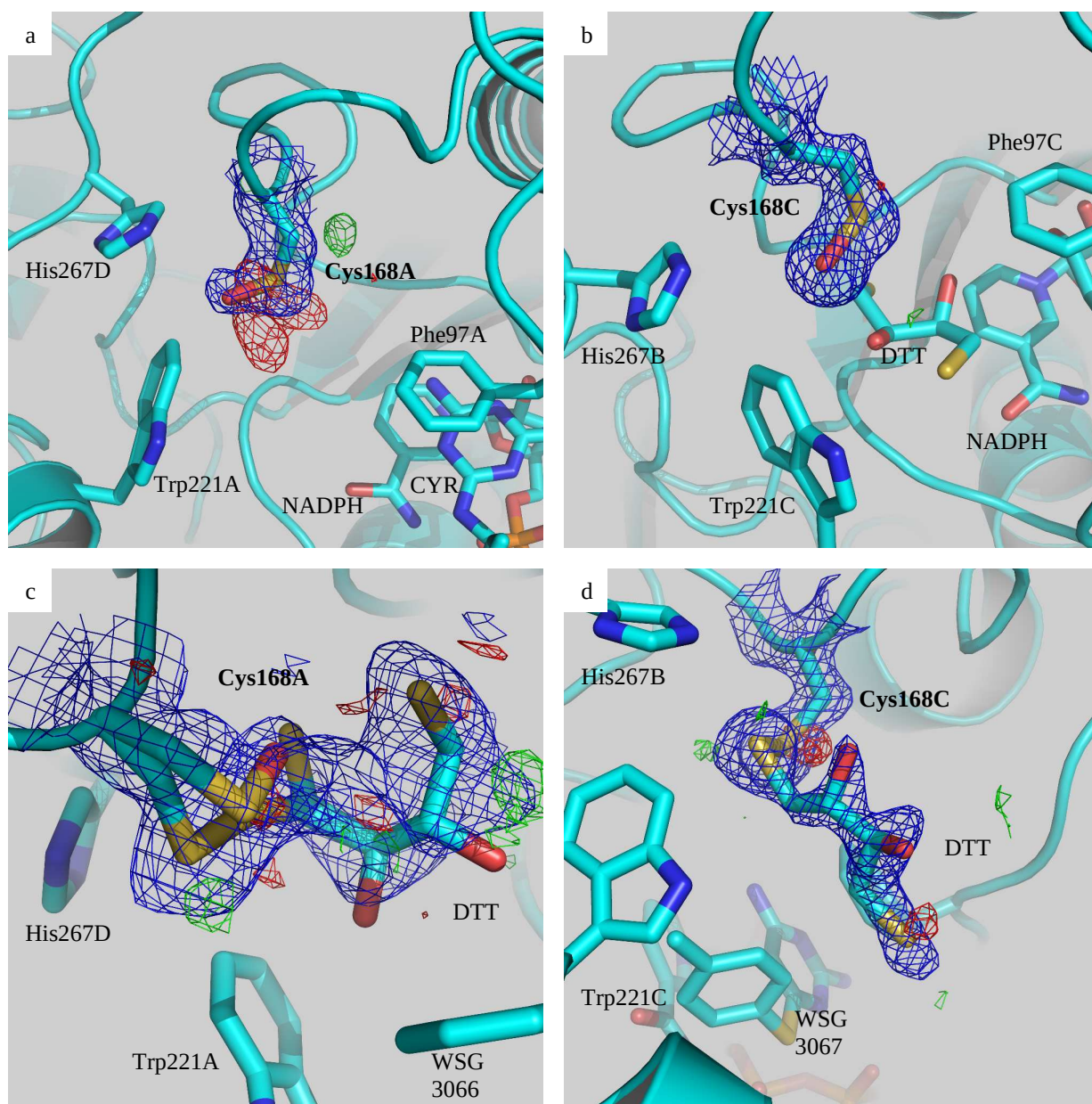


Figura 3.15 – Cisteínas modificadas. a) Cys168 oxidada presente no monômero A da estrutura da CYR, b) Cys168 oxidada presente no monômero C da estrutura da WSG3065, c) Cys168 alternada oxidada em uma conformação e presente noutra conformação ligada covalentemente ao DTT no monômero A da estrutura da WSG 3066, d) Cys168 modificada do monômero C ligada covalentemente ao DTT da estrutura com WSG3067. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1 σ de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3 σ (verde) e -3 σ (vermelho). Figuras produzidas pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

As figuras 3.16a-d demonstram a complexidade dos mapas de densidade eletrônica (de cor azul) e Fourier diferença (de cor verde e cor vermelha) ao redor das cisteínas antes de se fazer as devidas modelagens. Para a produção destes mapas em modo omissão *omit maps* realizou-se o procedimento de *annealing* virtual com a utilização do programa **Phenix** (ADAMS et al, 2004).

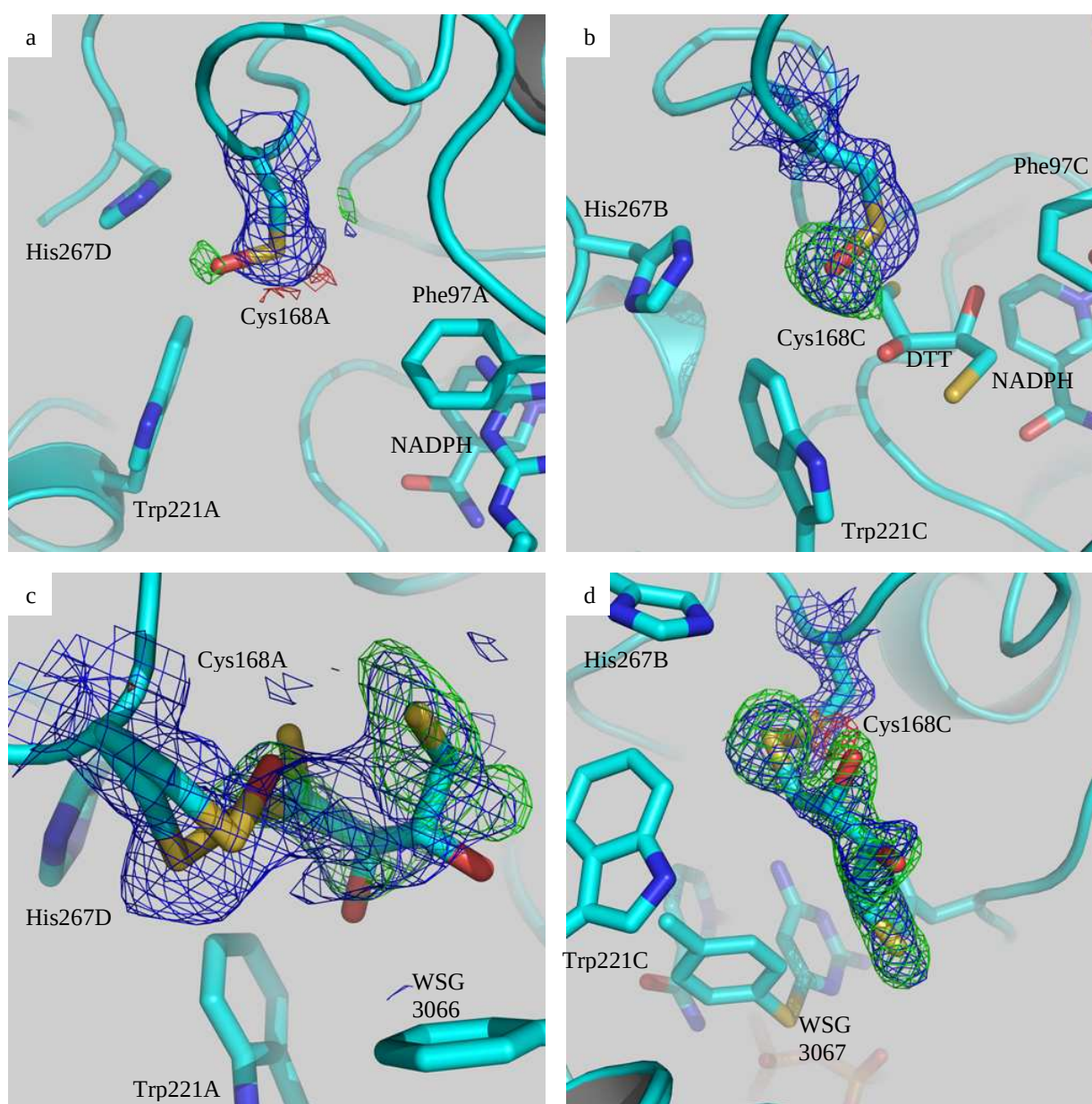


Figura 3.16 - Mapas de densidade eletrônica e Fourier diferença anteriores *omit maps* às modificações das Cys168. a) No monômero A da estrutura CYR e b) no monômero C da estrutura WSG3065, a densidade eletrônica indica a presença de oxidação, c) no monômero A da estrutura WSG3066 e d) no monômero C da estrutura WSG3067, há um continuum de densidade a partir da Cys168 indicando uma ligação covalente à mesma com uma molécula de DTT. Os mapas de densidade eletrônica (azul) foram desenhados com 1 σ de contorno, mapas de Fourier diferença com contornos em + 3 σ (verde) e -3 σ (vermelho). Figuras produzidas pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

Com base nesses resultados, especula-se sobre a importância da Cys168 para o sistema reacional e o conseqüente planejamento de novos inibidores, pois trata-se de um resíduo reativo e próximo do sítio ativo da enzima. As modificações observadas na Cys168 são intrigantes já que estas são incomuns na química protéica.

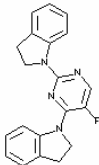
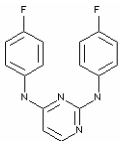
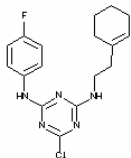
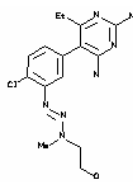
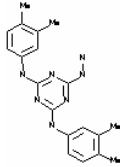
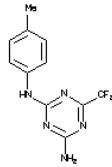
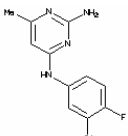
3.6 Busca virtual de novos ligantes

Sendo este trabalho parte de um projeto maior que é a busca de novos ligantes e futuras drogas tendo com alvo a *TbPTR1*, procurou-se virtualmente buscar outras moléculas de interesse, utilizando-se a informação obtida com as estruturas refinadas. Tais resultados são trocados com os colaboradores da Universidade de Dundee que aliados a estes juntam outros dados, sejam de estruturas cristalográficas, de testes virtuais usando programas diversos ou mesmo de medidas de cinética enzimática.

3.6.1 **Resultado da Busca pelos *Smiles***

A busca na base de dados ZINC (IRWIN e SHOICHET, 2005) por ligantes similares aos aqui apresentados através de *smiles* (WEININGER, 1988), produziu um subconjunto de 2685 moléculas. Este subconjunto foi submetido ao procedimento de docking no sítio ativo da *TbPTR1* pelo programa **eHits** (ZSOLDOS et al., 2006a) sem e com treinamento de pesos baseado nas estruturas cristalográficas. Os 7 melhores ligantes de acordo com o escore apurado mediante o treinamento dos pesos são apresentados na tabela 3.11, na qual ainda se compara com a classificação sem o treinamento, isto é, pesos *default* do programa.

Tabela 3.11 - Ligantes virtuais escalonados por escores

Classificação Com Treinamento	Código ZINC	Escore	xLogP	Massa Molecular / Da	Estrutura	Classificação Sem Treinamento	Escore
1	00515567	-9,702	4,35	332,3820		1	-9,560
2	00385329	-9,183	4,77	298,296		4	-9,474
3	00053807	-8,995	5,75	347,825		51	-8,249
4	00018051	-8,930	2,9	349,826		41	-8,337
5	00187221	-8,842	5,14	349,442		14	-8,797
6	00061082	-8,840	2,87	269,230		10	-8,840
7	00089184	-8,806	2,63	236,225		13	-8,806

Observa-se uma razoável re-classificação dos ligantes virtuais. Um destaque pode ser dado para duas estruturas a fim de posterior análise estrutural, os ligantes classificados em 4^o e 7^o lugares, que anteriormente foram classificados nos 41^o e 13^o lugares na busca *default* do

programa e, após o treinamento, subiram de posição. Estes ligantes são parecidos estruturalmente com os ligantes co-cristalizados com a *TbPTR1* apresentados neste trabalho e seguem as especificações da Regra de Cinco de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997), possibilitando ainda serem otimizados mediante derivações.

A figura 3.17a apresenta os 7 ligantes virtuais melhor ranqueados após o treinamento dos pesos, superpostos nas suas melhores posições. A figura 3.17b destaca os ligantes classificados em quarto (4^º) e sétimo (7^º) lugar.

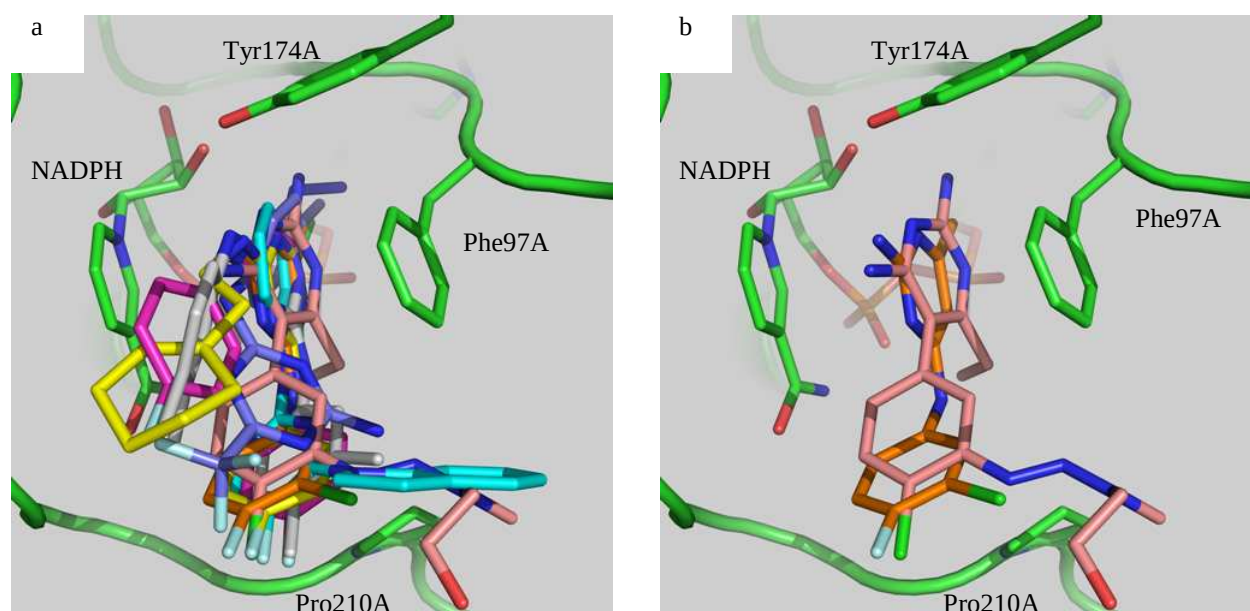


Figura 3.17 – Posição das melhores estruturas ranqueadas. a) A posição das sete melhores. b) Quarto (4^º) e sétimo (7^º) ranqueados, ligantes virtuais similares aos ligantes cristalográficos. Figuras produzidas pelo programa **Pymol** (DeLANO, 2002).

3.6.2 Resultado da Busca no subconjunto *Drug-Like*

Visando a identificação de novos inibidores ou estruturas básicas de inibidores, submeteu-se o subconjunto *drug-like* (LIPINSKI, 2000) do ZINC (IRWIN e SHOICHET, 2005) à busca virtual utilizando-se o programa **eHits** (ZSOLDOS et al., 2006a) e a estrutura

do sítio ativo da *TbPTR1* como revelada pelas estruturas cristalográficas. Devido a indisponibilidade corrente de poder computacional na Universidade Estadual de Ponta Grossa, somente parte deste subconjunto pode ser ensaiada virtualmente até o momento e ainda assim apenas com os pesos *default* do programa.

A tabela 3.12 mostra o resultados das 20 melhores moléculas ranqueadas pelo programa **eHiTS**, após ensaios com um total de 154.611 moléculas.

Tabela 3.12 – As 20 melhores moléculas ranqueadas do *drug-like* parcial
(continua)

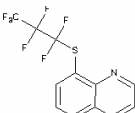
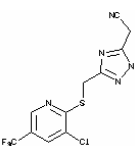
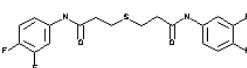
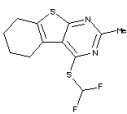
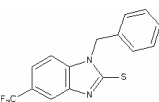
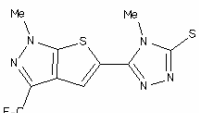
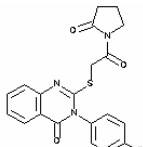
Classificação	Código ZINC	Escore	xLogP	Massa Molecular / Da	Estrutura
1	03138848	-11,1140	4,52	329,240	
2	01401267	-10,7870	2,37	333,726	
3	02745591	-10,4840	3,50	400,397	
4	00125644	-10,4010	3,84	286,372	
5	03268124	-10,2930	4,68	308,328	
6	00169158	-10,2140	3,06	319,337	
7	03514658	-10,1910	2,48	397,431	

Tabela 3.12 – As 20 melhores moléculas ranqueadas do *drug-like* parcial

(continua)

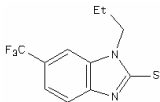
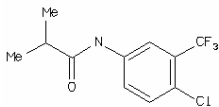
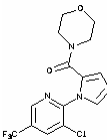
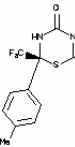
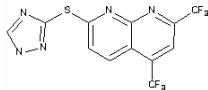
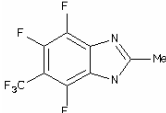
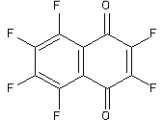
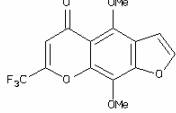
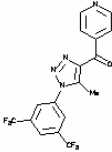
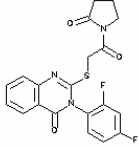
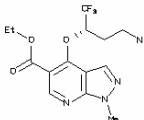
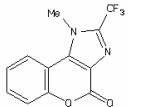
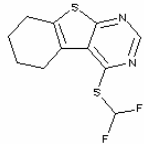
Classificação	Código ZINC	Escore	xLogP	Massa Molecular / Da	Estrutura
8	02647838	-10,1770	3,96	260,284	
9	00112275	-10,1750	3,74	265,662	
10	03133275	-10,1210	2,75	359,735	
11	00202951	-10,0300	3,72	315,320	
12	03118819	-9,9970	3,93	365,262	
13	04102567	-9,8850	2,66	254,133	
14	00262402	-9,8690	2,27	266,096	
15	00306064	-9,8630	3,20	314,215	
16	01392908	-9,8540	3,90	400,282	
17	03514636	-9,8380	2,79	415,421	

Tabela 3.12 – As 20 melhores moléculas ranqueadas do *drug-like* parcial
(conclusão)

Classificação	Código ZINC	Escore	xLogP	Massa Molecular / Da	Estrutura
18	04002383	-9,8210	0,59	347,317	
19	00211808	-9,8100	2,48	268,194	
20	00125854	-9,8010	3,75	272,345	

4 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram cristalizados oito complexos protéicos, cinco estruturas foram refinadas, quatro com inibidores. A Cristalografia por Raios X proveu importantes informações quanto ao modo de ligação de cada inibidor com a *TbPTR1*, fornecendo elementos para se planejar inibidores mais potentes e ainda de modo mais amplo auxiliar no desenvolvimento racional de drogas terapêuticas contra a doença do sono. Ainda, ganhou-se mais conhecimento sobre a reatividade da Cys168.

Ensaio virtuais foram realizados em busca por ligantes ou moléculas bioativas em bibliotecas virtuais de compostos. Foram aplicadas diferentes estratégias de ensaio virtual com o objetivo de identificar outros inibidores semelhantes aos cristalizados ou novas classes de inibidores da *TbPTR1*, porém, ainda análises futuras ainda são necessárias para caracterizá-los melhor. Ainda, é preciso cobrir todo a base de dados nas buscas virtuais.

Os resultados subsidiarão a otimização da inibição, contribuindo ao planejamento de futuros inibidores mais potentes e seletivos com os colaboradores da Universidade de Dundee.

5 REFERÊNCIAS

ACOSTA-SERRANO, A. et al. The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: Programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.1513-1518, 2001.

ADAMS, P.D. et al. Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic structure determination. **J. Synchrotron Rad**, v.11, p.53- 55, 2004. Disponível em: <http://www.phenix-online.org>

AKGUL, C. et al. In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. **Febs Letters**, v. 478, p.72-76, 2000.

ALBERTS et al. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 482.

BACCANARI, D.P.; KUYPER, L.F. Basis for selectivity of antibacterial diaminopyrimidines. **J. Chemotherapy**, v.5, p.393-399, 1993.

BARRY, J. D. et al. VSG gene control and infectivity strategy of metacyclic stage *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.91, p.93-105, 1998.

BASS, K.E.; WANG, C.C. The Invitro Differentiation of Pleomorphic *Trypanosoma brucei* from Blood-Stream Into Procyclic Form Requires Neither Intermediary Nor Short-Stumpy Stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.44, p.261-270, 1991.

BELLO, A.R. et al. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidised pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.11442-11446, 1994.

BLAKLEY, R.L. **Folates and Pterins: Chemistry and Biochemistry of pterins**, v.2 Wiley, New York, 1985.

BLAKLEY, R.L. Eukaryotic dihydrofolate reductase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.70, p.23-102, 1995.

BNF, **British National Formulary. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain**. 2004.

BOISTELLE, R.; ASTIER, J.P. Crystallization mechanisms in solution. **J. cryst. Growth**, v.90, p.14-30, 1988.

BOWIE, J. U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. **A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure.** *Science*, v.253, p.164, 1991.

BRÜNGER, A. T. et al. Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination, *Acta Cryst.* v.D54, p.905-921, 1998. Disponível em: <http://cns.csb.yale.edu/v1.2/>

BRUNGER, A. T. Free R-Value - A Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal-Structures. *Nature*, v.355, p.472-475, 1992.

BLOW, D. **Outline of Crystallography for Biologists.** 3 ed. Oxford University Press, 2003. 236p.

BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. N. **Protein Crystallography.** Academic Press. 1976, 238p.

CALDERONE, T. L.; STEVENS, R.D.; OAS, T.G. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, v.262, p.407-412, 1996.

CARRERAS, C.W. & SANTI, D.V. Mechanism and structure of thymidylate synthase. *Ann. Rev. Biochem*, v.64, p.721-762, 1995.

CHALFIE, M. et al. Green Fluorescent Protein As A Marker for Gene-Expression. *Science* v.263, p.802-805, 1994.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER, 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, v.50, p.760–763, 1994. Disponível em: <http://www.ccp4.ac.uk/main.html>

DAWSON, A. et al. Structure and reactivity of *Trypanosoma brucei* pteridine reductase: inhibition by the archetypal antifolate methotrexate. *Molecular Microbiology*, v.61(6), p.1457–1468, 2006.

De AZEVEDO, W.F. et al. Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.308(3), p.545-552, 2003.

DIEDERICHS, K.; KARPLUS, A. P. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nature Structural Biology*, v.4, p.269-275, 1997.

DELANO, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System.** San Carlos, CA: DeLano Scientific, 2002. Disponível em: <http://www.pymol.org>

DEKKER. Department of Biochemistry & Biophysics, Texas A&M University, College Station, TX77843-2128, USA **High Throughput Crystallography**, 2003.

DENISE, H.; BARRET, M.P. Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. **Biochemical Pharmacology** v.61, p.1-5, 2001.

DRENTH, J. **Principles of Proteins X-Ray Crystallography**. Springer-Verlag. New York.USA. 1994.

DUAX, W.L. et al. Rational proteomics I. Fingerprint identification and cofactor specificity in the short-chain oxidoreductase (SCOR) enzyme family. **Proteins**, v.53, p.931– 943, 2003.

DUCRUIX, A.; GIEGE, R. **Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins; A Practical Approach**. IRL Press, Oxford University Press,1992.

ELWELL, L.P. et al. In vitro and in vivo efficacy of the combination trimethoprim-sulfamethoxazole against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.29, p.1092-1094, 1986.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. **Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics**. Acta Cryst D60, p.2126-2132, 2004. Disponível em: <http://www.ysbl.york.ac.uk/~emsley/coot>

EWING, T. J. A. et al. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.15, p.411-428, 2001.

FINDLAY, J.B.C. **Protein Purification Methods: a Practical Approach**. IRL Press, Oxford University Press, 1989.

FOSTER, M.J. Molecular modelling in structural biology. **Micron**, v.33, p.365-384, 2002.

FORMAN, M.D. et al. Nigh level, context dependent misincorporation of lysine for arginine in *Saccharomyces cerevisiae* a1 homeodomain expressed in *Escherichia coli*. **Protein Science**, v.7, p.500-503, 1998.

GAO, X.G. et al. Reactivation of triosephosphate isomerase from three trypanosomatids and human: effect of Suramin. **Biochemical Journal**, v.332, p.91-96, 1998.

GARMAN, E. **Cool data: quantity and quality**. Acta Crystallogr D55 p.1641-1653,1999.

GARMAN, E.; NAVE, C. **Radiation damage to crystalline biological molecules: current view.** J Synchrotron Rad, v.9, p.327-328, 2002.

GIACOVAZZO, G. et al. **Fundamentals of crystallography.** Oxford University Press, 1992.

GOUET, P.; et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v.15, p.305–308, 1999.

GOURLEY, D.G. et al. Pteridine reductase mechanism correlates pterin metabolism with drug resistance in trypanosomatid parasites. **Nat. Struct. Biol**, v.8, p.521-525, 2001.

GRAHAM, S.V.; WYMER, B.; BARRY, J. D. Activity of a trypanosome metacyclic variant surface glycoprotein gene promoter is dependent upon life cycle stage and chromosomal context. **Molecular and Cellular Biology**, v.18, p.1137-1146, 1998.

HAMPEL, A. et al. Single Crystals of Transfer RNA from Formylmethionine and Phenylalanine Transfer RNA's. **Science**, v.162, p.1384- 1387, 1968

HANNAERT, V. et al. The putative effector-binding site of *Leishmania mexicana* pyruvate kinase studied by site-directed mutagenesis. **Febs Letters** v.514, p.255-259, 2002.

HANSON, L.B.; SCHALL, C.A.; BUNICK, G.J. New techniques in macromolecular cryocrystallography: macromolecular crystal annealing and cryogenic helium. **J. Struct Biol**, v.142(1), p.77-87, 2003

HARDY, L.W. et al. Biochemical and genetic tests for inhibitors of *Leishmania* pteridine pathways. **Experimental Parasitology**, v.87, p.157-169, 1997.

HARTMAN, P.G. Molecular aspects and mechanism of action of DHFR inhibitors. **J. Chemotherapy**, v.5, p.369-376, 1993.

HELLIWELL, J.R. **Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation.** Cambridge University Press, 1992.

HOOFT, R.W.W. et al. What_check: Errors in protein structures. **Nature**, v.381, p.272, 1996.

HYDE, J.E. **Molecular Parasitology**, Open University Press, Milton Keynes, UK, 1990a.

HYDE, J. E. The dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene in the drug resistance of malaria parasites. **Pharmacology and Therapeutics** v.48, p.45-59, 1990b.

INKPEN, M., PALMER, R.A., LADD, M.F.C. **Structure Determination by X-Ray Crystallography**. 4 ed. Boston: Kluwer, 2003, 864 p.

IRWIN J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. **J. Chem. Inf. Model**, v.45(1), p.177-82, 2005. Disponível em: <http://blaster.docking.org/zinc/>

JEFFREY, W. K. et al. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v.59, p.532-534, 2003.

JOHNSON, M.S. et al. Knowledge-based protein modeling. **Crit. Rev.Biochem. Mol. Biol.**, v.29, p.1-70, 1994.

JONES, T.A. et al. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. **Acta Cryst. A**, v.47, p.110-119, 1991.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v.22(12), p.2577-2637, 1983.

KABSCH, W. XDS: Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. **J. Appl. Cryst**, v26, p.795-800, 1993. Disponível em: <http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/~kabsch/xds/>

KEISER, J.; STICH, A.; BURRI, C. New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development. **Trends in Parasitology**, v.17, p.42-49, 2001.

KENYON, A.S. et al. Simple, At-Site Detection of Diethylene Glycol/Ethylene Glycol Contamination of Glycerin and Glycerin-Based Raw Materials by Thin-Layer Chromatography. **Journal of AOAC Internacional**, v.81, p.44-50, 1998.

KENNEDY, P.G.E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.496-504, 2004.

KIRCHOFF, L.V. et al. African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness). **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v.2, p.66-69, 2000.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T.A. xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Cryst. D**, v.52, p.826-828, 1996.

KNIGHTON, D.R. et al. Structure and kinetic channeling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. **Nature Structural Biology**, v.1, p.1816-194, 1994.

KRIMINSKI, K. et al. Flash-cooling and annealing of protein crystals. **Acta Crystallogr**, D58, p.459-471, 2002.

KUBINYI, H. Structure-based drug design. **Chimica Oggi-Chemistry Today**, v.16, p.17-22, 1998.

KUBINYI, H. Chance favors the prepared mind - From serendipity to rational drug design. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v.19, p.15-39, 1999.

KUNAPULI, S.P.; DELACADENA, R.A.; COLMAN, R.W. Bacterial Expression of Biologically-Active High-Molecular- Weight Kininogen Light Chain. **Thrombosis and Haemostasis**, v.67, p.428-433, 1992.

KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J.; Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. **J. Biol. Chem**, v.264, p.20496-20501, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v.227, p 680, 1970.

LASKOWSKI, R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. App. Cryst**, v.26, p.283, 1993. Disponível em: <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p.102.

TULLOCH, L.B. **Pyruvate Kinase from *Leishmania mexicana* as a Chemotherapeutic Target**. 2005, 381f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Institute of Structural and Molecular Biology School of Biological Science, University of Edinburgh, Edinburgh, fev.2005.

LIPINSKI, C.A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v.23, p.3-25, 1997.

LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **J. Pharmacol Toxicol Methods**, v.44(1), p.235-49, 2000.

LU, K.V. et al. Mistranslation of A Tga Termination Codon As Tryptophan in Recombinant Platelet-Derived Growth-Factor Expressed in Escherichia-Coli. **Biochemical Journal**, v.309, p.411-417, 1995.

LYNE, P.D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug Discovery Today**, v.7, p.1047-1055, 2002.

MIKOL, V.; RODEAU, J.L.; GIEGE, R. Experimental-Determination of Water Equilibration Rates in the Hanging Drop Method of Protein Crystallization. **Analytical Biochemistry**, v.186, p.332-339, 1990.

McMARTIN, C.; BOHACEK, R.S. QXP: Powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.11, p.333-344, 1997.

MONDRAGON, A. et al. Optimization of conditions for growth of wild-type and genetically transformed *Trypanosoma cruzi* on agarose plates. **Parasitology**, v.118, p.461-467, 1999.

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

McREE, D.E. **Practical Protein Crystallography**. Academic Press, 1999.

NAYAL; DI CERA. Valence Screening of Water in Protein Crystals Reveals Potential Na⁺ Binding Sites. **J.Mol.Biol**, v.256, p.228-234, 1996.

NARE, B. et al. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitology**, v.114, p.S101-110, 1997a.

NARE, B.; HARDY, L.W.; BEVERLEY, S.M. The roles of pteridine reductase 1 (PTR1) and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) in the pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. **J. Biol. Chem**, v.272, p.13883-13891, 1997b.

NISHI, S. et al. Localization of the Estrogen-Binding Site of Alpha-Fetoprotein in the Chimeric Human Rat Proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.3102-3105, 1991.

MURSHODOV, G.N.; VAGIN, A.A.; DODSON, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallographica D**, v.53, p.240-255, 1997. Disponível em: <http://www.ysbl.york.ac.uk/~garib/refmac/>

OBRADORS, N. et al. Site-directed mutagenesis studies of the metal-binding center of the iron-dependent propanediol oxidoreductase from *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v.258, p.207-213, 1998.

OLLIVIER, G.; LEGROS, D. African human trypanosomiasis: History of treatment successes and failures. **Tropical Medicine & International Health**, v.6, p.855-863, 2001.

OPPERMANN, U. et al. Short-chain dehydrogenases/ reductases (SDR): the 2002 update. **Chem Biol Interact**, v.143-144, p.247-253, 2003.

PEPIN, J.; MILORD, F. The Treatment of Human African Trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**, v.33, p.1-47, 1994.

PERRAKIS, A. et al. wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple refined dummy atomic models. **Acta Cryst. D**, v.53, p.448-455, 1997. Disponível em: <http://www.embl-hamburg.de/ARP/>

PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v.3, p.263-281, 1992.

POWELL, H.R. The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography** v.55, p.1690-1695, 1999. Disponível em: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/frames/>

RAYMENT, I. Small-scale batch crystallization of proteins revisited: An underutilized way to grow large protein crystals. **Structure**, v.10, p.147-151, 2002.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. **Adv. Prot. Chem**, v23, p.283, 1968.

RAREY, M.; WEFING, S.; LENGAUER, T. Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. **Journal of Computer-Aided Molecular Design** v.10, p.41-54, 1996.

RATTI, E.; TRIST, D. Continuing evolution of the drug discovery process in the pharmaceutical industry. *Pure and Applied Chemistry*, v.73, p.67-75, 2001.

READ, R.J. Sigmaa - Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. **Acta Cryst. A**, v.42, p.140-149, 1986.

RIÈS-KAUTT, M.M.; DUCRUIX, A. relative effectiveness of various ions on the solubility crystal growth of lysozyme. **J. Biol. Chem**, v.264, p.745, 1989.

ROBELLO, C. et al. A pteridine reductase gene *ptr1* contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.90, p.525–535, 1997.

ROWLETT, R. **X-Ray Crystallography Methods** Department of Chemistry, Colgate University, 2005.

SANTOS FILHO, O.A.; De ALENCASTRO, R. B. Protein homology modeling. **Quim. Nova**, v.26, p.253-259, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000200019&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 21 jan. 2007.

SCHNECKE, V.; KUHN, L.A. Virtual screening with solvation and ligand-induced complementarity. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v.20, p.171-190, 2000.

SCHUETTELKOPF, A.W.; VAN AALTEN, D.M.F. **PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes**, Disponível em: <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/>. 2004. Acesso em: 17 nov. 2005.

SCHULZ-GASCH, T.; STAHL, M. Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools. **Journal of Molecular Modeling**, v.9, p.47-57, 2003.

SCHORMANN, N. et al. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* pteridine reductase 2 in complex with a substrate and an inhibitor. **J Struct Biol**, v.152, p.64–75, 2005.

SCHÜTTELKOPF, A.W. et al. Structures of *Leishmania major* pteridine reductase complexes reveal the active site features important for ligand binding and to guide inhibitor design. **J Mol Biol**, v.352, p.105–116, 2005.

SCOPES, R.K. **Protein Purification, Principles and Practice**. Springer, 1994.

SENKOVICH, O. et al. *Trypanosoma cruzi* genome encodes a pteridina reductase 2 protein. **Molecular & Biochemical parasitology**, v.127, p. 89-92, 2002.

STOUT, G.H.; JENSEN, L.H. **X-Ray Structure Determination, A Practical Guide**. Wiley. 1989.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. England: Freeman and Company, 1995, 1064p.

SZKLARZ, G.D.; ORNSTEIN, R.L.; HALPERT, J.R. Application of 3-Dimensional Homology Modeling of Cytochrome- P450 2B1 for Interpretation of Site-Directed Mutagenesis Results. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v.12, p.61-78, 1994.

THEN, R.L. et al. **Chemistry and Biology of Pteridines and folates**. Ed. Ayling, J.E. et al., Plenum Press New York, p.533-536, 1993.

TWYMAN, R.M. et al. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends in Biotechnology**, v.21, p.570-578, 2003.

VAGUINE et al. **Sfcheck**: a unified set of procedure for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with atomic model. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr**, v.55, p.191–205, 1999. Disponível em: <http://www.ccp4.ac.uk/html/sfcheck.html>

VALENTIN, G. et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase - A site-directed mutagenesis study. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.18145-18152, 2000.

VALENTINI, G. et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase - Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.23807-23814, 2002.

VAN DEN ABEELE, J. et al. *Trypanosoma brucei* spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. **Parasitology**, v.118, p.469-478, 1999.

VAN SCHAFTINGTON, E.; OPPERDOES, F.R.; HERS, H.G. Effects of various metabolic conditions and of the trivalent arsenical melarsen oxide on intracellular levels of fructose 2,6-bisphosphate and of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. **European Journal of Biochemistry**, v.166, p.653-661, 1987.

VERLINDE, C.L.M. et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates**, v.4, p.50-65, 2001.

WALTERS, W.P.; STAHL, M.T.; MURCKO, M.A. Virtual screening - an overview. **Drug Discovery Today**, v.3, p.160-178, 1998.

WANG, C.C. Validating targets for antiparasite chemotherapy. **Parasitology**, v.114, p.S31-S44, 1997.

WANG, M.Y.; VAKHARIA, V.; BENTLEY, W.E. Expression of Epoxide Hydrolase in Insect Cells - A Focus on the Infected Cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, p.240-246, 1993.

WARD, R.A.; WEST, H.J. In Vitro-Culture of *Trypanosoma brucei*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, p.159, 1970.

WEBSTER, L.T. In “**The Pharmacological Basis of Therapeutics**” **Section X. Chemotherapy of Parasitic Infections**. Oitava edição, Pergamon Press. New York, p.954 - 959, 978 - 998 e 1008 – 1017, 1990.

WEININGER, D. SMILES, a chemical language and information system. Introduction to methodology and encoding rules', **J. Chem. Inf. Comput. Sci**, v.28, p.31- 36, 1988.

WESTBROOK, J. et al. **ValidationPDB** - Validation of protein structures for protein data bank. *Methods Enzymol*, 2003. Disponível em: <http://sw-tools.pdb.org/>

WHO- THE WORLD HEALTH REPORT. Life in the 21st Century, a vision for all. **World Health Organisation**, Geneva, 1998.

WHO- THE WORLD HEALTH REPORT. Chagas Disease, Chile: Certification of Interruption of Transmission. **Weekly Epidemiological Record**, v.2, p.10-12, 2000a.

WHO- THE WORLD HEALTH REPORT. **WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-Prone Infectious Diseases**. **World Health Organisation**. Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/en/WHO_Report_Infectious_Diseases.pdf. 2000b. Acesso em: 15 dez. 2005.

WISER MF. **Kinetoplastid Biology and Human Disease**. Disponível em: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html>. Acesso em: 15 dez. 2005.

ZHAO, L.J.; NARAYAN, O. A Gene-Expression Vector Useful for Protein-Purification and Studies of Protein-Protein Interaction. **Gene**, v.137, p.345- 346, 1993.

ZSOLDOS, Z. et al. eHiTS: A new fast, exhaustive flexible ligand docking system. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2006a (in press). Disponível em: http://www.simbiosys.ca/ehits/ehits_publications.html

ZSOLDOS, Z. et al. eHiTS: An Innovative Approach to the Docking and Scoring Function Problems. **Current Protein and Peptide Science**, 2006b (in press). Disponível em: http://www.simbiosys.ca/ehits/papers/Zsoldos-MS_eHiTS_5.3.pdf . Acesso em: 18 jan. 2007.