

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - DOUTORADO
UEL/UEPG/UNICENTRO

ROBSON RODRIGO MIRANDA

ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS HISTIDINA AMÔNIO LIASE,
IMIDAZOLONA PROPIONASE DE *Trypanosoma cruzi* E
GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Candida albicans*

PONTA GROSSA
2021

ROBSON RODRIGO MIRANDA

ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS HISTIDINA AMÔNIO LIASE,
IMIDAZOLONA PROPIONASE DE *Trypanosoma cruzi* E
GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Candida albicans*

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva

M672 Miranda, Robson Rodrigo
Estudos estruturais das enzimas Histidina Amônio Liase, Imidazolona Propionase de *Trypanosoma cruzi* e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Candida albicans* / Robson Rodrigo Miranda. Ponta Grossa, 2021.
91 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Silva.

1. Histidina amônio liase. 2. Imidazolona propionase. 3. *Trypanosoma cruzi*.
4. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. 5. *Candida albicans*. I. Iulek, Jorge. II.
Silva, Marcio. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 540



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

ROBSON RODRIGO MIRANDA

**“ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS HISTIDINA AMÔNIO LIASE, IMIDAZOLONA PROPIONASE
DE *Trypanosoma cruzi* E GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Candida albicans*”**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química
(Associação UEL/UEPG/UNICENTRO) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Prof. Dr. Jorge Iulek (Orientador)
UEPG/PR

Prof. Dr. Marcio Silva (Coorientador)
UTFPR/Ponta Grossa/PR

Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães
ICC/Fiocruz

Profa. Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt
UTFPR/Ponta Grossa/PR

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto
UEPG/PR

Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira
UEPG/PR

Ponta Grossa, 17 de março de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Iulek, Professor(a)**, em 06/04/2021, às 16:00, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Mazer Etto, Professor(a)**, em 07/04/2021, às 22:27, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Romaiana Picada Pereira, Professor(a)**, em 08/04/2021, às 09:09, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **MARCIO SILVA, Usuário Externo**, em 14/04/2021, às 20:06, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Vitória Messias Bittencourt, Usuário Externo**, em 22/04/2021, às 17:01, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Gomes Guimarães, Usuário Externo**, em 03/05/2021, às 10:58, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0453848** e o código CRC **7901C421**.

Dedico aos meus pais, José e Roselina. Meus irmãos William e Jocelianna. Agradeço à vocês por tudo que fizeram e ainda tem feito por mim. Agradeço por estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas decisões. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o autor da vida, que me deu saúde, coragem, força e equilíbrio para continuar até o fim essa maravilhosa e difícil caminhada.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, dando apoio, incentivo e compreensão para que eu pudesse seguir em frente e, principalmente, *in memoriam* de meu pai.

Aos amigos Alfonso Sánchez Ayala e Sheila Boreiko Sánchez pela amizade e companheirismo de longa data. Ao colega de laboratório Renato Ferras Penteado pela ajuda na parte computacional do projeto.

Ao Prof. orientador Dr. Jorge Iulek por ter-me dado oportunidade para o desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa e também ao Prof. coorientador Dr. Marcio Silva por ter acreditado no meu potencial, repassando ensinamentos e confiança durante todo esse período.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber e à Raíssa Melo pelo fornecimento das bactérias contendo os gene codificantes das enzimas *TcHAL* e *TcIP*.

Ao Complexo de laboratório multiusuários da UEPG, pela infraestrutura, e aos funcionários pela colaboração.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa Associado de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização deste projeto.

À Dra. Beatriz Gomes Guimarães e à Dra. Maria Cristina Nonato pelo auxílio no resfriamento de cristais no Instituto Carlos Chagas e coleta de dados no Síncrotron de Soleil. Ao Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio pelo transporte de cristais do ROBOLAB ao IFSC-USP.

Aos órgãos financiadores do projeto, Fundação Araucária e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelas bolsas, e INBEQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas) e CNPq pelos recursos para aquisição de equipamentos e reagentes, (573607/2008-7 e 08/57910-00).

RESUMO

O estudo da estrutura tridimensional (3D) de proteínas nos ajuda a entender as relações entre sequência de aminoácidos, estrutura e função, o que é essencial para melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade dos organismos e para o desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, o presente trabalho visa determinar as estruturas tridimensionais das enzimas Histidina Amônio Liase e Imidazolona Propionase de *Trypanosoma cruzi* (TcHAL, TcIP) e a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Candida albicans* (CaGAPDH). Com a estrutura refinada da TcHAL, observou-se a ausência do chamado domínio de proteção do sítio ativo, diferentemente de estruturas 3D previamente conhecidas, como de Fenilalanina Amônio Liasas de plantas e fungos, portanto, ela é a primeira estrutura resolvida de uma amônio-liase eucariótica que não possui este domínio. A enzima TcIP foi até expressa em *E. coli* (DE3) usando-se o vetor pET-28a(+), porém, os testes de purificação por cromatografia de afinidade com diferentes íons metálicos imobilizados não foram suficientes para obtê-la numa pureza adequada para os ensaios de cristalização; então, sua estrutura foi hipotetizada por modelagem por homologia. A enzima CaGAPDH foi expressa em *E. coli* (DE3) utilizando-se o vetor pET-28a(+) e purificada por cromatografia de afinidade a Ni^{+2} . Cristais da CaGAPDH apareceram em 3 dias após a montagem das gotas e o melhor difratou a uma resolução máxima de 2,98 Å. A indexação e o processamento mostraram que o cristal pertence ao grupo de espaço $P2_1$ e apresenta simetria não cristalográfica translacional. Estudo posterior ao refinamento da estrutura mostrou que a CaGAPDH apresenta duas mutações conjugadas, Glu296 no lugar de uma comum Ala e Ala258 no lugar de comuns Lys ou Asn, resíduos frente a frente, que possivelmente levam à conservação de propriedades estruturais. Desta forma, os resultados apresentados servem de suporte para investigações posteriores que esclareçam a participação das enzimas HAL e IP no metabolismo do *T. cruzi*, assim como da GAPDH em *C. albicans*. Ademais, as informações estruturais ora apresentadas poderão contribuir para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para doença de Chagas e também para a candidíase, ante posterior comprovação da CaGAPDH como alvo molecular.

Palavras-chave: Histidina amônio liase. Imidazolona propionase. *Trypanosoma cruzi*. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. *Candida albicans*.

ABSTRACT

The study of the three dimensional (3D) structure of proteins helps us to understand the relations among amino acid sequence, structure and function, what is essential for a better understanding of the pathogenic mechanisms of organisms and for the development of new drugs. In this context, the present work aims to determine the three dimensional structures of enzymes Histidine Ammonia-Lyase and Imidazolone Propionase from *Trypanosoma cruzi* (TcHAL, TcIP) and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Candida albicans* (CaGAPDH). After TcHAL structure refinement, one could observe the absence of the so called protection domain of the active site, what is different to previously known 3D structures of Phenylalanine Ammonia-Liases from plants and fungi, therefore, it is the first solved structure of an eukaryotic ammonia lyase that does not present this domain. The TcIP enzyme was even expressed in *E. coli* (DE3) using the vector pET-28a(+), however, the purification tests by affinity chromatography with different metal ions were not sufficient to obtain it in an adequate purity for the crystallization trials; therefore, its structure was hypothesized by homology modeling. The CaGAPDH enzyme was expressed in *E. coli* (DE3) using the vector pET-28a(+) and purified by Ni⁺² affinity chromatography. Crystals from CaGAPDH appeared in 3 days after the drops were assembled and the best one diffracted to a maximum resolution of 2.98 Å. Indexing and processing showed that the crystal belongs to the space group *P*2₁ and presents translational non-crystallographic symmetry. A study after structure refinement showed that CaGAPDH has two conjugated mutations, Glu296 on place of a common Ala and Ala258 on place of common Lys or Asn, face to face residues, which possibly maintain structural properties. Thus, the results presented here provide support for further investigations to explain the participation of the enzymes HAL and IP in the metabolism of *T. cruzi*, as well as for GAPDH in *C. albicans*. In addition, the structural information presented here may contribute to the development of new chemotherapeutic agents for Chagas disease and also for candidiasis further evidence of CaGAPDH as a molecular target.

Keywords: Histidine ammonia-lyase. Imidazolone propionase. *Trypanosoma cruzi*. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação das estruturas químicas das principais drogas usadas para o tratamento da doença de Chagas.....	20
Figura 2	– Conversão de L-histidina a urocanato.....	21
Figura 3	– Mecanismo proposto para biossíntese do MIO.....	22
Figura 4	– Mecanismo catalítico proposto para Histidina Amônio Liase (HAL).....	23
Figura 5	– Conversão de 4-imidazolona-5-propionato a N-formimino-L-glutamato.....	24
Figura 6	– Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas homólogas representativas.....	31
Figura 7	– Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo modificado MIO do monômero A.....	32
Figura 8	– Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo Cys393	33
Figura 9	– Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo CSS393 ligado a um átomo de enxofre.....	34
Figura 10	– Parte do alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas homólogas a <i>TcHAL</i> (Fig. 6).....	34
Figura 11	– Gráfico de Ramachandran da enzima <i>TcHAL</i>	36
Figura 12	– Parte do alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas homólogas representativas (Fig. 6). Destaque para o resíduo Ala419.....	37
Figura 13	– Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.....	38
Figura 14	– Estrutura tridimensional da <i>TcHAL</i>	40
Figura 15	– Diagrama de topologia do monômero da <i>TcHAL</i>	40
Figura 16	– Qualidade do ajuste na densidade eletrônica para resíduos do sítio ativo e seletividade de substrato de <i>TcHAL</i> do monômero C.....	41
Figura 17	– Sobreposição de monômero de <i>TcHAL</i> e <i>PpHAL</i>	43
Figura 18	– Sobreposição de resíduos do sítio ativo.....	43
Figura 19	– Sobreposição dos monômeros da <i>TcHAL</i> e <i>PcPAL</i>	44
Figura 20	– Estrutura tridimensional da <i>PcPAL</i>	44
Figura 21	– Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente aos testes de expressão da <i>TcIP</i>	46
Figura 22	– Testes de purificação da <i>TcIP</i> por cromatografia de afinidade.....	47
Figura 23	– Gráfico de Ramachandran da enzima <i>TcIP</i>	49

Figura 24	– A) Estrutura da enzima <i>TcIP</i> obtida por modelagem por homologia. B) Topologia de <i>TcIP</i> gerado pelo PDBSum.....	49
Figura 25	– Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas <i>Bsub</i> (código PDB: 2BB0) e <i>Atum</i> (código PDB: 2PUZ).....	50
Figura 26	– Conversão de gliceraldeído 3-fosfato (G3P) a 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BGP).....	54
Figura 27	– Mecanismo catalítico proposto para Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).....	55
Figura 28	– Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente aos testes de expressão da <i>CaGAPDH</i>	60
Figura 29	– Purificação da <i>CaGAPDH</i> por cromatografia de afinidade.....	61
Figura 30	– A) Cristais da <i>CaGAPDH</i> . B) Estrutura tridimensional da <i>CaGAPDH</i>	62
Figura 31	– Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima <i>CaGAPDH</i> com a proteína disponível no PDB, GAPDH de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
Figura 32	– Gráficos de Ramachandran da enzima <i>CaGAPDH</i>	66
Figura 33	– Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.....	69
Figura 34	– Diagrama de topologia gerado pelo PDBSum.....	70
Figura 35	– Alinhamento da sequência de aminoácido da <i>CaGAPDH</i> com as das homólogas representativas.....	72
Figura 36	– Estrutura do monômero A da <i>CaGAPDH</i> com seus resíduos incomuns indicados.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Dados estatísticos do processamento e refinamento.....	35
Tabela 2	– Valores globais de RSCC e RSR por monômero.....	37
Tabela 3	– Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C, e D) correspondentes ao tetrâmero.....	41
Tabela 4	– Proteínas homólogas à <i>TcHAL</i> utilizadas nas comparações estruturais.....	42
Tabela 5	– Dados estatísticos do processamento, refinamento e validação.....	63
Tabela 6	– Valores globais de RSCC e RSR por monômero.....	68
Tabela 7	– Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C, e D) correspondentes ao homotetrâmero.....	71
Tabela 8	– Valores de RMSD (Å) entre Ca's para os quatro monômeros da <i>CaGAPDH</i>	71
Tabela 9	– Valores de RMSD entre Ca's referentes às sobreposição de <i>CaGAPDH</i> com as estruturas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (código PDB 2I5P), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (código PDB 4IQ8), <i>Homo sapiens</i> 1 (código PDB 1U8F) e <i>Homo sapiens</i> 2 (código PDB 3H9E), <i>Escherichia coli</i> (código PDB 1S7C) <i>Oryza sativa</i> (código PDB 3E5R), <i>Schistosoma mansoni</i> (código PDB 7JH0), <i>Trypanosoma cruzi</i> (código PDB 4LSM).....	73

LISTA DE SIGLAS

AvPAL	Fenilalanina Amônio Liase de <i>Anabaena variabilis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment search Tool</i>
CaGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Candida albicans</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
HsHAL	Histidina Amônio Liase de <i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MIO	4-metilideno-5-imidazolona
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NCS	<i>Non-crystallographic symmetry</i>
NpPAL	Fenilalanina Amônio Liase de <i>Nostoc punctiforme</i>
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PaPAM	Fenilalanina Aminomutase de <i>Pantoea agglomerans</i>
PcPAL	Fenilalanina Amônio Liase de <i>Petroselinum crispum</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i> - Banco de Dados de Proteínas
PpHAL	Histidina Amônio Liase de <i>Pseudomonas putida</i>
RMSD	Desvio quadrático médio das distâncias
RSCC	Valor do coeficiente de correlação do espaço real
RSR	Valor residual no espaço real
RsTAL	Tirosina Amônio Liase de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
SbPAL	Fenilalanina Amônio Liase de <i>Sorghum bicolor</i>
ScGAPDH	Gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SgTAM	Tirosina Amonimutase de <i>Streptomyces globisporus</i>
TcHAL	Histidina Amônio Liase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcIP	Imidazolona propionase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TLS	Translação, libração e parafuso
TwPAL	Fenilalanina Amônio Liase de <i>Taxus wallichiana</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
OBJETIVO GERAL.....	17
 CAPÍTULO 1 – HISTIDINA AMÔNIO LIASE E IMIDAZOLONA	
PROPIONASE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcHAL e TcIP).....	18
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1.1 Doença de Chagas.....	18
1.1.2 Histidina Amônio Liase (HAL).....	21
1.1.3 Imidazolona Propionase (IP).....	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
1.2.1 Histidina Amônio Liase.....	25
1.2.2 Imidazolona Propionase.....	25
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
1.3.1 Histidina Amônio Liase.....	26
1.3.1.1 Refinamento da estrutura cristalográfica.....	26
1.3.1.2 Validação da estrutura.....	26
1.3.1.3 Análise e comparações estruturais.....	26
1.3.1.3.1 <i>Topologia</i>	26
1.3.1.3.2 <i>Alinhamento das sequências de aminoácidos</i>	27
1.3.1.3.3 <i>Comparações entre monômeros e com estruturas proteicas homólogas</i>	27
1.3.2 Imidazolona Propionase.....	27
1.3.2.1 Clonagem.....	27
1.3.2.2 Expressão e extração da TcIP.....	28
1.3.2.3 Purificação por cromatografia de afinidade.....	29
1.3.2.4 Modelagem por homologia da TcIP.....	29
1.3.2.5 Análise do modelo gerado por homologia.....	30
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
1.4.1 Histidina Amônio Liase.....	30
1.4.1.1 Refinamento da estrutura cristalográfica.....	30
1.4.1.2 Validação da estrutura.....	36
1.4.1.2.1 <i>Avaliação dos ângulos torcionais da cadeia principal</i>	36
1.4.1.2.2 <i>Coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e valor residual no espaço real (RSR)</i>	37

1.4.1.2.3	<i>Avaliação da geometria dos rotâmeros.....</i>	39
1.4.1.3	<i>Análises e comparações estruturais.....</i>	39
1.4.1.3.1	<i>Estrutura da TcHAL e topologia.....</i>	39
1.4.1.3.2	<i>Análises do sítio ativo e contatos com o ligante SFE.....</i>	41
1.4.1.3.3	<i>Análises e comparações entre monômeros e estruturas protéicas homólogas.....</i>	42
1.4.1.3.4	<i>Seletividade do substrato da TcHAL.....</i>	45
1.4.2	<i>Imidazolona Propionase.....</i>	45
1.4.2.1	<i>Expressão da TcIP.....</i>	45
1.4.2.2	<i>Purificação por cromatografia de afinidade.....</i>	46
1.4.2.3	<i>Modelagem por homologia da TcIP.....</i>	48
1.4.2.4	<i>Análise do modelo gerado por homologia.....</i>	48
1.5	<i>CONCLUSÕES.....</i>	51

CAPÍTULO 2 – GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Candida albicans* (CaGAPDH).....

2.1	<i>INTRODUÇÃO.....</i>	52
2.1.1	<i>Candidíase.....</i>	52
2.1.2	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).....</i>	54
2.2	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	56
2.3	<i>MATERIAIS E MÉTODOS.....</i>	56
2.3.1	<i>Obtenção do clone contendo o gene da CaGAPDH.....</i>	56
2.3.2	<i>Transformação bacteriana por eletroporação.....</i>	57
2.3.3	<i>Expressão e extração da CaGAPDH.....</i>	57
2.3.4	<i>Purificação por cromatografia de afinidade.....</i>	57
2.3.5	<i>Quantificação.....</i>	58
2.3.6	<i>Cristalização da CaGAPDH.....</i>	58
2.3.7	<i>Coleta de dados de difração de raios X.....</i>	58
2.3.8	<i>Processamento, substituição molecular, refinamento e validação da estrutura.....</i>	59
2.3.9	<i>Análises e comparações estruturais.....</i>	59
2.3.9.1	<i>Topologia.....</i>	59
2.3.9.2	<i>Análises dos contatos com o cofator (NAD⁺) e alinhamento das sequências.....</i>	59
2.3.9.3	<i>Comparações entre monômeros e com estruturas proteicas homólogas.....</i>	60

2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
2.4.1	Clonagem, expressão e purificação.....	60
2.4.2	Cristalização, coleta de dados e processamento das imagens.....	61
2.4.3	Substituição molecular.....	63
2.4.4	Modelagem e refinamento.....	64
2.4.5	Validação da estrutura.....	65
2.4.5.1	Avaliação dos ângulos torcionais da cadeia principal.....	65
2.4.5.2	Avaliação da geometria dos rotâmeros.....	68
2.4.5.3	Coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e valor residual no espaço real (RSR).....	68
2.4.6	Análises e comparações estruturais.....	70
2.4.6.1	Estrutura da <i>Ca</i> GAPDH e topologia.....	70
2.4.6.2	Análises e comparações entre monômeros e domínios da <i>Ca</i> GAPDH.....	71
2.4.6.3	Alinhamento das sequências e comparação com proteínas homólogas.....	71
2.5	CONCLUSÕES.....	74
	PERSPECTIVAS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE A – ETAPAS ENVOLVIDAS EM CATABOLISMO DA HISTIDINA EM <i>T. CRUZI</i>.....	90

INTRODUÇÃO GERAL

A cristalografia de macromoléculas é utilizada para determinação da estrutura tridimensional em nível atômico em estudos de sistemas biológicos como proteínas (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017). As informações estruturais das macromoléculas podem ser obtidas utilizando-se de várias técnicas: difração de raios X (RUPP, 2009), difração de nêutrons (BACON, 1966), ressonância magnética nuclear (RMN) (RENAULD, 2020), espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) (KIKHNEY; SVERGUN, 2015), microscopia eletrônica (ME) (COSTA; IGNATIOU; ORLOVA, 2017), modelagem por homologia (ORRY; ABAGYAN, 2012) e entre outras. Notoriamente, a cristalografia por difração de raios X se mostra a ferramenta mais poderosa, sendo atualmente responsável por mais de 100 mil novas estruturas de proteínas resolvidas e depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, 2000). Porém, note-se que a microscopia eletrônica teve um grande desenvolvimento ultimamente e já contribuiu com a resolução de aproximadamente 10 mil novas estruturas de proteínas (CALLAWAY, 2020) desde o relato da primeira estrutura depositada no PDB do Zika vírus em 2017 (HASAN et al., 2017).

As proteínas são responsáveis por diversas funções biológicas, como catálise, transporte, regulação, proteção entre outras várias tarefas essenciais a manutenção da vida (LEHNINGER; NELSON; COX, 2019). Devido às diversas funções realizadas por essas macromoléculas biológicas, o estudo da sua sequência de aminoácidos e estrutura são fundamentais para busca de novas abordagens terapêuticas, principalmente para proteínas de organismos patogênicos (GUIDO et al., 2010).

Um bom alvo estrutural para o desenvolvimento de drogas deve ser uma molécula essencial para o organismo, para o qual inibidores de alta afinidade possam ser identificados e que tenham pouca ou nenhuma afinidade pela eventual proteína homóloga humana. Como requisitos adicionais, deve apresentar especificidade, baixa toxicidade e biodisponibilidade. As estratégias para caracterização de alvos consistem em identificar enzimas específicas do organismo presentes em vias metabólicas e buscar diferenças estruturais nos sítios de ligação entre o eventual homólogo humano e do organismo em estudo (ALVES-FERREIRA et al., 2009). Portanto, o projeto racional de medicamentos envolve a identificação de um alvo-chave com base na compreensão das vias metabólicas e redes regulatórias para projetar um quimioterápico altamente específico com base na estrutura tridimensional (3D) deste alvo (SZARECKA; DOBSON, 2019; WIEMAN et al., 2004). Além disso, existem os métodos de

validação de alvo (químicos e/ou genéticos), em que inibidores de pequenas moléculas podem ser usadas para modular a atividade funcional de um alvo (WYATT et al., 2011).

O estudo estrutural sobre a ligação de uma molécula de fármaco mostrará como a molécula interage com a proteína, além disso, como este potencial fármaco pode ser modificado visando melhorar as propriedades de ligação e, até mesmo, onde não pode ser modificado para que a ligação não seja impedida (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017). Neste contexto, recentemente foi determinada a estrutura cristalina do domínio de ligação ao receptor da proteína *spike* do SARS-CoV-2 ligada ao receptor celular ACE2. Assim, as análises estruturais podem contribuir fornecendo informações sobre as mutações nas células que podem auxiliar em novas formas de vacina (LAN et al., 2020).

Nesse âmbito, o presente trabalho visa elucidar as estruturas tridimensionais das enzimas Histidina Amônio Liase e Imidazolona Propionase de *Trypanosoma cruzi* - (TcHAL, TcIP), pertencentes a via catabólica da L-histidina, e a Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *Candida albicans* (CaGAPDH), presente na via glicolítica.

No capítulo 1 está descrito os estudos das enzimas TcHAL e TcIP. A TcHAL consiste na continuação do trabalho realizado no mestrado por Miranda; Silva; Iulek, (2015), que compreende o refinamento e validação da estrutura, bem como a realização de análises comparativas e estruturais. A TcIP inclui a expressão, testes de purificação e modelagem por homologia.

No capítulo 2 está descrito o estudo da proteína CaGAPDH, que compreende o estabelecimento do protocolo de expressão, purificação, cristalização, determinação da estrutura tridimensional e realização de análises comparativas e estruturais.

OBJETIVO GERAL

Elucidar a estrutura tridimensional das enzimas Histidina Amônio Liase e Imidazolona Propionase de *Trypanosoma cruzi*, e a Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *Candida albicans*, visando contribuir com informações ao nível molecular na busca de inibidores para esses potenciais alvos moleculares vinculado a doença de Chagas e candidíase, respectivamente.

CAPÍTULO 1 - HISTIDINA AMÔNIO LIASE E IMIDAZOLONA PROPIONASE DE *Trypanosoma cruzi* (TcHAL e TcIP)

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Doença de Chagas

A Tripanossomíase americana, também chamada doença de Chagas, é uma infecção causada pelo protozoário parasita cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Trata-se de uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que compreendem outras como a cisticercose, a leishmaniose e a equinococose (OMS, 2019). As DTNs são doenças transmissíveis presentes em países tropicais e subtropicais que afetam mais de um bilhão de pessoas. Particularmente afetam populações que vivem em situação de pobreza e de vulnerabilidade, com acesso restrito à saúde de qualidade, assim como a serviços essenciais de instalações de abastecimento de água potável e esgotamento sanitário (OMS, 2021).

A doença de Chagas está presente na humanidade desde os tempos antigos e continua a ser um problema social e econômico relevante nas Américas (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). De acordo com a OMS, estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas em todo mundo, principalmente na América Latina estejam infectadas com a doença (OMS, 2019) e mais de 1 milhão desses casos ocorrem no Brasil (OMS, 2015). Nas últimas décadas, a doença de Chagas também tem sido uma preocupação para locais não endêmicos, como Canadá, Estados Unidos, Europa, Austrália e Japão devido à constante migração de indivíduos de áreas endêmicas (OPAS, 2016). Isso se deve principalmente à mobilidade populacional entre a América Latina e o restante do mundo (RASSI JUNIOR; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Essa zoonose é transmitida ao ser humano pelo contato com as fezes dos insetos vetores, conhecidos no Brasil como "barbeiros", dentre mais de 300 espécies que podem transmitir o *T. cruzi*, destaca-se a *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (MSF, 2018). Além da transmissão vetorial, outros meios ocupam um papel importante na disseminação da doença, tais como: transmissão via transfusão de sangue e transplantes de órgãos de doadores infectados para receptores saudáveis, transmissão vertical durante a gravidez ou nascimento, contaminação através de acidentes de laboratório e por ingestão de líquidos ou alimentos (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). No

município de Barreirinha-AM, houve relatos de contaminação durante a preparação, conservação e consumo de suco de açaí (FVS, 2019).

Nos seres humanos, esta doença apresenta principalmente duas formas clínicas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia geralmente assintomática ou acompanhada de sintomas inespecíficos, como febre, dor de cabeça (PAES et al., 2011) e edema palpebral prolongado comumente chamado de sinal de Romaña (BERN, 2015). Estas manifestações desaparecem espontaneamente em 90% dos casos e possivelmente 60-70% dos indivíduos nunca desenvolverão sinais ou sintomas relacionados à doença de Chagas (VAGO et al., 2000). Os pacientes restantes 30-40% podem progredir para a fase crônica com doenças neurológicas, cardíacas, digestivas (megacólon ou megaesôfago) ou sinais clínicos cardiodigestivos (PINAZO et al., 2010). Esta fase aparece depois de um longo período sem a manifestação da doença, chamado período de latência, período este que pode durar vários anos, razão pela qual esta fase pode ser considerada inclusive como uma fase crônica assintomática (PAES et al., 2011).

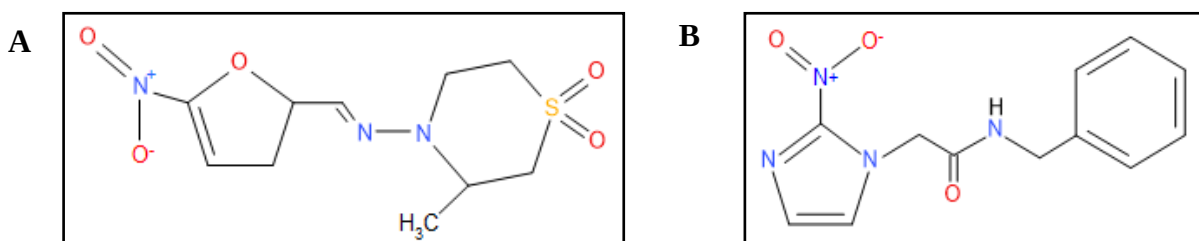
O diagnóstico da doença de Chagas humana pode ser realizado em qualquer estágio da doença e envolve a análise de dados clínicos, epidemiológicos e dados de laboratório (UMEZAWA; SHIKANAI-YASUDA; STOLF, 1996). Na fase aguda, é possível determinar a presença de parasitas circulantes no sangue por testes parasitológicos, que podem ser diretos como esfregaço de sangue ou por multiplicação como hemocultura e reação em cadeia da polimerase (PCR) (LUQUETTI; SCHMUÑIS, 2017). Na fase crônica, pelo menos dois testes sorológicos baseados em princípios diferentes devem ser realizados para detectar anti-*T. cruzi* anticorpos IgG, como imunofluorescência indireta (IFA), hemaglutinação e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (RASSI JUNIOR; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Além de testes parasitológicos e sorológicos; exames laboratoriais de rotina, eletrocardiograma (ECG), radiografia torácica e hepatograma são solicitados tanto na fase aguda quanto na fase crônica para avaliação clínica (BERN et al., 2007; SCHIJMAN et al., 2011).

Os únicos medicamentos quimioterapêuticos atualmente em uso são o Nifurtimox [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina)-tetra-hidro-4H-tiazina-1,1-dióxido] (Figura 1-A), um nitrofurano e benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (Figura 1-B), um derivado de nitroimidazol (MORILLA; ROMERO, 2015). Estudos indicam que o mecanismo de ação destes compostos estão relacionados com a formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (NO₂) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas

moleculares do tipo R-NO₂ (MAYA et al., 2003; MAYA et al., 2007). Evidências experimentais indicam que ação antiparasitária do Nifurtimox está associada a presença de oxigênio por meio da redução do grupo nitro para radicais nitroânions instáveis, levando ao surgimento de moléculas tóxicas ao parasita (BOIANI; GONZALEZ, 2005). O Benzonidazol age no estresse redutivo, que poderia inibir a síntese de macromoléculas por ligação covalente entre intermediários de nitroredução com os componentes celulares do parasita (DÍAZ DE TORANZO et al., 1988). Além disso, esta droga potencializa a fagocitose, melhorando a resposta imune do hospedeiro por meio da produção de γ -interferon (ROMANHA et al., 2002), inibindo a fumarato redutase e interferindo com a resistência ao estresse oxidativo (TURRENS et al., 1996).

Na fase crônica, a eficácia desses medicamentos é baixa e controversa, além do surgimento de efeitos colaterais graves após uso prolongado (PAES et al., 2011). Devido, à falta de sintomas ou, quando presente, à sua não especificidade, a maioria dos pacientes é diagnosticado na fase crônica, onde as chances de cura são pequenas. Ambos os fármacos podem ser considerados efetivos na fase aguda com índice de cura definida em cerca de 80% dos casos. Segundo os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (CDC, 2016), esse tratamento é realizado por um longo período, de 30-90 dias, e as drogas apresentam vários efeitos colaterais, tais como: anorexia, náusea, vômito, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica, o que pode em alguns casos levar à interrupção do tratamento. Desde a descoberta desses dois compostos há mais de 40 anos, não há outro medicamento aprovado para o tratamento da doença de Chagas (BELLERA et al., 2015).

Figura 1 - Representação das estruturas químicas das principais drogas usadas para o tratamento da doença de Chagas.



Legenda: A) Nifurtimox; B) Benzonidazol.

Fonte: Cristovão-Silva et al. (2019).

A busca por estratégias de tratamento apontam possibilidades significativas contra a doença de Chagas nos últimos anos (BUCKNER; NAVABI, 2010). Neste contexto, as análises genômica e proteômica do *T. cruzi* contribuíram para a identificação de um grande número de alvos biológicos presentes no parasita, em sua maioria vias metabólicas, abrindo a

perspectiva para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e menos tóxicos para o tratamento da doença de Chagas (DUSCHAK; COUTO, 2007; PAES et al., 2011).

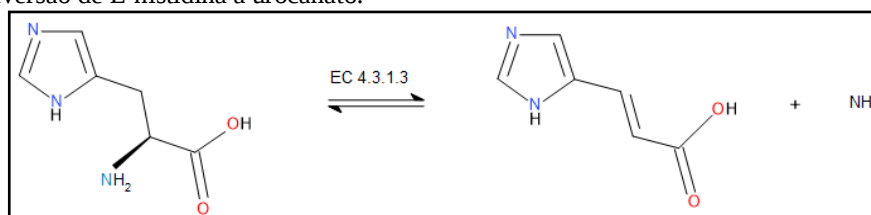
Nessas perspectivas, alguns dos principais alvos terapêuticos em estudos clínicos são as enzimas trans-sialidase e nitroredutase tipo 1 (NTR), alvos mais procurados para o estudo ao combate a doença de Chagas (BALAÑA-FOUCE et al., 2014; BERMUDEZ et al., 2016; SAN FRANCISCO et al., 2017; SCARIM et al., 2018).

Na procura por alvos terapêuticos, enzimas do catabolismo de aminoácidos que contribuem como fonte de energia ao *T. cruzi* vêm sendo estudadas. Dentre esses aminoácidos, a L-histidina tem sua degradação que leva ao glutamato e a outros produtos. Por meio de banco de dados de genomas e do proteoma do *T. cruzi*, foi possível identificar as enzimas que fazem parte desta via catabólica: Histidina Amônio Liase (HAL) (EC 4.3.1.3), Urocanato Hidratase (EC 4.2.1.49), Imidazolona Propionase (EC 3.5.2.7) e Formimino Glutamase (EC 3.5.3.8) (Apêndice A) (PAES et al., 2011). No caso particular deste trabalho, o interesse está na primeira e terceira enzimas da via, Histidina Amônio Liase de *Trypanosoma cruzi* (TcHAL) e Imidazolona Propionase de *Trypanosoma cruzi* (TcIP), respectivamente. Essas enzimas são consideradas potenciais alvos moleculares para tratamento da doença de Chagas, uma vez que constam no banco de dados do "TDR - targets" (<https://tdrtargets.org/>), entretanto, ainda não são considerados alvos moleculares validados, uma vez que ainda não existem estudos de ensaios de viabilidade, toxicidade, potencial de resistência e drogabilidade.

1.1.2 Histidina Amônio Liase (HAL)

A histidina pode ser uma fonte de energia para a biossíntese de ATP em *T. cruzi* através de sua conversão em glutamato, seguida de oxidação mitocondrial (BARISÓN et al., 2016). A Histidina Amônio Liase, também conhecida como histidase catalisa a desaminação não oxidativa da L-histidina em ácido urocânico (TAYLOR; LEVY, 1991) (Figura 2).

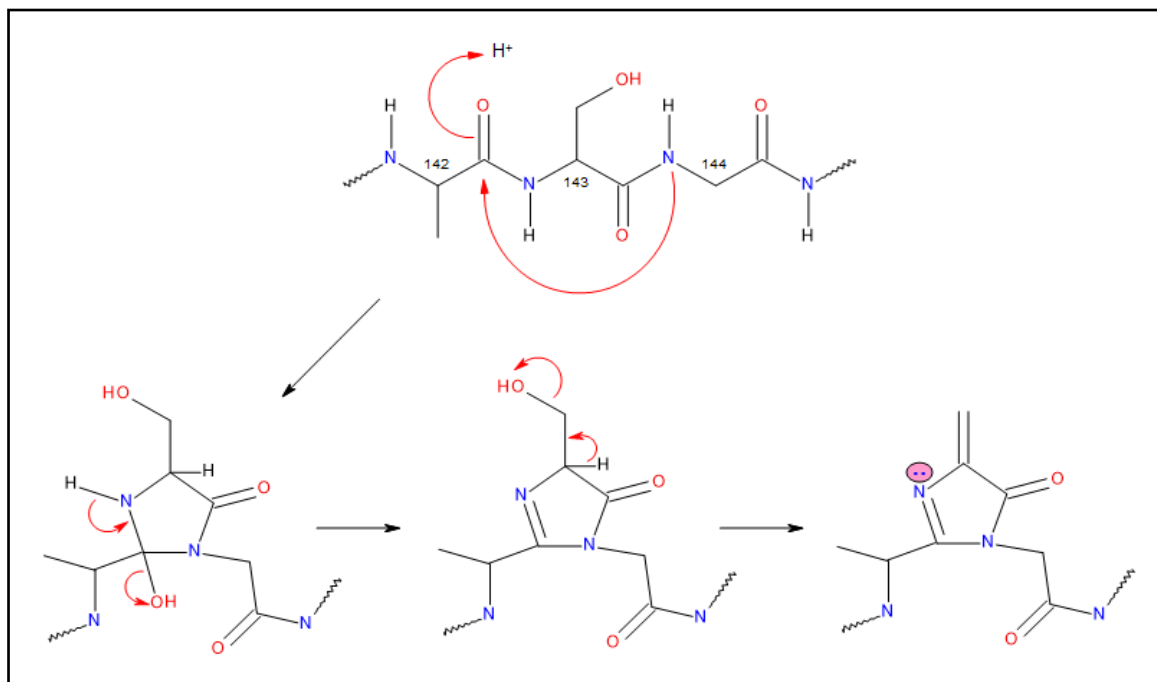
Figura 2 - Conversão de L-histidina a urocanato.



Fonte: Placzek et al. (2019).

Em condições fisiológicas normais a HAL é um homotetrâmero (SCHWEDE; RÉTEY; SCHULZ, 1999; CALABRESE et al., 2004; CHRISTIANSON et al., 2007; RÖTHER et al., 2001). Apresenta como cofator uma molécula de 4-metiledeno-5-imidazolona (MIO) de formação pós-traducional oriundo da ciclização do segmento do tripeptídeo Ala-Ser-Gly presente na sequência primária (SCHWEDE; RÉTEY; SCHULZ, 1999; LOUIE et al., 2006; BAEDEKER; SCHULZ, 2002) (Figura 3). Esta biossíntese é característica da família das amônio-liases, que compreende também fenilalanina aminomutases (PAMs e TAMs) (FENG et al., 2011; CHRISTIANSON et al., 2007; KRUG; MÜLLER, 2009), tirosina amônio-liases (TALs) (KYNDT et al., 2002) e fenilalanina amônio-liases (PALs) (MACDONALD; D'CUNHA, 2007).

Figura 3 - Mecanismo proposto para biossíntese do 4-metiledeno-5-imidazolona (MIO).

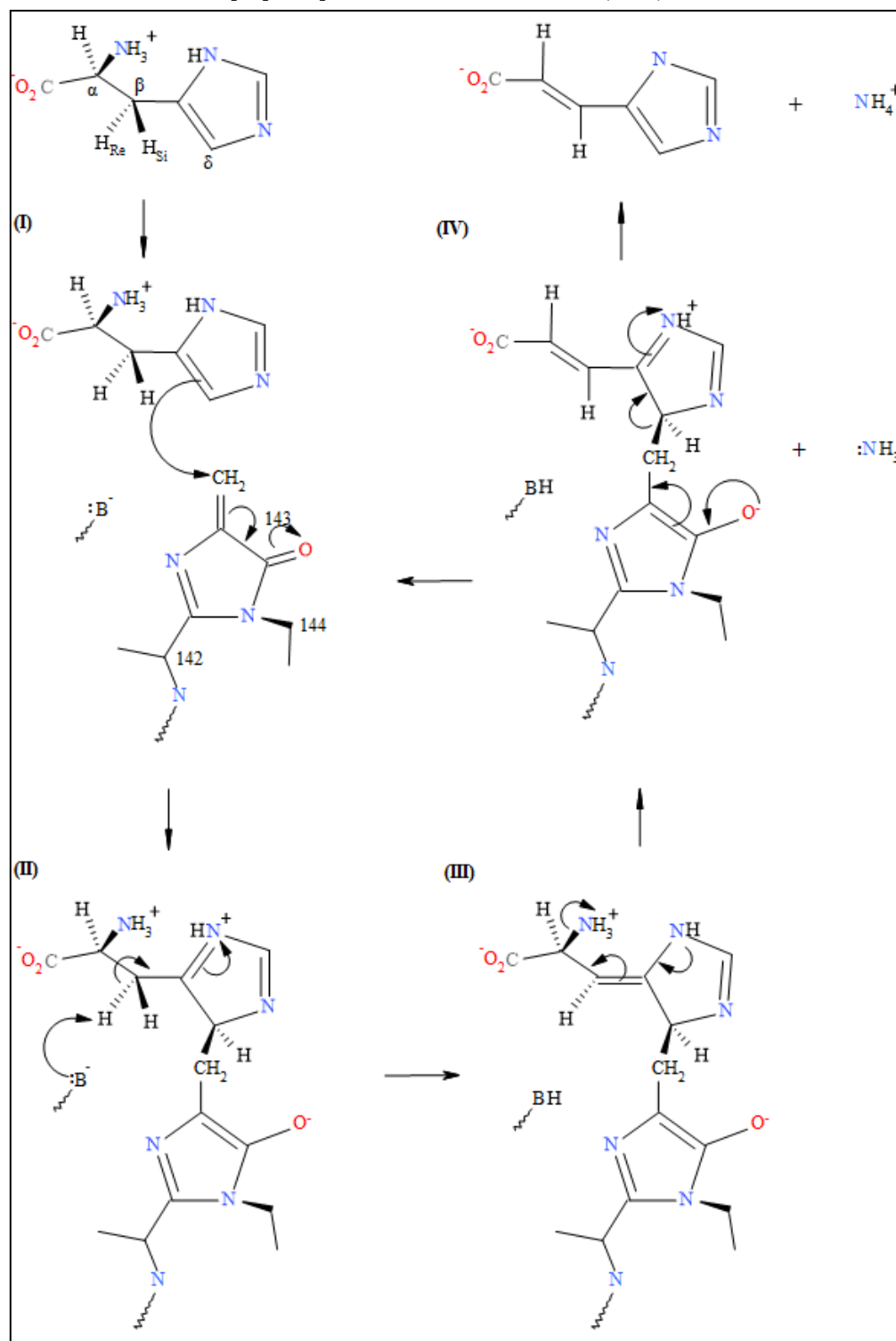


Fonte: Rétey (2003).

O mecanismo catalítico da HAL (Figura 4) consiste na ligação do substrato histidina à enzima pelo seu átomo C_δ atacando o MIO em sua função metilideno (Etapa I). A carga positiva introduzida no imidazol acidifica os prótons no átomo C_β e também é responsável pela troca de hidrogênios (verificada mediante marcação por deutério no trabalho original de Furata et al. (1992) observada no átomo C_δ do anel imidazólico. Após a abstração do próton H_{Re} do C_β por uma base enzimática (Etapa II), o grupo α-amônia é eliminado (Etapa III) e o

produto urocanato é liberado (Etapa IV) (LANGER; PAULING; RÉTEY, 1995; GIVOT; SMITH; ABELES, 1969; SIMPSON; MOSS; SLINGSBY, 1995).

Figura 4 - Mecanismo catalítico proposto para Histidina Amônio Liase (HAL).



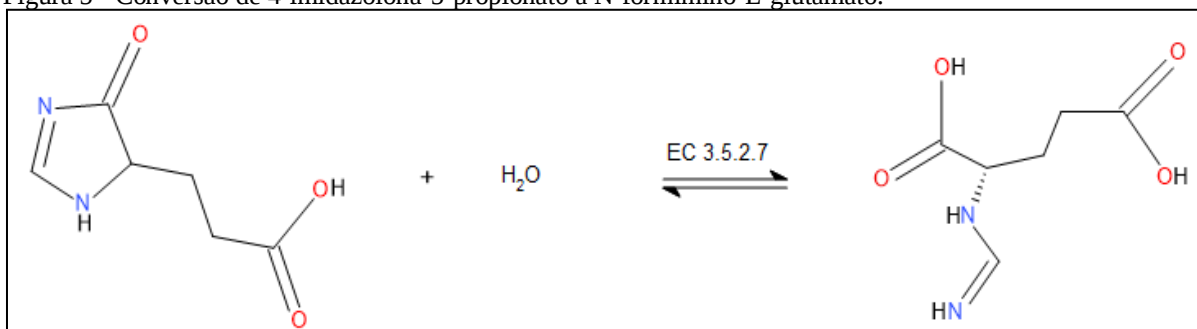
Legenda: (I) o cofator eletrofílico 4-metileno-5-imidazolona (MIO) no sítio ativo forma um intermediário covalente com o substrato histidina. (II) os prótons C_β são ativados e os H_{Re} abstraídos por uma base enzimática. (III) a amônia é eliminada. (IV) a enzima se regenera liberando o produto urocanato.
 Fonte: adaptado de Langer; Pauling; Rétey (1995).

No Banco de Dados de Proteínas (PDB) consta apenas a estrutura tridimensional depositada da HAL de *Pseudomonas putida* (BAEDEKER; SCHULZ, 2002). Além disso, entre outros organismos, esta enzima já foi isolada de *Homo sapiens* (ECKHART et al., 2008; YOKO et al., 2005). A deficiência desta enzima no organismo humano pode levar a histidinemia, uma doença de caráter autossômico recessivo que provoca um erro inato do metabolismo de aminoácidos (YOKO et al., 2005). Relatos confirmam como principais manifestações clínicas, o retardo mental e distúrbios de linguagem (SCRIVER; LEVY, 1983).

1.1.3 Imidazolona Propionase (IP)

A IP é a terceira enzima da via que catalisa a conversão de 4-imidazolona-5-propionato em N-formimino-L-glutamato (Figura 5) (SMITH; HALPERN; MAGASANIK, 1971).

Figura 5 - Conversão de 4-imidazolona-5-propionato a N-formimino-L-glutamato.



Fonte: Placzek et al. (2019).

Em condições fisiológicas normais a IP é um homodímero (TYAGI et al., 2007). No PDB atualmente há 2 estruturas tridimensionais de IPs depositadas, de *Bacillus subtilis* (BsIP) (YU et al., 2006) e *Agrobacterium tumefaciens* (AtIP) (TYAGI et al., 2007). Considerando a sequência da TcIP, essas proteínas apresentam identidades de 39,55 e 39,50% com ela, respectivamente. As IPs pertencem à superfamília de enzimas hidrolases metalodependentes e ambas as estruturas BsIP e AtIP mostraram esta dependência pelos metais Zn^{+2} e Fe^{+3} , respectivamente (YU et al., 2006; TYAGI et al., 2007).

Considerando-se as interações, os resíduos do sítio ativo da estrutura de BsIP são Arg89, Tyr102, Tyr152, His185, Glu252 e Ser329; já a coordenação do cátion Zn^{+2} faz-se através ligações polares com quatro resíduos de histidina (His80, His82, His249 e His272), um ácido aspártico (Asp324) e uma molécula de água. Na presença do substrato, o Zn^{+2} pode atuar como um eletrófilo para ajudar a ativar o nucleófilo da água e promover o ataque ao

substrato (YU et al., 2006). Na estrutura da *AtIP*, os resíduos do sítio ativo são conservados, com exceção da Gln257 e do Thr334; além disso, a coordenação do Fe^{+3} implica em ligações polares com os mesmos resíduos equivalentes da estrutura de *BsIP* (TYAGI et al., 2007). A catálise da IP é iniciada pela transferência de um próton da molécula de água ligada ao metal Fe^{+3} para His277. O carbono carbonílico do substrato é atacado pelo hidróxido ligado ao metal para formar um intermediário tetraédrico que é estabilizado pelas interações de ligação de hidrogênio com Gln245. Este intermediário então colapsa e o produto se forma através da transferência de um próton do His277 carregado para o nitrogênio terminal do produto (TYAGI et al., 2008).

Formam também a superfamília de enzimas hidrolases metalodependentes a adenosina desaminases, fosfotriesterases, dihidroorotases, alantoinases, hidantoinases, adenina e citosina desaminases, anfósases arildialquilfosfatases, clorohidrolases e formilmetanofurano desidrogenase, código 51556 no banco de dados supfam (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=51556>).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Histidina Amônio Liase

- Resolver a estrutura tridimensional por cristalografia;
- Realizar estudos comparativos entre a estrutura obtida e as homólogas encontradas em banco de dados.

1.2.2 Imidazolona Propionase

- Estabelecer as condições de expressão de forma heteróloga em *Escherichia coli*;
- Purificar a enzima por cromatografia de afinidade;
- Produzir e validar um modelo por homologia *in silico*.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Histidina Amônio Liase

1.3.1.1 Refinamento da estrutura cristalográfica

A estrutura da TcHAL foi inicialmente submetida ao programa automatizado Phenix autobuild, que utiliza fatores de estrutura e dados de incertezas obtidos do modelo de partida resultante da substituição molecular previamente descrita por Miranda; Silva; Iulek (2015). Em seguida, o modelo foi completado e refinado em um processo iterativo com os programas Phenix.refine (AFONINE et al., 2012) e *Crystallographic Object-Oriented Toolkit* - COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004). Os mapas utilizados para visualização de densidade eletrônica foram Fourier diferença mFo-DFc (READ, 1986) e densidade eletrônica 2mFo-DFc (MAIN, 1979), sem completar dados faltantes para evitar tendenciosidades.

1.3.1.2 Validação da estrutura

Os programas utilizados para a validação da estrutura foram: Procheck (LASKOWSKI et al., 1993), Molprobity (CHEN et al., 2010) e validação PDB (WESTBROOK et al., 2003). Para o cálculo dos índices de ajuste na densidade eletrônica foi utilizado o RSR (valor residual no espaço real), RSCC (coeficiente de correlação no espaço real) e o programa Mapman (KLEYWEGT; JONES, 1996).

1.3.1.3 Análise e comparações estruturais

1.3.1.3.1 Topologia

A estrutura foi analisada com a ferramenta *Pictorial data base of 3D structures in the Protein Data Bank* (PDBsum) para obtenção do diagrama de topologia e cálculo das áreas de contato entre os monômeros (LASKOWSKI, 2018).

1.3.1.3.2 Alinhamento das sequências de aminoácidos

O alinhamento de sequências de aminoácidos foi realizado com o pacote 3DCoffee (O'SULLIVAN et al., 2004) com uma extensão do programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). O programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009) foi usado para visualização dos elementos de estrutura secundária estimados pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). O fundo da figura e a conservação relativa dos resíduos foi colorida de acordo com a convenção do ALSCRIPT Calcons (BARTON, 1993).

1.3.1.3.3 Comparações entre monômeros e com estruturas proteicas homólogas

A sobreposição estrutural entre monômeros da TcHAL e o cálculo do Desvio Quadrático Médio das Distâncias (RMSD) entre os C α 's foram realizados usando o programa Lsqkab (KABSCH, 1976). As estruturas de proteínas homólogas para comparações estruturais foram selecionadas com base em uma ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) disponível no *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Outros critérios adotados foram selecionar estruturas de organismos diferentes com melhor porcentagem de identidade, cobertura, resolução e presença de ligantes. As sobreposições entre estas foram calculadas com o programa Multiprot (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002).

A partir da estrutura homóloga de *Pantoea agglomerans*, código PDB 3UNV (STROM et al., 2012), os contatos do ligante do ácido (3S)-3-amino-3-fenilpropanóico (SFE) foram estimados no programa Ncont do pacote *Collabotative Computacional Project* N^o.4 (CCP4) (WINN et al., 2011), considerando um ponto de corte de distância de 3,5 Å. Os resíduos correspondentes da TcHAL foram presumidos com base no alinhamento.

As figuras da estrutura TcHAL e comparações estruturais foram produzidas usando o programa PyMol (DELANO, 2002).

1.3.2 Imidazolona Propionase

1.3.2.1 Clonagem

Através da colaboração com a Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Parasitologia, na pessoa do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, foram obtidos clones da bactéria

E. coli cepa BL21-DE3 portadores do plasmídeo recombinante pET-28a(+), contendo o gene codificante para a enzima TcIP (pET-28a+)/TcIP). Os clones foram propagados em inóculos de 5 mL de meio de cultura Lúria Bertani (LB) líquido, contendo os antibióticos kanamicina e tetraciclina nas concentrações finais de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A multiplicação bacteriana foi obtida pela incubação a 37°C sob agitação de 240 rpm por 16 h até atingir a saturação da cultura.

Alíquotas de 1 mL do inóculo saturado contendo 20% (V/V) de glicerol foram estocadas a -4°C para posterior utilização.

1.3.2.2 Expressão e extração da TcIP

Um inóculo inicial de 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos kanamicina a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e tetraciclina a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, suplementado com 5 μL de estoque de células, foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16 h. O inóculo inicial foi diluído na proporção de 1:100 em um novo cultivo de 100 mL de meio LB contendo os antibióticos kanamicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tetraciclina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) mantido a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,4 e 0,6 a 600 nm. Atingida esta condição, as culturas de células foram induzidas com Isopropiltio- β -D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, e incubadas a 20°C , 25°C e 37°C sob agitação de 150 rpm por 16 h. As culturas assim obtidas foram centrifugadas a 6000 rpm por 15 min à 4°C . O meio de cultura foi descartado e as células foram armazenadas a -86°C .

Para a extração da proteína heteróloga, a massa celular proveniente de 100 mL de cultura foi ressuspensa em 10 mL de tampão de ligação composto por 20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,9 e 500 mmol L^{-1} NaCl. No passo seguinte, as células foram rompidas em sonicador ultrassônico mediante 4 ciclos de 1 min e intervalos de descanso em gelo de 1 min entre cada ciclo. Após a ruptura celular, a amostra foi submetida a centrifugação a 6000 rpm por 40 min a 4°C , separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (precipitado).

A expressão da proteína TcIP foi avaliada em SDS-PAGE, método adaptado de Sambrook e Russel, (2001). Para aplicação no gel, alíquotas de 20 μL foram diluídas em tampão de amostra na proporção 1:1 e desnaturadas por aquecimento a 98°C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida sob tensão de 180 V por 1 h. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de 10% (V/V) ácido acético glacial, 0,25% (m/V) azul de Coomassie R-250 e 45% (V/V) de etanol por 15 min e descorado em solução de 57% (V/V) metanol e 3% (V/V) ácido acético por aproximadamente 30 min.

1.3.2.3 Purificação por cromatografia de afinidade

A fração contendo as proteínas solúveis, em tampão de ligação, correspondente a 250 mL de cultura bacteriana, foi utilizada para a cromatografia de afinidade em resina carregada com a solução de cloreto de níquel (NiCl_2) a $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. A purificação foi realizada em cromatógrafo AKTA Purifier 100 UPC GE®. Uma coluna de 1 mL (*HisTrap HP-GE®Healthcare Life Sciences*) foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) com tampão de ligação (fluxo de 1 mL min^{-1} , mantido em todas as etapas). Alíquota de 10 mL do extrato protéico foi injetada na coluna e posteriormente eluída gradualmente com 23 VC do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. A proteína TcIP foi eluída em gradiente composto pelo tampão de eluição (20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,9; 500 mmol L^{-1} NaCl e 500 mmol L^{-1} imidazol) por 21 VC. O grau de pureza da proteína nas frações eluídas foi avaliado visualmente por SDS-PAGE, conforme descrito no item 1.3.2.2.

Este protocolo também foi utilizado para cromatografias de afinidade aos íons metálicos queláveis cobre (Cu^{+2}) e cobalto (Co^{+2}), antes das quais as colunas foram carregadas com soluções de CuCl_2 e CoCl_2 , ambas nas concentrações de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Como descrito no guia de seleção de resinas IMAC (*Immobilized metal ion affinity chromatography*), estes íons metálicos possuem uma associação inversa de afinidade pela especificidade pela His-tag, sendo assim, o Cu^{+2} foi utilizado devido a sua maior afinidade e o Co^{+2} à sua maior especificidade, quando comparado ao Ni^{+2} (MARVELGENT BIOSCIENCES, 2020).

1.3.2.4 Modelagem por homologia da TcIP

A busca por sequências de aminoácidos similares à da enzima alvo foi realizada com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) disponível no NCBI. Os critérios utilizados para selecionar os templates foram: as estruturas de IP(s) depositadas no PDB com percentagem maior de <25% de identidade. As estruturas tridimensionais selecionadas foram sobrepostas com a utilização do programa MultiProt (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002). O alinhamento entre as sequências de aminoácidos foi realizado com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). Os modelos tridimensionais foram produzidos pelo programa Modeller (ESWAR et al., 2006). Os modelos gerados foram avaliados quanto a energia livre de Gibbs, mediante, análise da pontuação *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) (SHEN; SALI, 2006), e quanto aos ângulos torcionais ϕ (phi) e ψ

(psi) pela análise do gráfico de Ramachandran produzido pelo programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993).

1.3.2.5 Análise do modelo gerado por homologia

O modelo obtido foi analisado pela ferramenta PDBsum (LASKOWSKI, 2018) a fim de analisar a estrutura secundária e a topologia. As sequências de aminoácidos foram alinhadas de acordo com a descrição do item 1.3.1.3.2.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

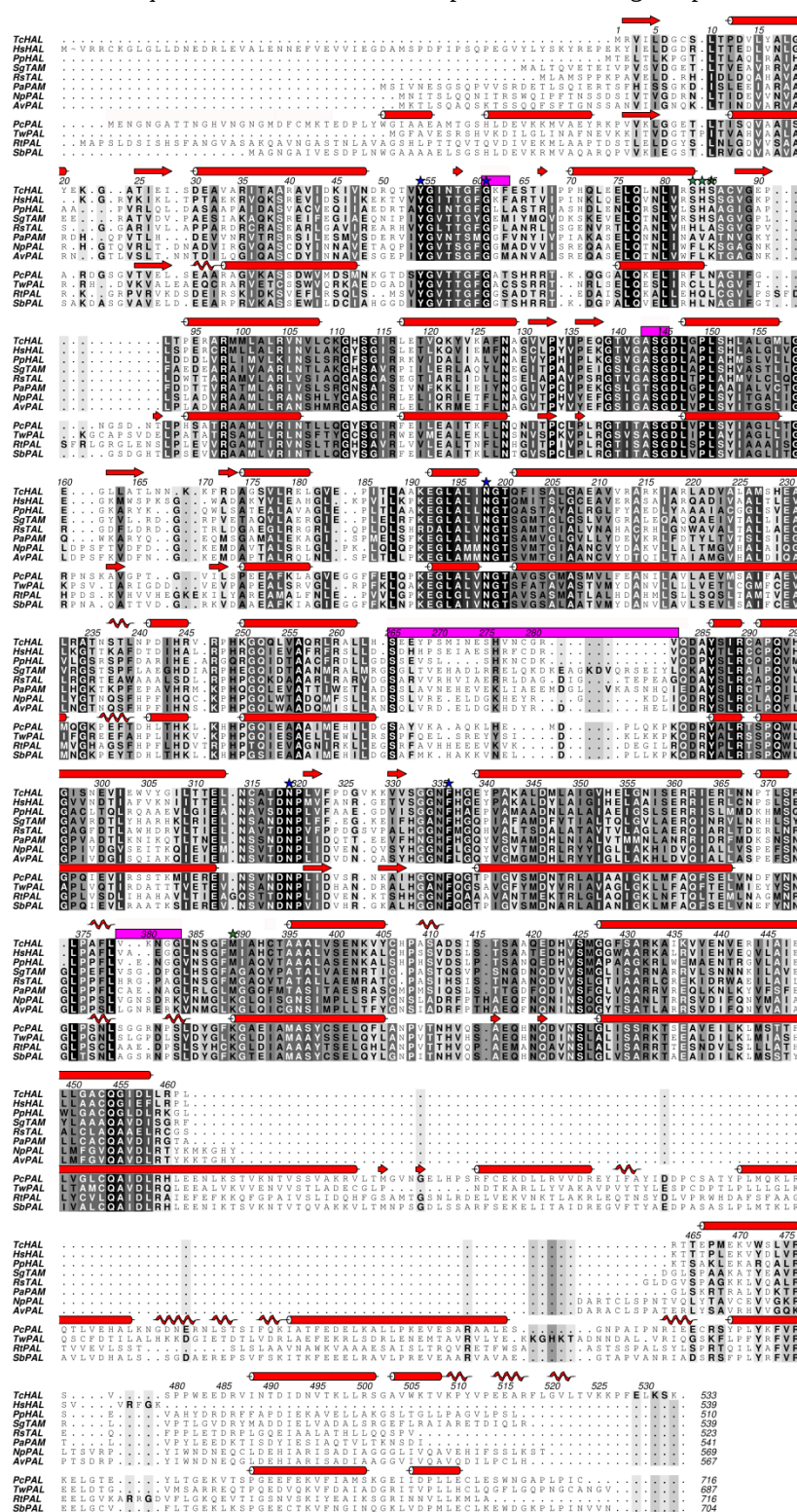
1.4.1 Histidina Amônio Liase

1.4.1.1 Refinamento da estrutura cristalográfica

Os grupos para translação, libração e roto-translação (TLS), após testes, decidiu-se usar cada monômero como um. Já quanto à simetria não cristalográfica (NCS), verificou-se que o uso limitado desta pode ser benéfico, mas deve implicar a análise praticamente resíduo a resíduo dos átomos a serem incluídos, pois testes com abrangências automáticas tradicionais trouxeram prejuízos significativos à geometria, portanto, não se incluíram estas restrições.

Durante o refinamento observou-se que os resíduos no intervalo 265 a 284 estão desordenados, situação semelhante à região correspondente na homóloga Histidina Amônio Liase de *Pseudomonas putida* (PpHAL) - PDB ID: 1GKM (BAEDEKER; SCHULZ, 2002), estrutura utilizada para a atribuição do faseamento inicial (substituição molecular). Na Figura 6 está apresentado o alinhamento das sequências de aminoácidos no qual está marcada esta região desordenada.

Figura 6 - Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas homólogas representativas.

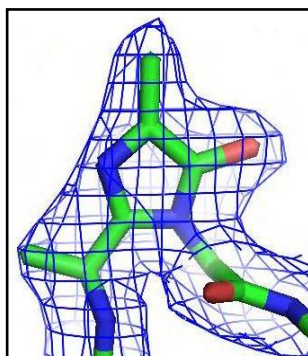


Legenda: uma marca (-) representa os resíduos 2-54 de HsHAL (isoforma 3) que não se alinham com nenhum outro resíduo. Retângulos violetas indicam regiões que não foram modeladas na estrutura cristalográfica de TcHAL. Estrelas azuis indicam os resíduos que fazem contato com o ligante SFE na estrutura do PaPAM. Estrelas verdes indicam os resíduos que conferem seletividade à histidina. Os filamentos β e hélices α são indicados por setas e cilindros vermelhos, respectivamente; eles são mostrados apenas para TcHAL e PcPAL e são principalmente conservados entre as estruturas.

Fonte: O autor.

Observou-se nas estruturas homólogas depositadas no PDB, por exemplo, a *PpHAL*, a Tirosina Aminomutase de *Streptomyces globisporus* (*SgTAM*) - PDB ID: 2OHY (CHRISTIANSON et al., 2007), a Tirosina Amônio Liase de *Rhodobacter sphaeroides* (*RsTAL*) - PDB ID: 2O6Y (LOUIE et al., 2006), a Fenilalanina Aminomutase de *Pantoea agglomerans* (*PaPAM*) - PDB ID: 3UNV (STROM et al., 2012), a Fenilalanina Amônio Liase de *Nostoc punctiforme* (*NpPAL*) - PDB ID: 2NYF (MOFFITT et al., 2007), a Fenilalanina Amônio Liase de *Anabaena variabilis* (*AvPAL*) - PDB ID: 2NYN (MOFFITT et al., 2007), a Fenilalanina Amônio Liase de *Petroselinum crispum* (*PcPAL*) - PDB ID: 1W27 (RITTER; SCHULZ, 2004), a Fenilalanina Amônio Liase de *Taxus wallichiana* (*TwPAL*) - PDB ID: 4V2Q (HEBERLING et al., 2015) e a Fenilalanina Amônio Liase de *Sorghum bicolor* (*SbPAL*) - PDB ID: 6AT7 (JUN et al., 2018), que o segmento tripeptídeo Ala-Ser-Gly, resíduos 143-144-145 em *TcHAL* é transformado em um resíduo modificado, que tem papel de cofator, 4-metilideno-5-imidazolona, cuja identificação por 3 letras no PDB é MIO, por um mecanismo de reação autocatalítico (SCHWEDE; RÉTEY; SCHULZ, 1999). Acredita-se que o MIO funcione como um eletrófilo através do seu grupo funcional ceto α/β -insaturado (HANSON; HAVI, 1970), o que é uma característica da família de enzimas HAL(s), PAM(s), TAM(s), TAL(s) e PAL(s). Assim, estabeleceram-se as restrições geométricas adequadas e refinou-se este tripeptídeo com este resíduo modificado (Figura 7).

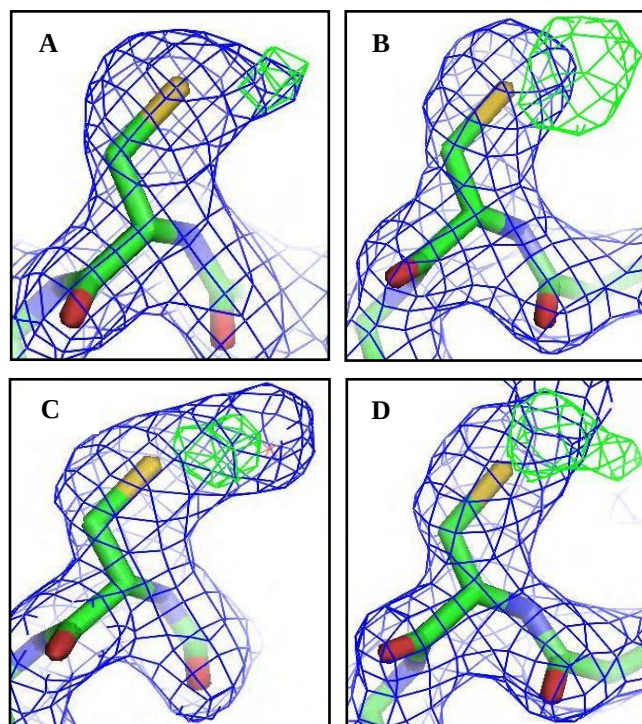
Figura 7 - Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo modificado MIO do monômero A.



Fonte: O autor.

Na figura 8 podem ser observados os mapas Fourier diferença e densidade eletrônica para os resíduos Cys393 de todos monômeros.

Figura 8 - Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo Cys393.



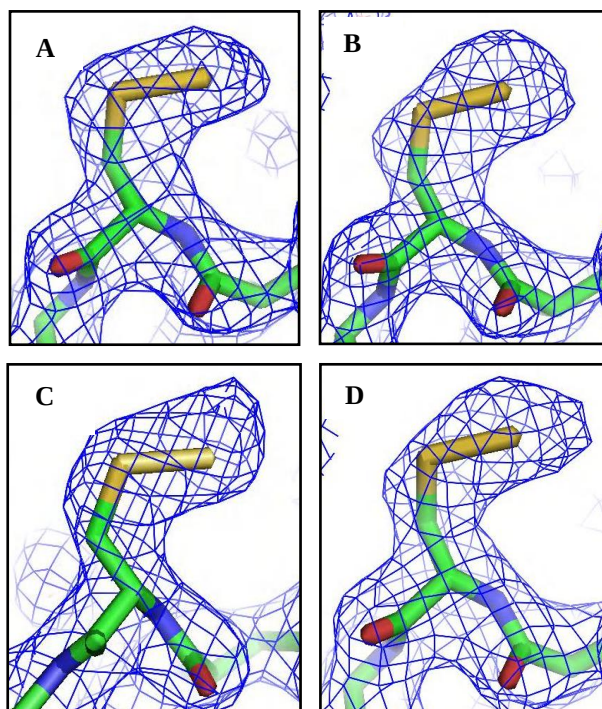
Legenda: monômeros A, B, C e D. Os mapas de densidade eletrônica (2mFo-DFc) foram desenhados com $+1\sigma$ de contorno (azul) e os mapas de Fourier diferença (mFo-DFc) com $+3\sigma$ de contorno (verde).

Fonte: O autor.

Com base nos mapas Fourier diferença, observa-se que as cadeias laterais da Cys393 em todos os monômeros são oxidadas e compatíveis com um átomo de enxofre extra, portanto, os resíduos de S-mercaptocisteína (CSS) foram refinados nessa posição. A hipótese é que esse átomo de enxofre extra provenha do tampão HEPES, pois há espaço suficiente na cavidade ao redor para quaisquer átomos remanescentes, o que seria, no entanto, desordenado.

Na Figura 9 está apresentada a qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo Cys393 com a ligação S-S a partir da adição de um átomo de enxofre.

Figura 9 - Qualidade de ajuste na densidade eletrônica para o resíduo CSS393 ligado a um átomo de enxofre.



Legenda: monômeros A, B, C e D. Os mapas de densidade eletrônica (2mFo-DFc) foram desenhados com +1 σ de contorno (azul) e os mapas de Fourier diferença (mFo-DFc) com +3 σ de contorno (verde).

Fonte: O autor.

No alinhamento da Figura 10, com sequências homólogas de estruturas resolvidas, observa-se que estes não apresentam um resíduo Cys nessa posição, exceto que a AvPAL possui o Cys424 vizinho e não modificado. No entanto, a HAL humana (*HsHAL*), cuja sequência (isoforma 3) está incluída no alinhamento, também apresenta uma Cys na mesma posição equivalente da *TcHAL*.

Figura 10 - Parte do alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas homólogas a *TcHAL* (Fig. 6).

	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445				
<i>TcHAL</i>	LDAFLV	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	448	
<i>HsHAL</i>	LDAFLV	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	504	
<i>PpHAL</i>	LDAFLV	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	442	
<i>SgTAM</i>	GLPPEL	VSG	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	469
<i>RsTAL</i>	GLPPEL	HRG	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	463
<i>PaPAM</i>	GLPPEL	CAE	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	483
<i>NpPAL</i>	GLPPEL	VGN	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	479
<i>AvPAL</i>	GLPPEL	LGN	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	479
<i>PcPAL</i>	GLPPEL	VGN	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	515
<i>TwPAL</i>	GLPPEL	VGN	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	486
<i>RIPAL</i>	GLPPEL	VGN	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	527
<i>SbPAL</i>	GLPPEL	VGN	...KNG	GLNSG	FMIAH	CTAAAL	VSENK	VYCH	PHSS	ADSS	ISL	TSAN	QEDH	VSM	GGFS	SARKA	IKVVEN	VE	502

Legenda: o retângulo em ciano destaca os resíduos da posição equivalente a Cys393 em *TcHAL*.

Fonte: O autor.

No modelo final, optou-se em deixar 154 resíduos de aminoácidos com cadeias laterais não completas devido a ausência de densidade eletrônica. Também devido a esta ausência, o modelo apresentou alguns intervalos entre segmentos de resíduos de aminoácidos da cadeia principal não modelados, além do 265-284 em todos os monômeros como citado

anteriormente, a saber: (a) monômero A: Gly61-Glu64; (b) monômero B: Phe60-Ile67; (c) monômero C: Gly61-Ser65; (d) monômero D: Gly61-Phe63, Val379-Gly383. Ratificando, há a transformação dos resíduos Ala143, Ser144 e Gly145 no cofator MIO143, assim, estes aminoácidos não estão presentes em sua forma canônica nessa posição da estrutura. Na Tabela 1 observa-se os valores estatísticos finais para a estrutura TcHAL, destacando-se os índices de R_{factor} e R_{free} que convergiram para 17,82% e 21,65%, respectivamente.

Tabela 1 - Dados estatísticos do processamento e refinamento.

Dados do processamento	
Parâmetros do cristal	
Resolução (Å)	2,55
Faixa de resolução (Å)	111,13-2,55 (2,63-2,55)
Grupo de espaço	$P2_12_12_1$
Dimensão de cela unitária	
a, b, c (Å)	87,81; 144,55; 173,76
Total de reflexões	435251 (28864)
Reflexões únicas	72424 (6307)
Multiplicidade	6,0 (4,6)
Completeza (%)	99,3 (98,6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11,9 (2,0)
Wilson B-factor (Å ²)	39,49
R_{merge} (%)	17,1 (83,6)
R_{meas} (%)	19,0 (94,6)
$CC_{1/2}$ (%)	99,1 (73,2)
Dados do refinamento	
R_{work} (%)	17,82
R_{free} (%)	21,65
Desvio Médio Quadrático	
Comprimento de ligação (Å)	0,003
Ângulo de ligação (°)	0,750
Número de átomos sem H	
Total	14951
Macromoléculas	14272
Fator de B-médio (Å ²)	
Global	34,2
Macromoléculas	34,2
Solvente	34,8
R_{SCC} global	0,9527
R_{SR} global	0,1222
Gráfico de Ramachandram (%)	
Favoráveis	91,7
Adicionalmente permitidas	8,0
Generosamente permitidas	0,3
Não permitidas	0,0

Legenda: os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução.

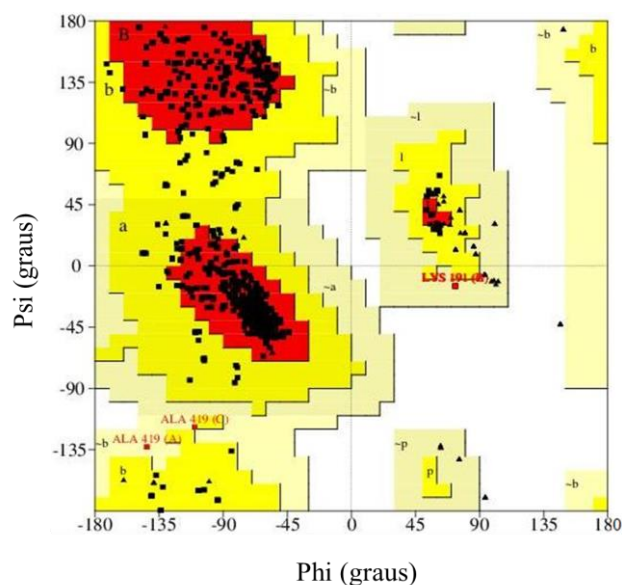
Fonte: O autor.

1.4.1.2 Validação da estrutura

1.4.1.2.1 Avaliação dos ângulos torcionais da cadeia principal

A qualidade estereoquímica da estrutura no tocante aos ângulos phi (φ) e psi (ψ) pode ser constatada no gráfico de Ramachandran (Figura 11). Dos 2.021 aminoácidos analisados, 91,7% estão em regiões favoráveis, 8,0% em regiões adicionalmente permitidas e 0,3% em regiões generosamente permitidas. Nesta última região estão as Lys191 dos 4 monômeros, porém, elas apresentam densidades eletrônicas ($+1\sigma$) que corroboram suas conformações não usual, que são observadas na mesma orientação nas seguintes estruturas homólogas: PpHAL, PaPAM, AvPAL e PcPAL. Por outro lado, as Ala419 dos monômeros A e C apresentam baixa conectividade de densidade eletrônica ($+0,5\sigma$) da cadeia principal, o que indica esta região ser relativamente desordenada.

Figura 11 - Gráfico de Ramachandran da enzima TcHAL.

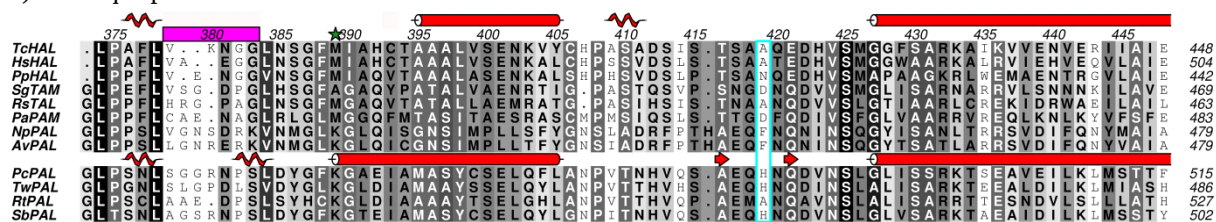


Legenda: as glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões favoráveis; em amarelo de regiões adicionalmente permitidas; em bege de regiões generosamente permitidas e em branco de regiões não permitidas. Figura gerada pelo programa Procheck.

Fonte: O autor.

No alinhamento da Figura 12 mostra que a Ala419 não é conservada em todas as estruturas homólogas e também não pertence a resíduos do sítio ativo.

Figura 12 - Parte do alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas homólogas representativas (Fig. 6). Destaque para o resíduo Ala419.



Legenda: o retângulo em ciano destaca os resíduos da posição equivalente a Ala419 em TcHAL.

Fonte: O autor.

1.4.1.2.2 Coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e valor residual no espaço real (RSR)

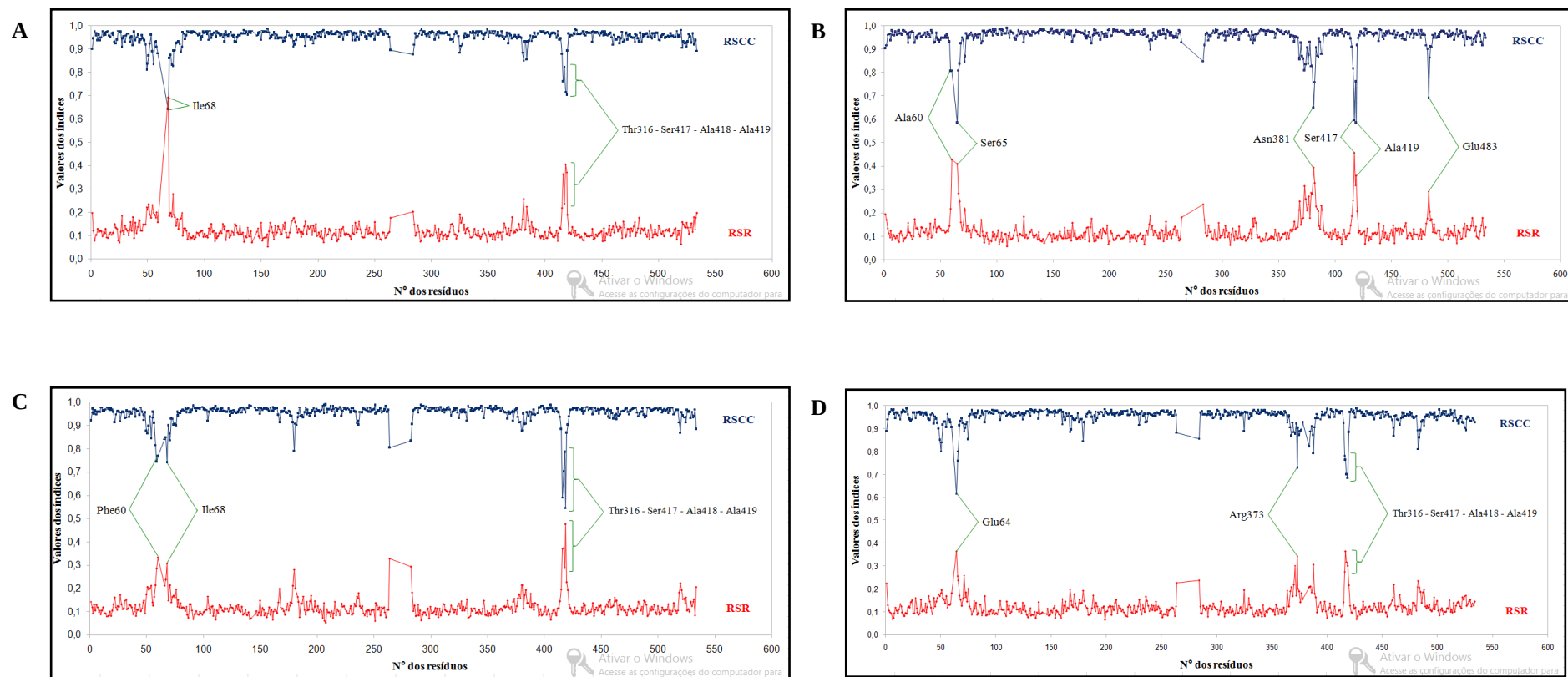
Para estimar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, realizaram-se cálculos dos índices RSCC e RSR, mostrados na Tabela 2 (por monômero global) e nos gráficos (por resíduo) da Figura 13 (A, B, C e D).

Tabela 2 - Valores globais de RSCC e RSR por monômero.

Monômeros	RSCC	RSR
A	0,9534	0,1212
B	0,9525	0,1237
C	0,9541	0,1198
D	0,9506	0,1241
Todos os monômeros	0,9527	0,1222

Fonte: O autor.

Figura 13 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.



Legenda: (A) monômero A; (B) monômero B; (C) monômero C e (D) monômero D.

Fonte: O autor.

Nos gráficos da figura 13, é possível constatar que entre os resíduos 59 e 68 para os monômeros A, B e C, a desordem é maior, o que nos determinou, na maioria dos casos, a não modelá-los, variando-se em um ou três resíduos a mais ou a menos conforme o monômero. Exceção apenas para o monômero D, para o qual, apesar ainda da desordem, ao menos uma baixa densidade eletrônica contínua correspondente à cadeia principal pode ser observada, o que permitiu, então, a modelagem.

Os resíduos 415 a 425 de todas os monômeros também correspondem a uma região desordenada, dificultando a modelagem. Esta região em particular foi submetida a um *annealing* computacional durante o refinamento, fornecendo energia para permitir a mobilidade e uma possível melhoria de ajuste desses resíduos há densidade eletrônica. Desordem semelhante também foi observada para os resíduos da Asn381 e Glu483 do monômero A e ainda com a Arg373 do monômero D. O alinhamento apresentado do Figura 6 contém os elementos de estrutura secundária e permite identificar as regiões desordenadas da estrutura.

1.4.1.2.3 Avaliação da geometria dos rotâmeros

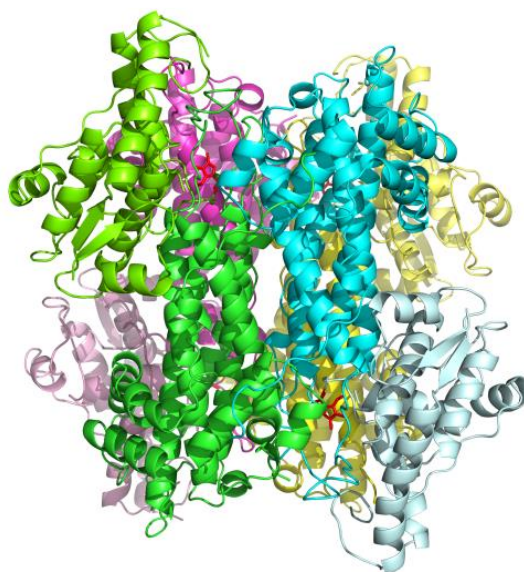
A validação realizada pelo programa Molprobity permitiu constatar que de um total de 2.021, apenas 44 não estão entre os mais comuns, porém, estão ajustados corretamente na densidade eletrônica, o que confirma a posição em que foram modelados.

1.4.1.3 Análises e comparações estruturais

1.4.1.3.1 Estrutura da TcHAL e topologia

A estrutura global do homotetrâmero na unidade assimétrica é mostrada na Figura 14.

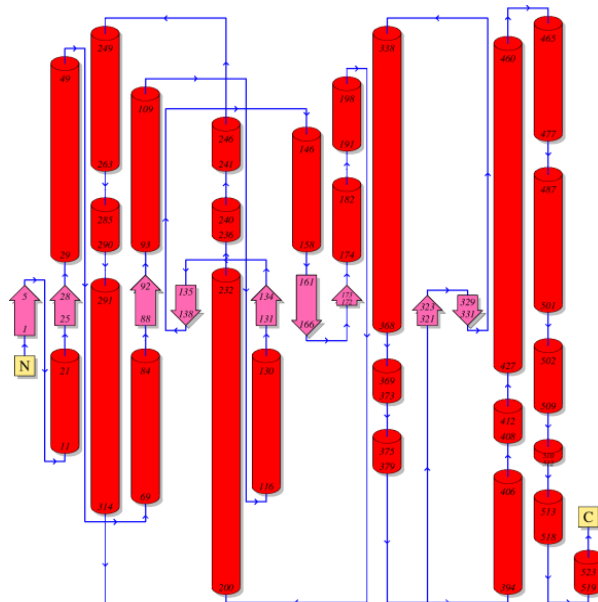
Figura 14 - Estrutura tridimensional da TcHAL.



Legenda: monômeros coloridos como: A (verde), B (ciano), C (violeta) e D (amarelo). As tonalidades mais escuras dentro de cada cor representam o domínio central e as tonalidades mais claras o domínio do MIO. Em vermelho apresenta-se a molécula de MIO para cada monômero.
Fonte: O autor.

A Figura 15 mostra um diagrama de topologia do homotetrâmero que explicita os elementos de estrutura secundária e sua conectividade.

Figura 15 - Diagrama de topologia do monômero da TcHAL.



Legenda: em forma de cilindros vermelhos estão as hélices- α , em setas rosas as fitas- β e em linhas em azuis os *loops*.

Fonte: Laskowski (2018).

Os demais resultados indicaram (Tabela 3) que entre os monômeros A:B e C:D há maior área interfacial, maior número de ligações de hidrogênio e pontes salinas, portanto,

estes monômeros apresentam maior interação entre si do que com os demais monômeros.

Tabela 3 - Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C, e D) correspondentes ao tetrâmero.

Monômeros	Nº de resíduos em contato	Áreas de interface/Å ²	Nº de pontes salinas	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de contatos sem ligações
A : B	81 : 81	4008 : 3984	12	54	585
C : D	81 : 79	3954 : 3976	12	54	582
A : C	58 : 56	2758 : 2782	4	18	287
B : D	53 : 57	2764 : 2713	4	17	279
A : D	3 : 3	137 : 136	-	-	8
B : C	3 : 3	148 : 152	-	-	11

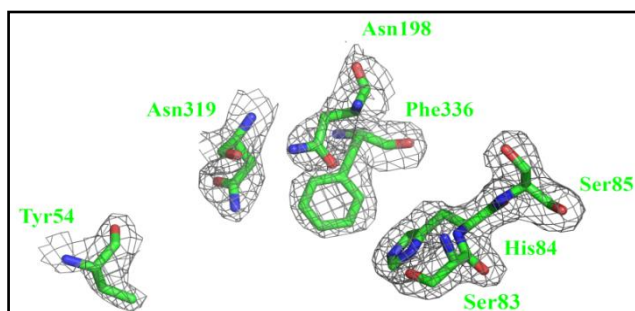
Legenda: o símbolo ":" representa as inter-relações entre os monômeros, entre os resíduos e áreas de interface.

Fonte: Laskowski (2018).

1.4.1.3.2 Análises do sítio ativo e contatos com o ligante SFE

O ligante (3S)-3-amino-3-fenilpropanóico (código PDB ID: SFE), presente na estrutura homóloga PaPAM, foi utilizado como referência para verificação do sítio ativo, uma vez que apresenta alta similaridade estrutural com o substrato, L-histidina. Ao analisar os contatos desse ligante, foi possível identificar os resíduos equivalentes a TcHAL na cavidade do sítio ativo, a saber, Tyr54, Gly61, Asn198, Asn319 e Phe336, que são conservados nas estruturas homólogas (Figura 6). A Figura 16 mostra a densidade eletrônica para esses resíduos e suas posições atômicas modeladas, exceto que a cadeia lateral do Tyr54 foi modelada apenas até C γ e Gly61 não foi modelado devido à falta de densidade, o que indica que eles estão desordenados na estrutura. Os resíduos que fornecem seletividade do substrato são relativamente próximos, Ser83, His84 e Ser85, respectivamente.

Figura 16 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica para resíduos do sítio ativo e seletividade de substrato da TcHAL do monômero C.



Legenda: o mapa de densidade eletrônica (2mFo-DFc) foi desenhado com o contorno +1 σ (cinza).

Fonte: O autor.

1.4.1.3.3 Análises e comparações entre monômeros e estruturas protéicas homólogas

A sobreposição pareada dos quatro monômeros da TcHAL não revelou diferenças estruturais significativas em suas conformações, como pode ser observado pelos valores de RMSD que variou entre 0,139 e 0,3130 Å.

Com base nos critérios de seleção descritos no item 1.3.1.3.3, foram identificadas 28 proteínas homólogas com estrutura resolvida e depositadas no PDB, sendo estas pertencentes a 10 organismos distintos. As estruturas escolhidas foram 1GKM, 2OHY, 2O6Y, 3UNV, 2NYF, 2NYN, 1W27, 4V2Q, 1Y2M e 6AT7 para análises e comparações estruturais (Tabela 4).

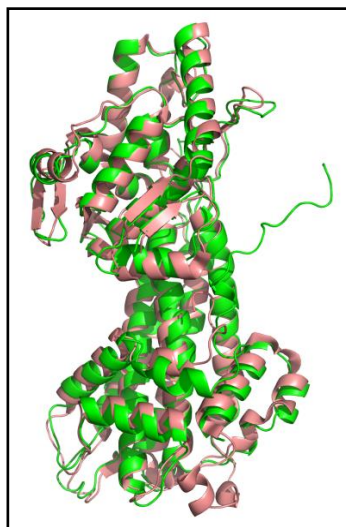
Tabela 4 - Proteínas homólogas à TcHAL utilizadas nas comparações estruturais.

Código (PDB ID)	Resolução (Å)	Proteína/ Organismo/Sigla	Cobertura (%)	Identidade (%)
1GKM	1,00	Histidina Amônio Liase/ <i>Pseudomonas putida</i> / PpHAL	89	42
2OHY	2,50	Tirosina Aminomutase/ <i>Streptomyces globisporus</i> / SgTAM	94	36
2O6Y	1,50	Tirosina Amônio Liase/ <i>Rhodobacter sphaeroides</i> / RsTAL	90	35
3UNV	1,54	Fenilalanina Aminomutase/ <i>Pantoea agglomerans</i> / PaPAM	88	33
2NYF	2,50	Fenilalanina Amônio Liase/ <i>Nostoc punctiforme</i> / NpPAL	81	31
2NYN	1,90	Fenilalanina Amônio Liase/ <i>Anabaena variabilis</i> / AvPAL	82	31
1W27	1,70	Fenilalanina Amônio Liase/ <i>Petroselinum crispum</i> / PcPAL	85	30
4V2Q	1,95	Fenilalanina Amônio Liase/ <i>Taxus wallichiana</i> / TwPAL	80	29
1Y2M	1,60	Fenilalanina Amônio Liase/ <i>Rhodospiridium toruloides</i> / RtPAL	84	28
6AT7	2,49	Fenilalanina Amônio Liase/ <i>Sorghum bicolor</i> / SgPAL	81	29

Fonte: O autor.

Ainda assim, ao comparar com a estrutura PpHAL, além do fato de que os resíduos do sítio ativo são conservados, as sobreposições estruturais gerais de monômeros confirmam a alta similaridade estrutural, com um valor RMSD de 1,328 Å para os principais átomos da cadeia C da TcHAL e cadeia A da PpHAL, mostrada na Figura 17.

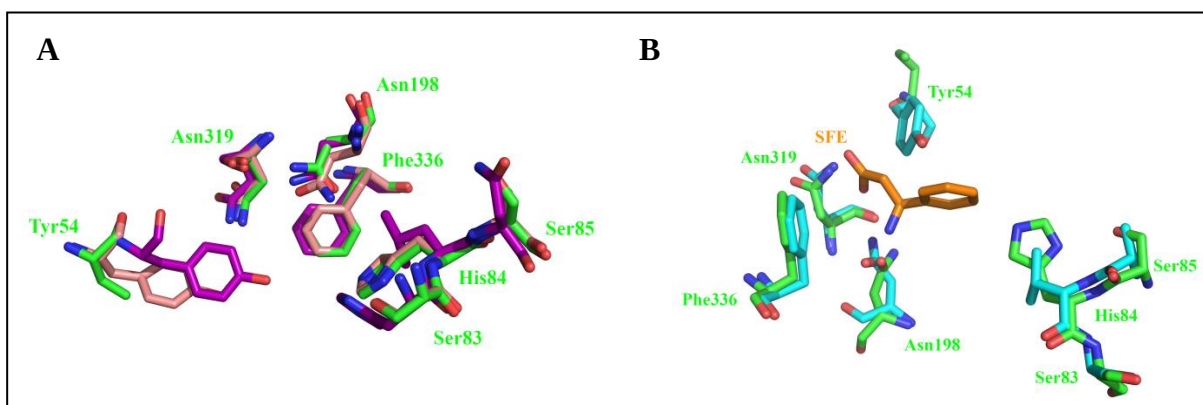
Figura 17 - Sobreposição de monômero de *Tc*HAL e *Pp*HAL.



Legenda: monômero C de *Tc*HAL (em verde) com o monômero A de *Pp*HAL (em salmão).
Fonte: O autor.

A Figura 18-A mostra a sobreposição dos resíduos dos sítios ativos de *Tc*HAL, *Pp*HAL e *Sb*PAL. Suas conformações são aproximadamente conservadas. A cadeia lateral Tyr54 (*Tc*HAL) foi modelada até C γ como mencionado anteriormente. Quando se compara *Tc*HAL a *Pa*PAM (Figura 18-B), uma enzima aminomutase, também se observa similaridade estrutural do sítio ativo.

Figura 18 - Sobreposição de resíduos do sítio ativo.

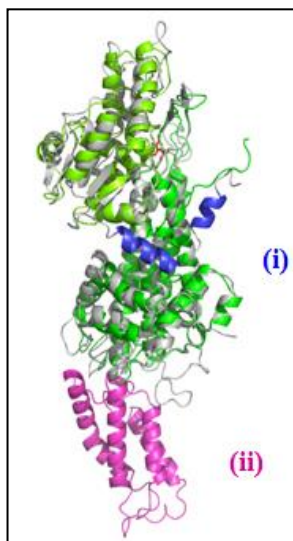


Legenda: A) *Tc*HAL (verde), *Pp*HAL (salmão) e *Sb*PAL (roxo). B) *Tc*HAL (verde), *Pa*PAM (ciano) e o ligante SFE (alaranjado - ligado à *Pa*PAM). Os resíduos Ser83, His84 e Ser85 fornecem seletividade para *Tc*HAL (veja acima).
Fonte: O autor.

A sobreposição entre as estruturas *Tc*HAL e *Pc*PAL indica a ausência em *Tc*HAL das duas primeiras hélices encontradas na *Pc*PAL (resíduos 30 a 35 e 41 a 52), destacadas pela coloração em azul (i) - na Figura 19. Além disso, nesta figura, observa-se que os domínios MIO e central são comuns a ambas as estruturas, mas não o domínio de proteção (RITTER;

SCHULZ, 2004), indicado como ausente na *TcHAL* pela região colorida em violeta (ii).

Figura 19 - Sobreposição dos monômeros da *TcHAL* e *PcPAL*.

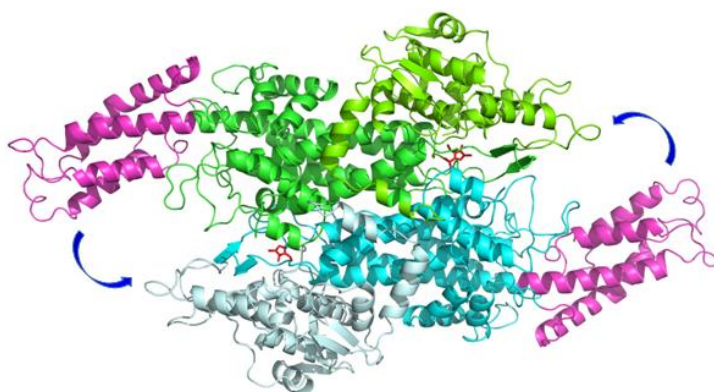


Legenda: monômero C de *TcHAL* (verde) com o monômero A de *PcPAL* (cinza-azul-violeta). As regiões coloridas em azul e violeta indicam motivos não presentes no *TcHAL*, (i) hélices iniciais (N-terminal) e (ii) domínio de proteção, respectivamente.

Fonte: O autor.

Assim, *TcHAL* é a primeira estrutura de amônia-liase resolvida a partir de um eucarioto que não apresenta o domínio de proteção. De acordo com Ritter e Schulz (2004), esse domínio está presente nas enzimas de plantas e fungos, formando uma estrutura em forma de arco sobre o sítio ativo do domínio MIO. Na Figura 20, pode ser melhor visualizada a funcionalidade deste domínio de proteção para o dímero cristalográfico da *PcPAL*.

Figura 20 - Estrutura tridimensional da *PcPAL*.



Legenda: monômero A (verde) e monômero B (ciano). As tonalidades mais escuras dentro de cada cor representam o domínio central e as tonalidades mais claras o domínio do MIO. Em violeta está destacado o domínio de proteção para ambos os monômeros. Em vermelho representa-se a molécula de MIO para cada monômero. As setas em azuis representam movimento em forma de "arco" que o domínio de proteção deve realizar sobre o sítio ativo do domínio do MIO do monômero complementar do dímero cristalográfico.

Fonte: O autor.

Além disso, o domínio de proteção restringe o acesso ao sítio ativo de modo que o risco de inativação por nucleófilos seja minimizado e também controla a atividade da enzima (RITTER; SCHULZ, 2004). A hipótese da ausência desta região para a *TcHAL* pode estar relacionada à diferenças de ambiente químico, levando à seleção natural de variantes da HAL sem o domínio de proteção. Em que pesem as limitações em termos da quantidade de estruturas disponíveis e analisadas, pode-se supor que a perda do domínio de proteção esteja relacionada à evolução dos eucariotos. A *TcHAL* pertence à família de aminoácidos aromáticos liases, que também inclui Fenilalanina e Tirosina Amônio Liasas, código PF00221 no banco de dados pfam (http://pfam.xfam.org/family/Lyase_aromatic).

1.4.1.3.4 Seletividade do substrato da *TcHAL*

Foi apontado por Louie et al. (2006) e Watts et al. (2006) que os resíduos 83-84-85 (numeração de *TcHAL*) podem indicar a seletividade do substrato para amônio-liases aromáticas e, assim, permitir a predição dos substratos de enzimas dessa família. Para a atividade HAL, His e Ser devem estar nas posições 84-85, respectivamente, enquanto na posição 83 deve haver preferencialmente uma His para atividade TAL ou uma Phe para atividade PAL, seguida por uma Leu na posição 84, embora exceções possam ser encontradas. A mutação His84Leu também demonstrou levar à perda de atividade na *PpHAL* (BAEDEKER; SCHULZ, 2002). Além disso, Jun et al. (2018) apontam que na posição 389 as HAL apresentam uma Met enquanto as PAL apresentam uma Lys. De acordo com o alinhamento mostrado na Figura 6, a *TcHAL* apresenta Ser83, His84, Ser85 e Met389, resíduos que estão de acordo com a atividade HAL observada em experimentos relatados anteriormente por Miranda; Silva e Iulek (2015).

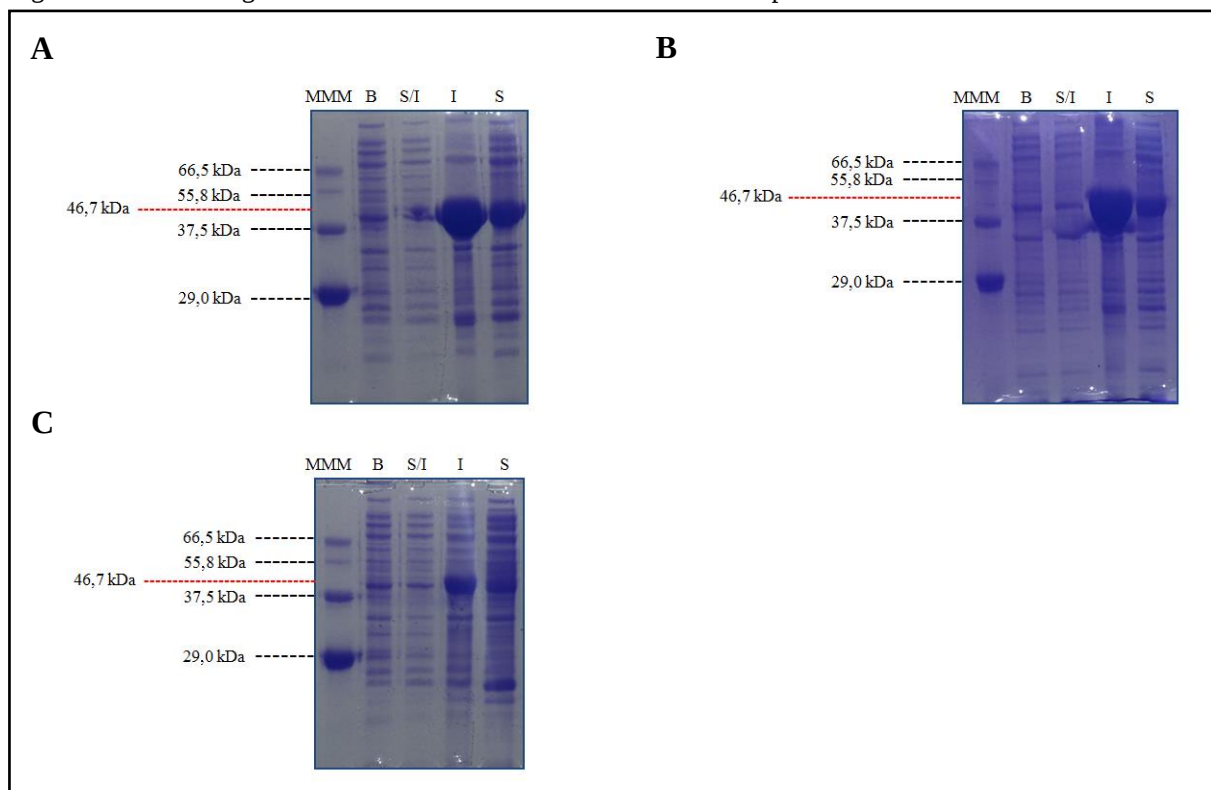
1.4.2 Imidazolona Propionase

1.4.2.1 Expressão da *TcIP*

Os resultados dos testes de expressão heteróloga da proteína *TcIP* foram analisados por SDS (12%) (Figura 21-A, B e C). Comparando-se as bandas das proteínas presentes na bactéria *E.coli* BL21 (DE3) não transformada (raia B) com as outras frações; sem indutor IPTG (S/I), com IPTG fração insolúvel (I) e com IPTG fração solúvel (S), observa-se que houve a expressão da proteína *TcIP* tanto na fração I quanto na fração S. Os resultados

permitiram definir a melhor condição com o seguinte protocolo: meio LB com kanamicina $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e tetraciclina $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de IPTG sob agitação de 150 rpm por 16 h a 25°C .

Figura 21 - Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente aos testes de expressão da *TcIP*.



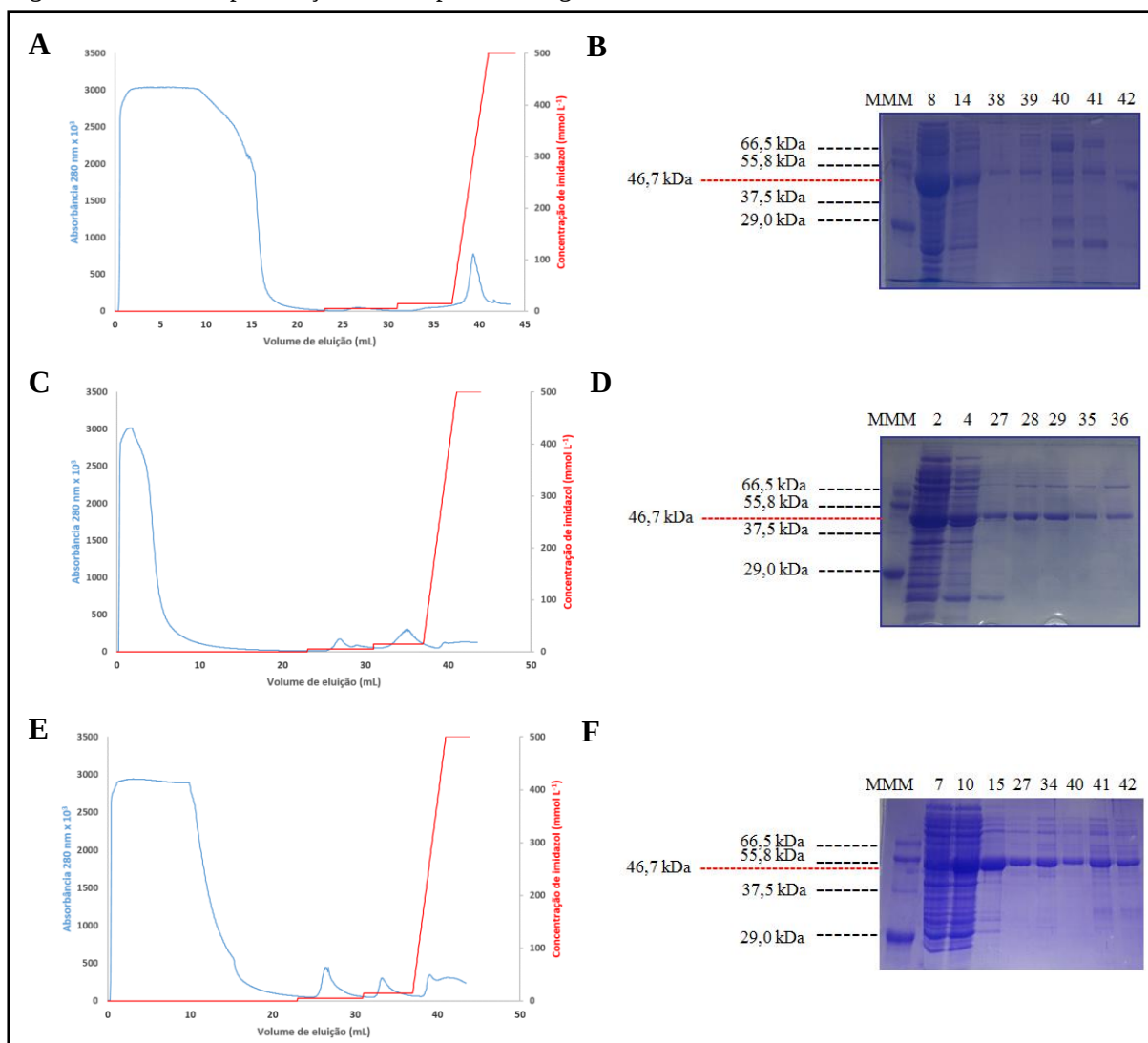
Legenda: temperaturas testadas - A) 20°C , B) 25°C e C) 37°C . Raia MMM: Marcador de massa molecular (albumina serina bovina- 66,5 kDa; β -amilase - 55,8 kDa; álcool desidrogenase - 37,5 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa). Raia B: Bactéria não transformada. Raia S/I: Sem IPTG. Raia I: Fração insolúvel. Raia S: Fração solúvel. A linha em vermelho aponta as bandas das frações insolúveis e solúveis da *TcIP* (46,7 kDa).

Fonte: O autor.

1.4.2.2 Purificação por cromatografia de afinidade

A fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade em resina contendo Ni^{+2} imobilizado. O perfil cromatográfico (Figura 22-A) apresentou dois picos bem separados e a análise por gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) (Figura 22-B) mostrou que *TcIP* eluiu significativamente durante a passagem de tampão de ligação. A partir disso, realizou-se outra cromatografia, testando um tampão de ligação sem imidazol, mas ainda obteve-se o mesmo resultado anterior.

Figura 22 - Testes de purificação da TcIP por cromatografia de afinidade.



Legenda: cromatogramas das frações eluídas estão mostradas nas figuras A, C e E. As linhas azuis representam a absorvância enquanto que as vermelhas destacam os gradientes de imidazol feito com o tampão eluição. Eletroforegrama SDS-PAGE (12%) de algumas frações eluídas dos picos observados nos cromatogramas B, D e F. Raia MMM: Marcador de massa molecular (albumina serina bovina- 66,5 kDa; β -amilase - 55,8 kDa; álcool desidrogenase - 37,5 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa). 10 μ L de solução de proteína foram injetadas por raia. A linha em vermelho aponta as bandas da TcIP (46,7 kDa).

Fonte: O autor.

Diante da ineficiência da proteína se ligar ao íon Ni^{+2} , tentou-se purificar utilizando outros íons metálicos queláveis, como o Cu^{+2} (Figura 22-C e D) e Co^{+2} (Figura 22-E e F). Nestes testes, além da ocorrência da eluição da proteína TcIP durante a aplicação do gradiente do imidazol, algumas outras proteínas contaminantes também foram eluídas.

Segundo Drenth (1999), o alto grau de pureza da amostra é crucial para a etapa de cristalização de proteínas. Em geral, considera-se um grau de pureza da amostra protéica entre 90-95% como satisfatório para o início dos ensaios de cristalização. As contaminações podem

interferir no processo de nucleação e na obtenção de cristais adequados (BENVENUTI; MANGANI, 2007).

Considerando os resultados pouco satisfatórios quanto a purificação da TcIP e as dificuldades evidentes para a cristalização da proteína, optou-se por não realizar ensaios de cristalização até que a proteína seja obtida com maior grau de pureza.

Enquanto não é possível obter a estrutura de uma dada proteína por métodos experimentais, a modelagem por homologia *in silico* mostra uma aliada importante para a área de biologia estrutural. Nesse contexto e para minimizar a falta de informações da estrutura experimental da TcIP, foi construído um modelo por homologia.

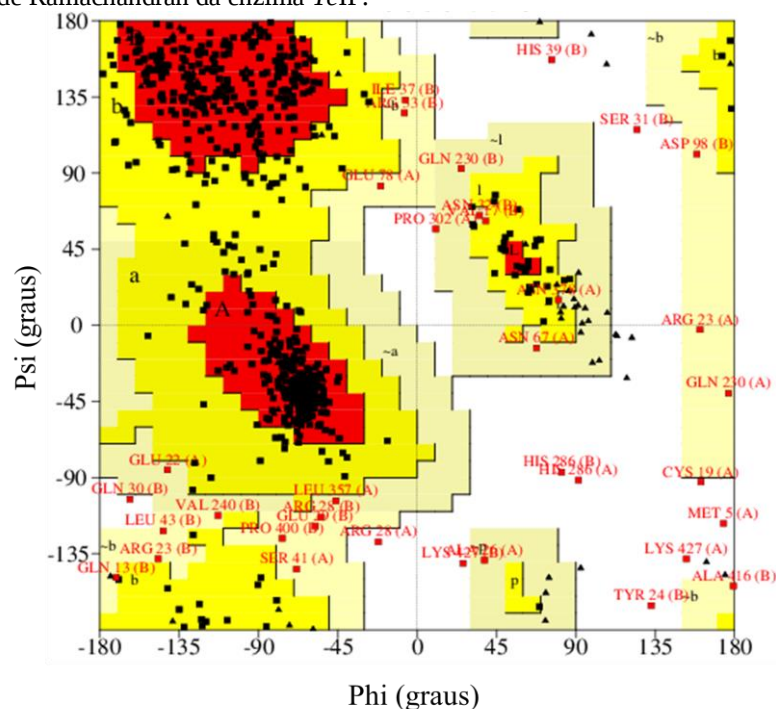
1.4.2.3 Modelagem por homologia da TcIP

Considerando os critérios de seleção apresentados no item 1.3.2.4 e a utilização da ferramenta BLAST foi possível identificar 27 proteínas homólogas, de 10 diferentes organismos. Foram selecionadas as seguintes estruturas moldes, códigos PDB e (organismo): 2BB0 (*Bacillus subtilis*) e 2PUZ (*Agrobacterium tumefaciens*), as quais apresentaram 39,55 e 39,50%, respectivamente, de identidade com a enzima IP de *T. cruzi*. Com o programa computacional Modeller, foram construídos 150 modelos. A estrutura escolhida apresentou DOPE normalizado igual a (-0,497), representando menor energia e maior estabilidade.

1.4.2.4 Análise do modelo gerado por homologia

O gráfico de Ramachandran da estrutura indicou que 78,2% dos aminoácidos nas regiões favoráveis, 17,4% em regiões adicionalmente permitidas, 2,9% em regiões generosamente permitidas e 1,5 % em regiões não permitidas (Figura 23). A porcentagem significativa de resíduos nas regiões não permitidas do gráfico, pode estar relacionada com a baixa identidade e cobertura sequencial das proteínas moldes utilizadas para modelagem por homologia da TcIP.

Figura 23 - Gráfico de Ramachandran da enzima *TcIP*.

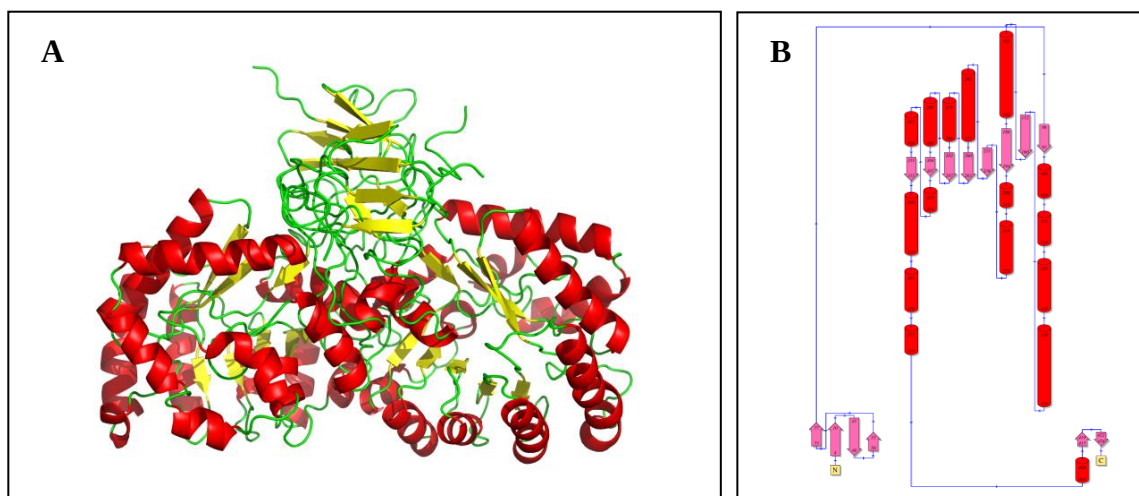


Legenda: as glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões favoráveis; em amarelo de regiões adicionalmente permitidas; em bege de regiões generosamente permitidas e em branco de regiões não permitidas. Figura gerada pelo programa Procheck.

Fonte: O autor.

O modelo final da *TcIP* (Figura 24-A) apresenta uma organização estrutural mostrada no diagrama de topologia para um monômero (Figura 24-B).

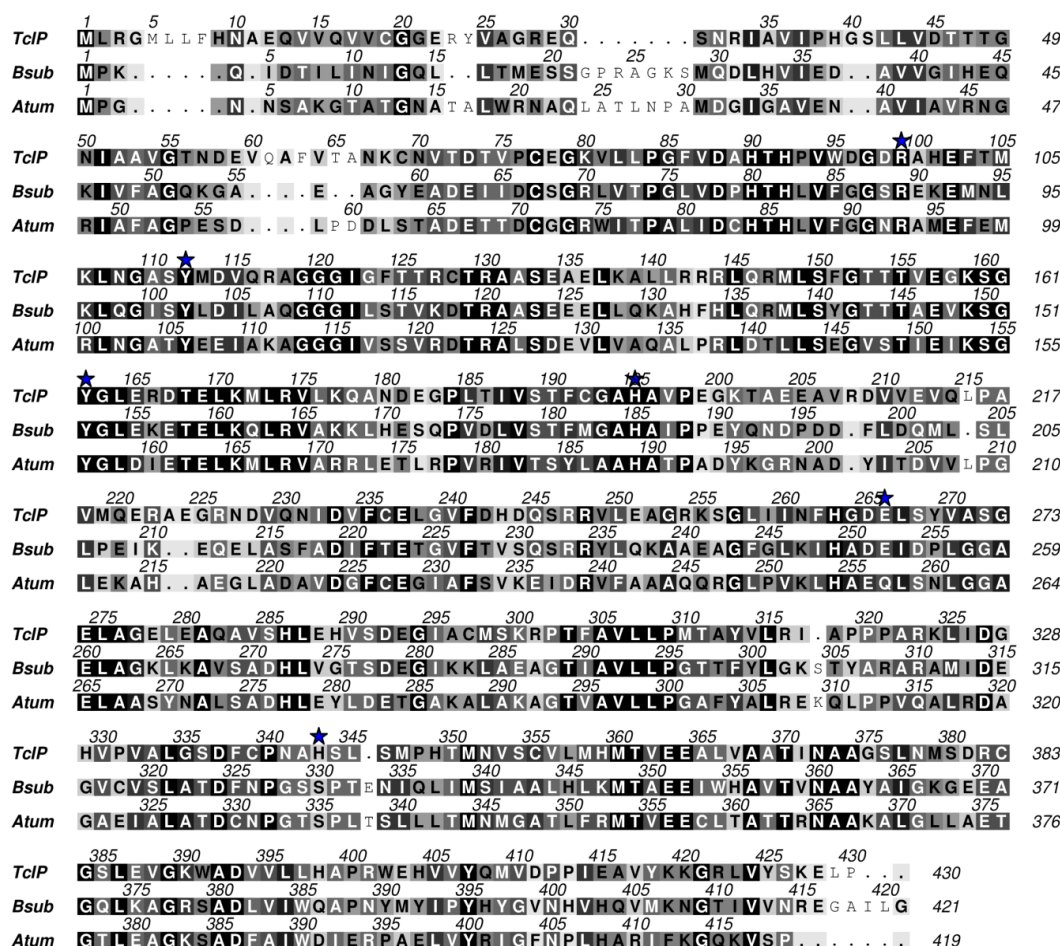
Figura 24 - A) Estrutura da enzima *TcIP* obtida por modelagem por homologia. B) Topologia de *TcIP* gerado pelo PDBSum.



Fonte: O autor.

O alinhamento entre as sequências moldes está apresentado na Figura 25 e, por meio da comparação sequencial com *Bacillus subtilis* (YU et al., 2006), pode-se verificar os resíduos do sítio ativo da *TcIP*: Arg99, Tyr112, Tyr162, His195, Glu296 e His343.

Figura 25 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas *Bsub* (código PDB: 2BB0) e *Atum* (código PDB: 2PUZ).



Legenda: o fundo do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

Fonte: O autor.

A partir do modelo por homologia da *TcIP* obtido poderão ser realizados estudos de inibição *in silico*, de modo a tentar encontrar um composto para modular a função normal do alvo de uma forma seletiva e geralmente reversível. Nesta etapa, torna-se necessário o conhecimento dos locais de interação possíveis para dockagem de ligantes que proporcionem uma alternativa quimioterápica mais específica e menos tóxica para o tratamento da doença de Chagas. Porém, considerando-se que a busca de inibidores deve priorizar estruturas tridimensionais de alta resolução obtidas experimentalmente, torna-se importante a resolução da estrutura pelo método de cristalografia de raios X.

1.5 CONCLUSÕES

- A proteína *TcHAL*, foi expressa, cristalizada e teve sua estrutura 3D resolvida na resolução máxima de 2,55 Å;
- Uma Cys (393 em *TcHAL*) é oxidada, mas em estruturas homólogas esse aminoácido é diferente com exceções são as seqüências de isoformas HAL humanas 1, 2 e 3, que também apresentam uma cisteína na posição correspondente;
- A estrutura *TcHAL* é a primeira proteína HAL eucariótica a ser relatada na literatura, mas no momento, há apenas uma estrutura HAL homóloga relatada de *Pseudomonas putida*;
- A *TcHAL* apresenta 2 domínios (domínio MIO e domínio central), que foram identificados de acordo com a sobreposição estrutural, portanto, como encontrado nas estruturas dessa família de proteínas que não provêm de fungos ou plantas;
- A *TcHAL* não possui o chamado domínio de proteção, além disso, é a primeira estrutura de amônio-liase resolvida a partir de um eucarioto que não apresenta esta região;
- A estrutura da *TcHAL* foi depositada no PDB (código: 6V6H);
- A proteína *TcIP*, foi expressa, porém, os testes de purificação não foram eficazes para obtê-la numa pureza adequada para realização dos ensaios de cristalização, deste modo, a estrutura foi resolvida por modelagem por homologia.

CAPÍTULO 2 - GLICERALDEÍDO 6-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Candida albicans* (CaGAPDH)

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Candidíase

A *Candida albicans* é uma levedura que pertence ao gênero *Candida* e está presente na microbiota humana saudável. Estes microorganismos podem ser encontrados na pele, cavidade oral e tratos intestinais e urogenitais (PAPAS et al., 2016). Porém, para indivíduos com sistema imunológico saudável frequentemente são inofensivos (ENDE; WIJNANTS; DIJCK, 2019). No entanto, os indivíduos imunossuprimidos ficam vulneráveis a esse patógeno oportunista, podendo causar infecções superficiais orais, vaginais e cutânea (TELLES; KARKI; MARSHAL, 2017).

Indivíduos acometidos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), em diferentes estágios da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), podem desencadear infecções superficiais orais e vaginais (MOHAMED; LU; MOUNMIN, 2019) em decorrência da candidíase. Entretanto, a grande maioria dos pacientes são acometidos pela candidíase oral (TELLES; KARKI; MARSHAL, 2017). No caso da candidíase vulvovaginal ocorre em mulheres na idade fértil e algumas delas apresentam uma infecção recorrente (FREIDA et al., 2017).

A candidíase também afeta aqueles indivíduos em tratamento com imunossupressores, indicados em certos tipos de câncer (HUMBERT et al., 2018) ou cirurgias de transplantes de órgãos (ENDE; WIJNANTS; DIJCK et al., 2019). Além disso, existe o risco por complicações clínicas invasivas, como o uso de cateteres venosos que podem permitir o acesso a levedura à corrente sanguínea, chamada candidíase sistêmica (TOBUDIC et al., 2012; KOBAYASHI-SAKAMOTO et al., 2018). Os estudos conduzidos por Yesilkaya et al. (2017), revelaram que esta forma de infecção corresponde aproximadamente a 40% de mortalidade.

De acordo com Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) (CDC, 2019), a candidíase sistêmica é causada majoritariamente por *C. albicans* (37%) e *C. glabrata* (27%). Outras espécies relevantes são: *C. parapsilosis* (14%), *C. tropicalis* (8%), *C. dubliniensis* (3%), *C. krusei* (2%), *C. lusitaniae* (2%). Ademais, a *C. auris* vem sendo o patógeno emergente mais preocupante, devido a apresentar resistência a vários medicamentos, com

aumento de casos de 318% entre 2015 a 2018. O estudo revelou também em 2017 um número estimado de 34.000 casos de candidíases em pacientes hospitalizados e aproximadamente 1.700 mortes.

Devido a falta de testes para o diagnósticos rápidos à candidíase invasiva, na maioria dos casos a doença é diagnosticada por culturas fúngicas de sangue, tecido urinário e outros fluidos corporais. Por motivo de risco de contaminação, este método possui uma baixa sensibilidade e pode levar a resultados falso-positivos (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Atualmente os agentes antifúngicos são divididos em quatro classes principais: os azóis, que inibem a biossíntese de ergosterol, os polienos que se combinam com o ergosterol na membrana celular, as equicandinas que inibem a biossíntese de β -1,3-glicose e flucitosinas que inibe a síntese de DNA (ZAVREL; WHITE, 2015; BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Azóis correspondem à classe de medicamentos mais utilizados para defesa contra infecções fúngicas; estes quimioterápicos não matam as células, mas inibem o seu crescimento. Nas últimas três décadas, a terapia prolongada tem levado ao desenvolvimento de resistência aos azóis. Em geral, a resistência antifúngica pode ser intrínseca ou adquirida; a intrínseca é uma característica herdada de cada espécie, sem o contato com a droga. Por outro lado, a resistência adquirida normalmente se desenvolve durante o tratamento prolongado e, por vezes, mal conduzidos com o antifúngico, o que resulta em alterações genéticas ou epigenéticas que aumentam a aptidão das células na presença da droga (ZAVREL; WHITE, 2015). No entanto, das classes antifúngicas que incluem os polienos, equinocandinas e flusitosinas, o custo, os efeitos colaterais e a biodisponibilidade limitam o seu uso (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020). Deste modo, existe a necessidade de se identificar novos alvos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos (CHANDER et al., 2013; CHEN et al., 2020).

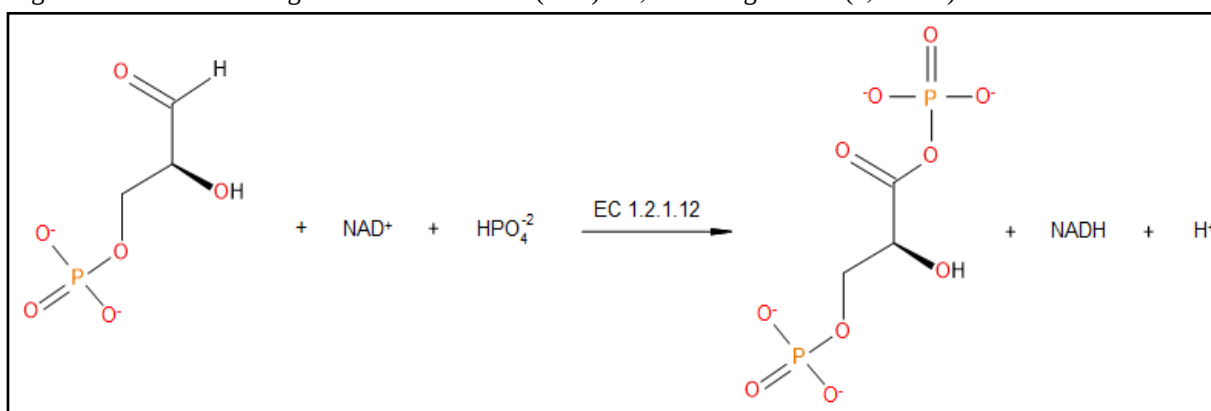
Nessas perspectivas, diversos alvos moleculares potenciais para esses agentes antifúngicos têm sido indicados (McCARTHY et al., 2017; LIU et al., 2018; MAZU et al., 2017), alguns deles da via glicolítica: enolase, piruvato quinase, HXK2 (hexoquinase), frutose-1,6-bisfosfatase, trealose-6P fosfatase, trealose-6-fosfato sintase, fosfoenolpiruvato carboxicinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (CHEN et al., 2020). O estudo realizado por Gil et al. (1999) relata a capacidade da enzima GAPDH de *C. albicans* em se ligar a fibronectina e laminina dos hospedeiros. Essas ligações ajudam no processo de adesão de células fúngicas durante as infecções por candidíase. Apesar da necessidade de

identificar outras viabilidades experimentais é possível considerar a GAPDH um potencial alvo antifúngico (CHEN et al., 2020).

2.1.2 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A GAPDH (EC 1.2.1.12) é uma enzima que tem ação na conversão do gliceraldeído 3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BGP) (SKARZYNSKI; MOODY; WONACOTT, 1987) (Figura 26).

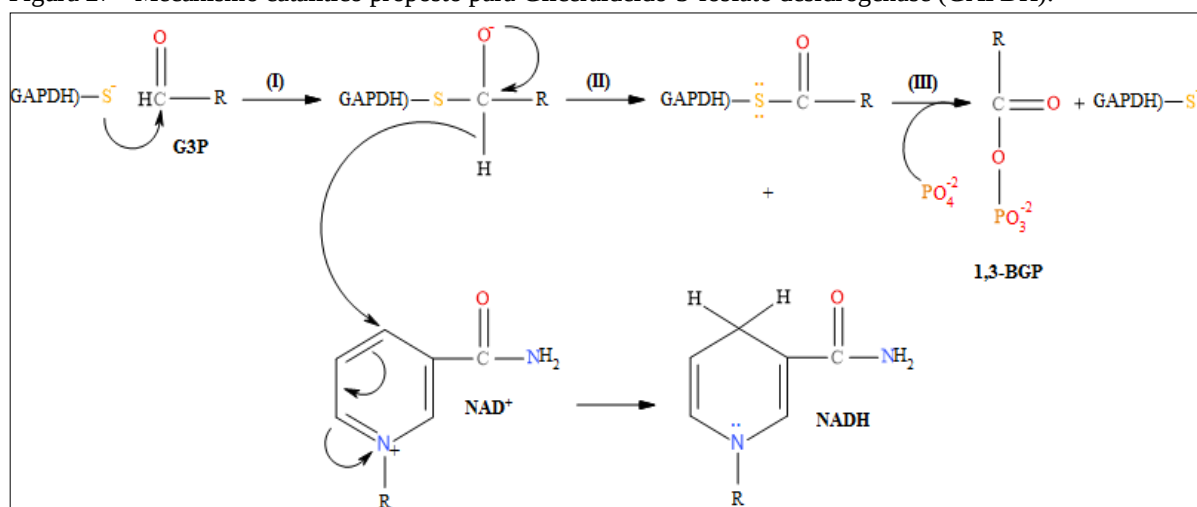
Figura 26 - Conversão de gliceraldeído 3-fosfato (G3P) a 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BGP).



Fonte: Placzek et al. (2019).

Esta enzima pertence à classe das oxirredutases, ela cataliza a sexta etapa da via glicolítica em presença do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (MURONETZ et al., 2015). O mecanismo catalítico da GAPDH consiste em três etapas (Figura 27), a primeira envolve um tiolato de cisteína do sítio ativo que reage com o grupo aldeído G3P para formar um intermediário tiohemiacetal (I), que após a transferência de hidreto para o cofator NAD⁺, colapsa em um tioéster de acila (II). Após a dissociação do NADH e a ligação de outro NAD⁺ equivalente, o fosfato inorgânico ataca e desloca o acetil éster para gerar 1,3-BGP (CANE; SOHNG, 1989; CANE; SOHNG, 1994; SEGAL; BOYER, 1953).

Figura 27 - Mecanismo catalítico proposto para Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).



Legenda: (I) um tiolato do sítio ativo ataca o grupo aldeído G3P para gerar um intermediário tiohemiacetal. (II) Após a transferência de hidreto para NAD^+ , é gerado um tioéster que é deslocado pelo fosfato inorgânico (III) para gerar 1,3- bifosfoglicerato (1,3-BGP).

Fonte: Adaptado de Rodriguez et al. (2005).

A GAPDH tem o papel principal de fornecer energia para diferentes funções celulares (BARINOVA et al., 2017). Além disso, é uma proteína que exerce numerosas funções; há evidências de sua participação no reparo do DNA, morte celular, autofagia, apoptose e entre outras (SIROVER, 2012). Há relatos também no envolvimento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo: mal de Parkinson (TSUCHIYA et al., 2005), mal Alzheimer's (NALETOVA et al., 2008), doença de Huntington (MIKHAYLOVA et al., 2016), cânceres (JUNG et al., 2014) e distúrbios metabólicos (BERRY, 2004).

Devido ao seu papel fundamental no metabolismo energético, sua abundância e uma conservação notável durante a evolução, esta enzima tem sido vastamente estudada. A GAPDH já foi isolada de uma variedade de reinos distribuídos na natureza. A ocorrência dessa enzima em organismos distantes filogeneticamente como bactérias e humanos destaca a sua conservação ao longo do tempo e processos evolutivos (CHETRI; SHUKLA; TRIPATHI, 2019). No PDB atualmente constam 118 estruturas tridimensionais GAPDH depositadas, sendo estas oriundas de 58 organismos distintos. Deste conjunto, as proteínas com maior porcentagem de identidade com a *CaGAPDH* são: GAPDH de *Kluyveromyces marxianus*, também conhecida como *C. kyfer* (78%) (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2006), GAPDH de *Saccharomyces cerevisiae* (77%) (LIU et al., 2012); e vale ressaltar também as estruturas de GAPDH de *Homo sapiens* isoforma somática (68%) (JENKINS; TANNER, 2006) e isoforma gamética (67%) (CHAIKUAD et al., 2011).

A maioria das GAPDH é composta por quatro monômeros idênticos, cada subunidade com massa molecular de aproximadamente 35 a 50 kDa, algumas formas diméricas e triméricas também já foram relatadas (ISMAIL; PARK, 2005; ASHMARINA; MURONETZ; NAGRADOVA, 1981). Qualquer que seja o estado oligomérico já reportado, cada subunidade contém dois domínios de ligação, um para interação com o NAD⁺ e outro para o substrato G3P (CHETRI; SHUKLA; TRIPATHI, 2019).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Planejar a construção de vetor de expressão para a *CaGAPDH*;
- Obter clones da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) contendo a construção de interesse;
- Estabelecer as condições de expressão e purificação da *CaGAPDH*;
- Obter cristais adequados para coleta de dados de difração de raios X;
- Resolver a estrutura tridimensional (3D);
- Validar a estrutura obtida e comparar com homólogas disponíveis no PDB.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Obtenção do clone contendo o gene da *CaGAPDH*

Primeiramente foi realizado uma pesquisa na literatura para investigar quais organismos patogênicos vêm sendo uma ameaça à saúde pública na atualidade. Em seguida, selecionou-se a sequência primária de aminoácidos da *CaGAPDH* e realizou-se uma busca por meio da ferramenta BLAST disponível no NCBI para ter ciência da inexistência do depósito desta estrutura no PDB.

No passo seguinte, realizou-se um estudo para saber qual plasmídeo seria utilizado para a expressão da *CaGAPDH*, levando-se em consideração: análise de restrição feita através do programa NEBcutter v.2.0; expressão de "his-tag" no N-terminal que permitisse a clivagem deste segmento por trombina. Após a escolha, encomendou-se a síntese da construção (plasmídeo + gene codificante) junto à empresa Synbio Technologies (<https://www.synbio-tech.com/>).

2.3.2 Transformação bacteriana por eletroporação

Nesta etapa foram produzidas bactérias *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetentes seguindo o protocolo descrito por Sambrook e Russel, (2001). A eletroporação foi realizada de acordo com as instruções do eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad Laboratories). Assim, o vetor de interesse, pET-28a(+) contendo o gene que codifica para *CaGAPDH*, e as bactérias eletrocompetentes de *E.coli* BL21(DE3) foram colocados em uma cubeta com 0,1 cm de largura para eletroporação e submetidos a um pulso elétrico no *MicroPulser*, ajustado para 2,5 kV de tensão elétrica. Após o pulso elétrico, as células foram deixadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 1 h em 1 mL de meio SOC, em seguida, foram inoculadas em placas de petri contendo meio LA sólido suplementado com kanamicina 30 µg mL⁻¹ e deixadas a 37 °C por 16 h. Com as colônias crescidas, realizou-se um inóculo em 5 mL de meio LB, suplementado com kanamicina a uma concentração final de 30 µg mL⁻¹, mantido a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 16 h. As células foram armazenadas em 20% de glicerol à temperatura de -86 °C para uso posterior.

2.3.3 Expressão e extração da *CaGAPDH*

Para expressão as bactérias contendo o plasmídeo foram crescidas em um pré-inóculo à 37°C em meio LB com o antibiótico kanamicina (30 µg mL⁻¹) por 16 horas. O pré-inóculo foi diluído 1:100 em meio LB contendo antibiótico kanamicina na mesma concentração. Em seguida, as células foram incubadas à 37 °C, sob agitação (200 rpm) até a cultura atingir densidade óptica (DO) de 0,4 a 0,6 a 600 nm. A expressão da proteína recombinante foi induzida com IPTG na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ e a temperatura ideal para expressão foi determinada mediante experimentos realizados à 20 °C e 37 °C, testes de 4 e 6 horas de incubação sob agitação de 150 rpm. Em seguida, as amostras foram preparadas para avaliação visual em SDS-PAGE 12%, como descrito no Capítulo 1 no item 1.3.2.2.

2.3.4 Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação da *CaGAPDH* foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel, de acordo com o protocolo descrito no Capítulo 1- item 1.3.2.3, da mesma maneira para avaliar a pureza das frações eluídas da coluna item 1.3.2.2.

2.3.5 Quantificação

A quantificação da *CaGAPDH* purificada foi realizada por espectroscopia no visível a 595 nm conforme método descrito por Bradford (1976). O padrão protéico utilizado para as curvas de calibração foi a soro albumina bovina (BSA 0,2 mg mL⁻¹). As curvas de calibração foram feitas com concentrações de BSA variando entre 0,002 e 0,02 mg mL⁻¹. Os ensaios para a dosagem da concentração da proteína recombinante foram realizados em triplicata e, quando necessário, as amostras foram diluídas para que os valores de absorbância obtidos ficassem próximo do ponto médio da curva de calibração.

2.3.6 Cristalização da *CaGAPDH*

Para os ensaios de cristalização, a enzima foi concentrada a 10,0 mg mL⁻¹ por centrifugação à 3000 *g* em dispositivo Vivaspin 6 de corte de membrana de 10 kDa. O método de cristalização utilizado foi a difusão de vapor por gota suspensa (MCPHERSON, 1999). Os ensaios de cristalização foram conduzidos de forma manual em placas com 24 poços na câmara de cristalização da UEPG. Nestes experimentos, misturaram-se 3 µL de solução precipitante com 3 µL de solução da enzima, que foram deixados equilibrar com 500 µL da solução do poço. Os ensaios de cristalização foram mantidos a 18 °C. Foram utilizados os *kits* comerciais de cristalização: Morpheus, JCSG e MIDAS. No total foram testadas 288 condições para cristalização.

2.3.7 Coleta de dados de difração de raios X

Os experimentos de difração de raios X foram realizados na estação PROXIMA-1 do Laboratório de radiação síncrotron (SOLEIL), em comprimento de onda de 0,97856 Å e detector EIGER X 16M, em espaço gentilmente cedido pelas Dra. Beatriz Gomes Guimarães e Dra. Maria Cristina Nonato. O melhor cristal foi coletado com um crioloop e mergulhado em uma solução crioprotetora que consistia de 20% (V/V) de etilenoglicol misturado à solução mãe e, em seguida, foi então resfriado e armazenado em um dewar contendo N₂ líquido.

2.3.8 Processamento, substituição molecular, refinamento e validação da estrutura

A indexação, a integração e o escalonamento das intensidades medidas foram realizados com o pacote *X-ray Detector Software* (XDS) (KABSCH, 2010). Após, a ferramenta xtriage do pacote PHENIX (ADAMS et al., 2011) foi utilizada para a identificação de patologias do cristal. A substituição molecular foi realizada com a estrutura homóloga gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGAPDH), código PDB 4IQ8 (LIU et al., 2012). O modelo foi preparado com o programa Chainsaw (STEIN, 2008) e para encontrar as rotações e translações das moléculas foi utilizado o programa Phaser (McCOY et al., 2007). Para refinamento e modelagem da estrutura, os programas utilizados foram Phenix (ADAMS et al., 2011) e Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004), em que o modelo foi ajustado para a densidade eletrônica com uso preferencial do mapa calculado pelo Método FEM (Feature-Enhanced Map) (AFONINE et al., 2015), mas também com os mapas 2mFo-DFc (MAIN, 1979) e mFo-DFc (READ, 1986). A validação foi realizada com os programas descritos anteriormente no Capítulo 1 - item 1.3.1.2, com exceção da análise dos ângulos phi (φ) e psi (ψ) do gráfico de Ramachandran, neste caso gerado pelo programa Molprobit (CHEN et al., 2010).

2.3.9 Análises e comparações estruturais

2.3.9.1 Topologia

O diagrama de topologia e os valores das áreas de contato entre os monômeros foram obtidos conforme citado no Capítulo 1 - item 1.3.1.3.1.

2.3.9.2 Análises dos contatos com o cofator (NAD⁺) e alinhamento das sequências

A partir da estrutura homóloga de *Homo sapiens*, código PDB 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006), os contatos do cofator NAD⁺ foram estimados pelo programa Ncont, considerando distância máxima de 3,5 Å. Os resíduos correspondentes da CaGAPDH foram presumidos com base no alinhamento sequencial. O alinhamento sequencial de aminoácidos foi realizado com os programas citados no Capítulo 1 - item 1.3.1.3.2. Para este alinhamento, foram selecionadas as sequências das estruturas representativas de cada reino biológico e os critérios de escolha foram quais apresentavam maior porcentagem de identidade, cobertura e

melhor resolução. Além disso, foram incluídas as sequências das estruturas das homólogas humanas e das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

2.3.9.3 Comparações entre monômeros e com estruturas proteicas homólogas

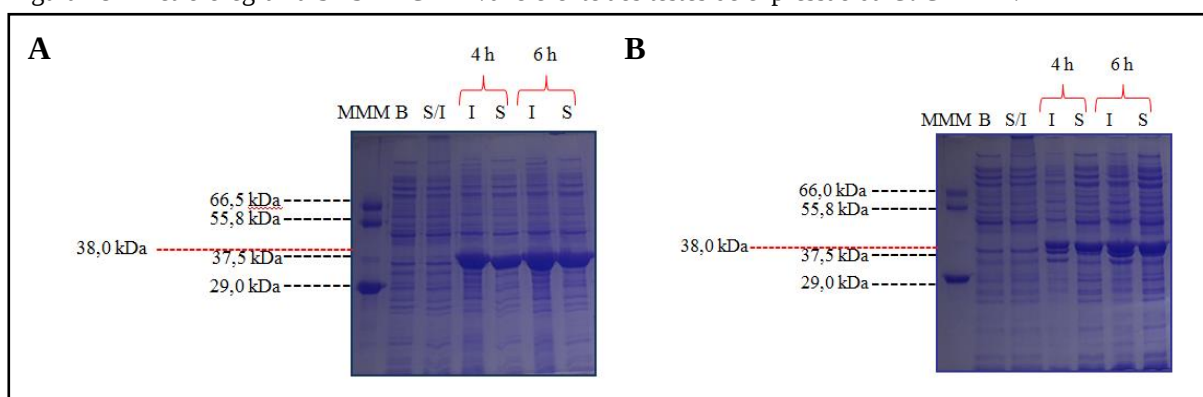
As comparações entre os monômeros da CaGAPDH foram realizadas conforme citado no Capítulo 1 - item 1.3.1.3.3.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Clonagem, expressão e purificação

O gene codificante da CaGAPDH foi inserido em plasmídeo pET-28a(+) com auxílio dos sítios de restrição NdeI e XhoI e possibilitou a expressão da proteína com a "his-tag" no N-terminal para facilitar a purificação. Os produtos dos testes de expressão da proteína heteróloga CaGAPDH foram analisados visualmente por SDS (12%) (Figura 28-A e B). Comparando-se as bandas das proteínas presentes na bactéria *E.coli* BL21 (DE3) não transformada (raia B) com as outras frações (sem indutor IPTG (S/I), insolúvel (I) e solúvel (S)), observa-se que houve a expressão da proteína CaGAPDH. Os resultados apontam que a melhor condição de expressão foi em meio LB com kanamicina $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de IPTG sob agitação de 150 rpm por 6 h a 37°C .

Figura 28 - Eletroforegrama SDS-PAGE 12% referente aos testes de expressão da CaGAPDH.

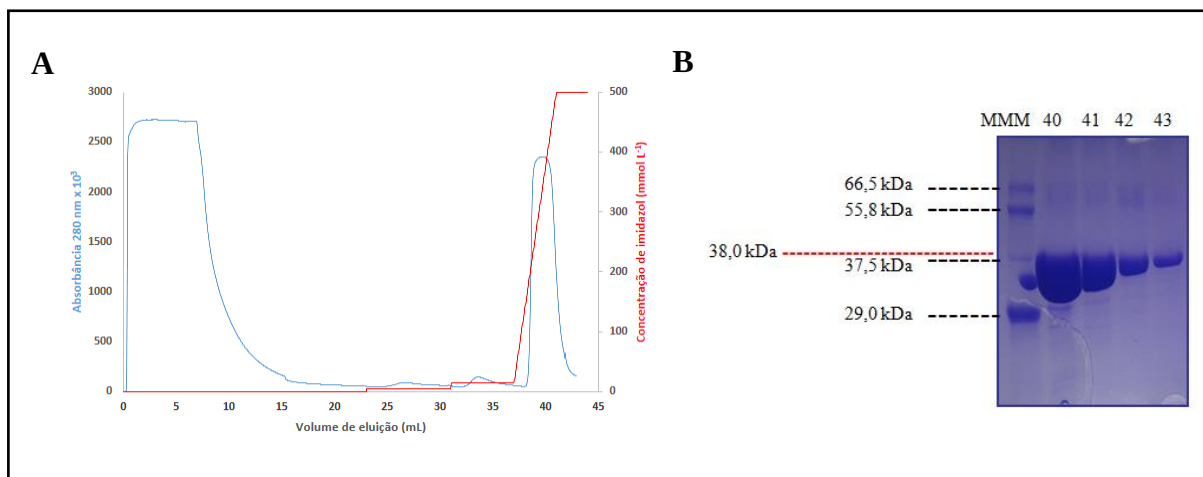


Legenda: as temperaturas testadas foram: A) 37°C e B) 20°C . Raia MMM: Marcador de massa molecular (albumina serina bovina- 66,5 kDa; β -amilase - 55,8 kDa; álcool desidrogenase - 37,5 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa). Raia B: Bactéria não transformada. Raia S/I: Sem IPTG. (Indução à $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ por 4 h). Raia I: Fração insolúvel. Raia S: Fração solúvel. (Indução à $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ por 6 h) Raia I: Fração insolúvel. Raia S: Fração solúvel. A linha em vermelho aponta as bandas das frações insolúveis e solúveis da CaGAPDH (38,0 kDa).

Fonte: O autor.

A fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade em resina contendo níquel imobilizado. O perfil cromatográfico (Figura 29-A) apresentou dois picos bem separados e a análise visual por SDS-PAGE (12%) (Figura 29-B) mostrou que a *CaGAPDH* foi eluída durante o gradiente de imidazol (2º pico) em aproximadamente 375 a 500 mmol L⁻¹ de imidazol.

Figura 29 - Purificação da *CaGAPDH* por cromatografia de afinidade.



Legenda: A) cromatograma das frações eluídas. A linha azul representa a absorvância enquanto que a vermelha destaca o gradiente de imidazol feito com o tampão eluição. B) Eletroforegrama SDS-PAGE (12%) das frações eluídas do 2º pico cromatográfico. Raia MMM: Marcador de massa molecular (albumina serina bovina- 66,5 kDa; β -amilase - 55,8 kDa; álcool desidrogenase - 37,5 kDa; anidrase carbônica - 29,0 kDa). 10 μ L de solução de proteína foram injetadas por raia. A linha em vermelho aponta as bandas da *CaGAPDH* purificada (38,0 kDa).

Fonte: O autor.

Nas frações 40 a 43 (segundo pico do cromatograma) foi observada a presença da proteína *CaGAPDH* purificada (38,0 kDa), evidenciando a eficiência do protocolo de purificação utilizado.

2.4.2 Cristalização, coleta de dados e processamento das imagens

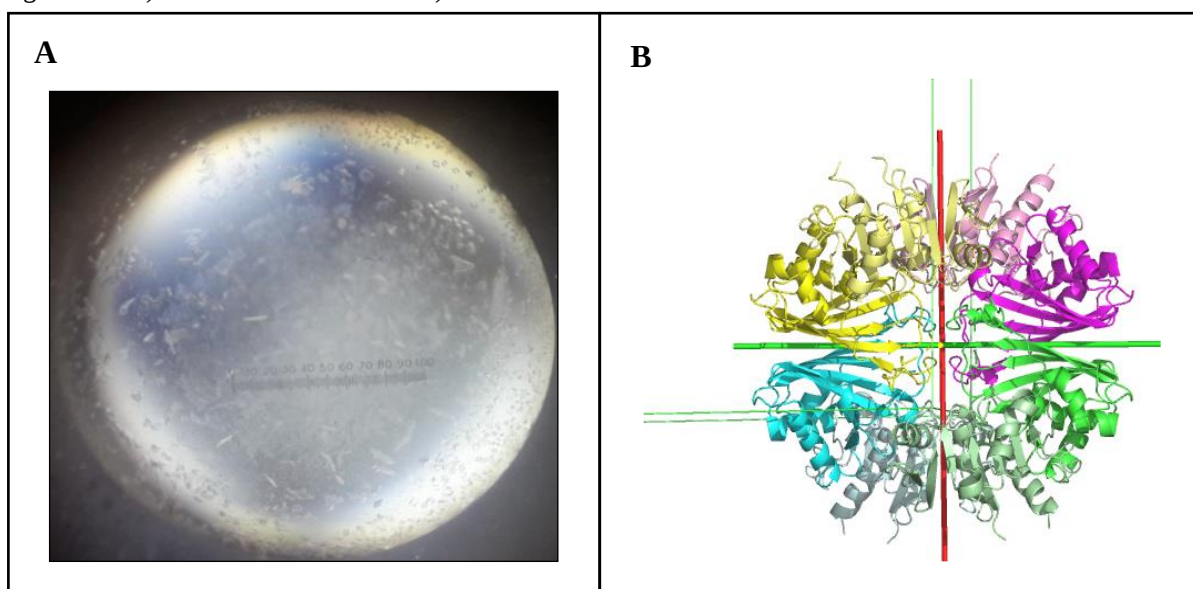
Nos ensaios de cristalização realizados na UEPG, observou-se a formação de pequenos e numerosos cristais em uma condição do *kit* JCSG, após 3 dias da realização do experimento. Estes cristais foram observados na seguinte condição: 20% w/v PEG 6000; 0,1 mmol L⁻¹ de citrato pH= 4,0 e 1,0 mmol L⁻¹ de cloreto de lítio (Figura 30-A).

O processamento das imagens mostrou que o cristal pertence ao grupo de espaço $P2_1$, com as medidas de cela unitária $a= 73,80$, $b= 127,16$ e $c= 86,74$ Å, $\beta= 100,80^\circ$, que correspondem a cristais de estrutura cristalina primitiva monoclinica. Para resolução da

estrutura tridimensional da *CaGAPDH*, foram utilizados os dados difratados a um limite máximo de 2,98 Å de resolução, decidido com base principalmente no índice $CC_{1/2}$ (EVANS; MURSHUDOV, 2013). Outros valores observados foram relação sinal/ruído ($\langle I/\sigma(I) \rangle$), R_{merge} , R_{meas} e completeza.

A análise dos dados indicaram um pico fora da origem em cerca de 20% da altura (em comparação com a origem) na função de Patterson. Esta pseudo-simetria translacional (Figura 30-B) levou a algumas dificuldades durante o refinamento, como pode ser observado pelos índices finais de R_{work} = 29,65% e R_{free} = 35,26%, que, no entanto, tiveram algum benefício da opção de refinamento tncs ativada em phenix.refine. O processamento final, as estatísticas de refinamento e alguns dados de validação são mostrados na Tabela 5.

Figura 30 - A) Cristais da *CaGAPDH*. B) Estrutura tridimensional da *CaGAPDH*.



Legenda: A) cristais obtidos com a utilização do kit JCSG. B) Tetrâmero da *CaGAPDH* na unidade assimétrica com seus 3 eixos ncs ortogonais de ordem 2. O eixo mostrado em verde é quase paralelo à direção do parâmetro *b* da cela unitária (linhas verdes horizontais), o que causa a simetria translacional não cristalográfica. Os outros eixos ncs de ordem 2 são representados em vermelho e amarelo (a imagem é projetada perpendicular a este eixo).

Fonte: O autor.

Tabela 5 - Dados estatísticos do processamento, refinamento e validação.

Dados do processamento	
Parâmetros do cristal	
Resolução (Å)	2,98
Faixa de resolução (Å)	72,52-2,98 (3,12-2,98)
Grupo de espaço	$P2_1$
Dimensão de cela unitária	
a, b, c (Å)	73,80, 127,16, 86,74
β (°)	100,80
Total de reflexões	224752 (28969)
Reflexões únicas	31990 (4113)
Multiplicidade	7,02 (7,04)
Completeza (%)	99,2 (99,4)
$[I/\sigma(I)]$	4,57 (0,95)
Wilson B-factor (Å ²)	59,1
R_{merge} (%)	43,4 (217,1)
R_{meas} (%)	46,9 (234,4)
$CC_{1/2}$ (%)	98,2 (47,1)
Dados do refinamento	
R_{work} (%)	29,65
R_{free} (%)	35,26
Desvio Médio Quadrático	
Comprimento de ligação (Å)	0,002
Ângulo de ligação (°)	0,586
Número de átomos sem H	
Total	9613
Macromoléculas	9409
Solvents	204
Fator de B-médio (Å ²)	
Global	54,7
Macromoléculas	54,9
Solvente	45,6
R_{SCC} global	0,8573
R_{SR} global	0,2026
Gráfico de Ramachandram (%)	
Favoráveis	89,2
Permitidas	10,1
Não permitidas	0,6

Legenda: os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução.

Fonte: O autor.

2.4.3 Substituição molecular

Para se estimar as fases iniciais dos fatores de estrutura, foi utilizado um modelo editado da estrutura de ScGAPDH (77% de identidade de sequência para 98% de cobertura), código PDB 4IQ8 (LIU et al., 2012). A Figura 31 mostra o alinhamento realizado pelo programa T-Coffee e representado no programa Aline.

Figura 31 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima *CaGAPDH* com a proteína disponível no PDB, GAPDH de *Saccharomyces cerevisiae*.

Calb	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	56																																											
	M	A	I	K	I	G	I	N	G	F	G	R	I	G	R	L	V	L	R	V	A	L	G	R	K	D	I	E	V	V	A	V	N	D	P	F	I	A	P	D	Y	A	A	M	F	K	Y	D	S	T	H	G	R	Y	K	
Scer	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	55																																											
	M	.	V	R	V	A	I	N	G	F	G	R	I	G	R	L	V	M	R	I	A	L	S	R	P	N	V	E	V	V	A	L	N	D	P	F	I	T	N	D	Y	A	A	M	F	K	Y	D	S	T	H	G	R	Y	A	
Calb	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	112																																												
	G	E	V	T	A	S	G	D	D	L	V	I	D	G	H	K	I	K	V	F	Q	E	R	D	P	A	N	I	P	W	G	K	S	G	V	D	Y	V	I	E	S	T	G	V	F	T	K	L	E	G	A	Q	K	H	I	D
Scer	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	111																																												
	G	E	V	S	H	D	D	K	H	I	I	V	D	G	K	K	I	A	T	Y	Q	E	R	D	P	A	N	L	P	W	G	S	S	N	V	D	I	A	I	D	S	T	G	V	F	K	E	L	D	T	A	Q	K	H	I	D
Calb	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	168																																												
	A	G	A	K	K	V	I	T	A	P	S	A	D	A	P	M	F	V	G	V	N	E	D	K	Y	T	P	D	L	K	I	I	S	N	A	S	C	T	T	N	C	L	A	P	L	A	K	V	N	D	T	F	G			
Scer	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	167																																												
	A	G	A	K	K	V	I	T	A	P	S	T	A	P	M	F	V	M	G	V	N	E	E	K	Y	T	S	D	L	K	I	V	S	N	A	S	C	T	T	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I	N	D	A	F	G		
Calb	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	224																																												
	I	E	E	G	L	M	T	T	V	H	S	I	T	A	T	Q	K	T	V	D	G	P	S	H	K	D	W	R	G	G	R	T	A	S	G	N	I	I	P	S	S	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V	I	P	E	L	N
Scer	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	223																																												
	I	E	E	G	L	M	T	T	V	H	S	L	T	A	T	Q	K	T	V	D	G	P	S	H	K	D	W	R	G	G	R	T	A	S	G	N	I	I	P	S	S	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V	L	P	E	L	Q
Calb	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280																																												
	G	K	L	T	G	M	S	L	R	V	P	T	T	D	V	S	V	D	L	T	V	R	L	K	K	A	A	S	Y	E	E	I	A	Q	A	I	K	K	A	S	E	G	P	L	K	G	V	L	G	Y	T	E	D	A	V	
Scer	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	279																																												
	G	K	L	T	G	M	A	F	R	V	P	T	T	D	V	S	V	D	L	T	V	K	L	N	K	E	T	T	Y	D	E	I	K	K	V	V	K	A	A	A	E	G	K	L	K	G	V	L	G	Y	T	E	D	A	V	
Calb	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	335																																												
	V	S	T	D	F	L	G	S	S	Y	S	S	I	F	D	E	K	A	G	I	L	L	S	P	T	F	E	V	K	L	I	S	W	Y	D	N	E	Y	G	Y	S	T	R	V	D	L	L	E	H	V	A	K	A	S	A	
Scer	280	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	332																																												
	V	S	S	D	F	L	G	D	S	H	S	S	I	F	D	A	S	A	G	I	Q	L	S	P	K	F	V	K	L	V	S	W	Y	D	N	E	Y	G	Y	S	T	R	V	D	L	V	E	H	V	A	K	A	.	.		

Legenda: o fundo do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

Fonte: O autor.

A unidade assimétrica da *CaGAPDH* contém um tetrâmero de massa molecular 146,623 Da, consequentemente, o coeficiente de Mathews é $2,65 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ (MATHEWS, 1968) e a percentagem em volume do solvente no cristal é igual a 53,7%.

2.4.4 Modelagem e refinamento

Para TLS, foram testados até 20 grupos por cadeia como indicado pelo servidor TLSMD (PAINTER; MERRITT, 2006 - web server for the generation of multi-group TLS models); após testes, decidiu-se não utilizar esta modelagem. Já quanto à NCS, verificou-se que o uso limitado desta pode ser benéfico, mas implicou a análise praticamente resíduo a resíduo dos átomos a serem incluídos nessa restrição.

No modelo final, 153 cadeias laterais não foram modeladas devido à ausência de alta densidade eletrônica. Pela mesma razão, alguns aminoácidos da cadeia principal não foram modelados: (a) monômero A, Ser50-Thr51 e Ala182-Gly189; (b) monômero B, Ser50-Gly53 e Thr181-Pro190; (c) monômero C, Thr183-Pro190 e (d) monômero D, Thr181-Gly189.

A região desordenada que compreende os resíduos entre Thr181-Ser191 também não foi modelada na estrutura homóloga de *Kluyveromyces marxianus* - PDB ID: 2I5P. De acordo com Ferreira da Silva et al. (2006), a desordem nesta região pode estar relacionado a uma Gly que é o resíduo Gly203 na estrutura de *Candida albicans*. Na estrutura de *Saccharomyces*

cerevisiae - PDB ID: 4IQ8 (LIU et al., 2012), ela equivale a Gly202, no entanto, esta região (resíduos correspondentes 181-199) é ordenada, provavelmente pelo fato de que em ScGAPDH apresenta extensos contatos cristalinos.

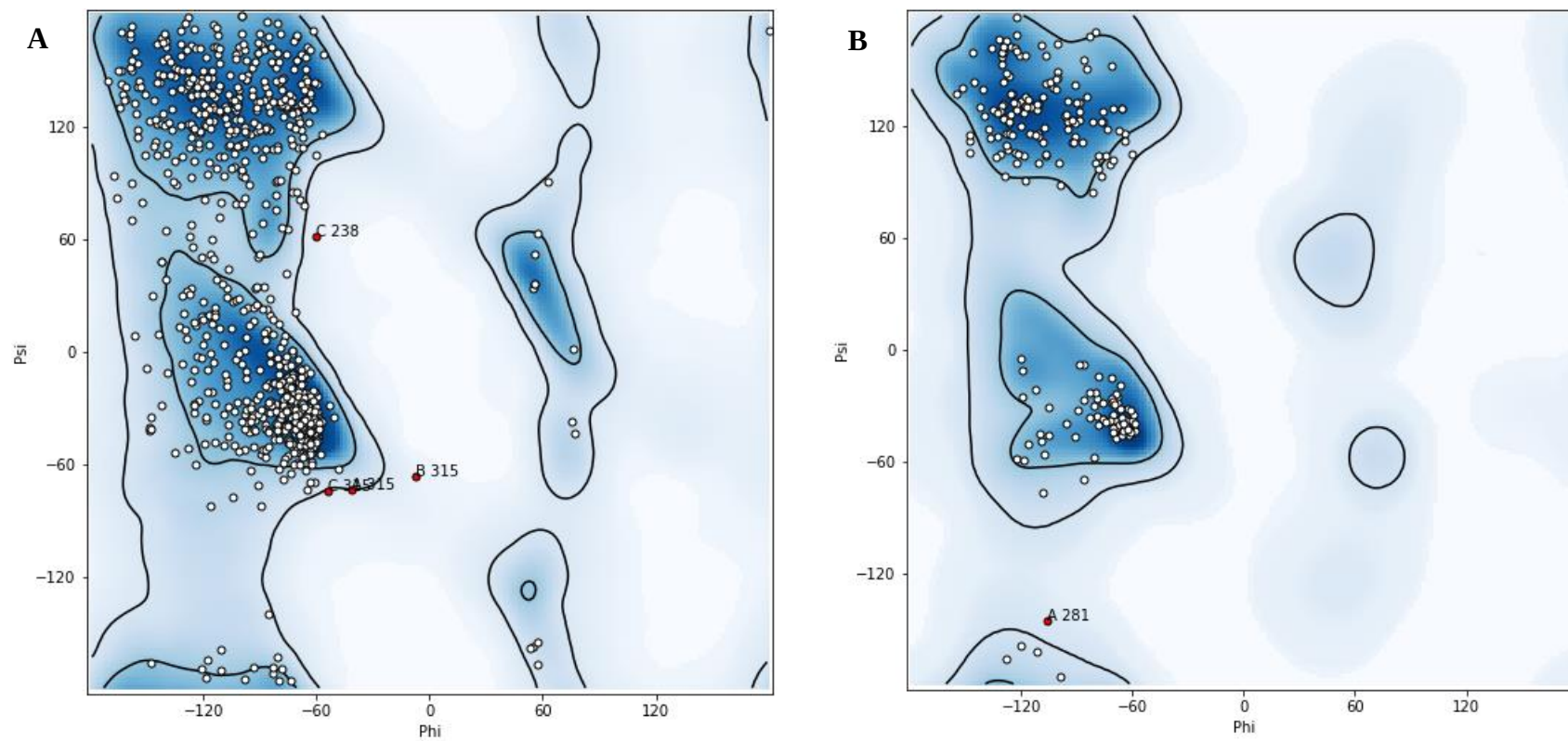
2.4.5 Validação da estrutura

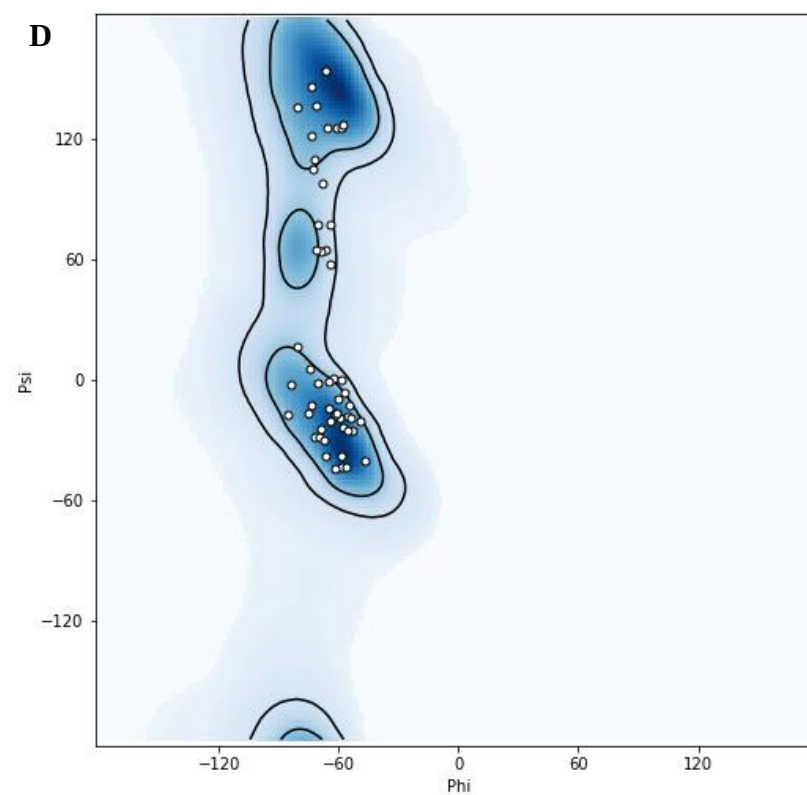
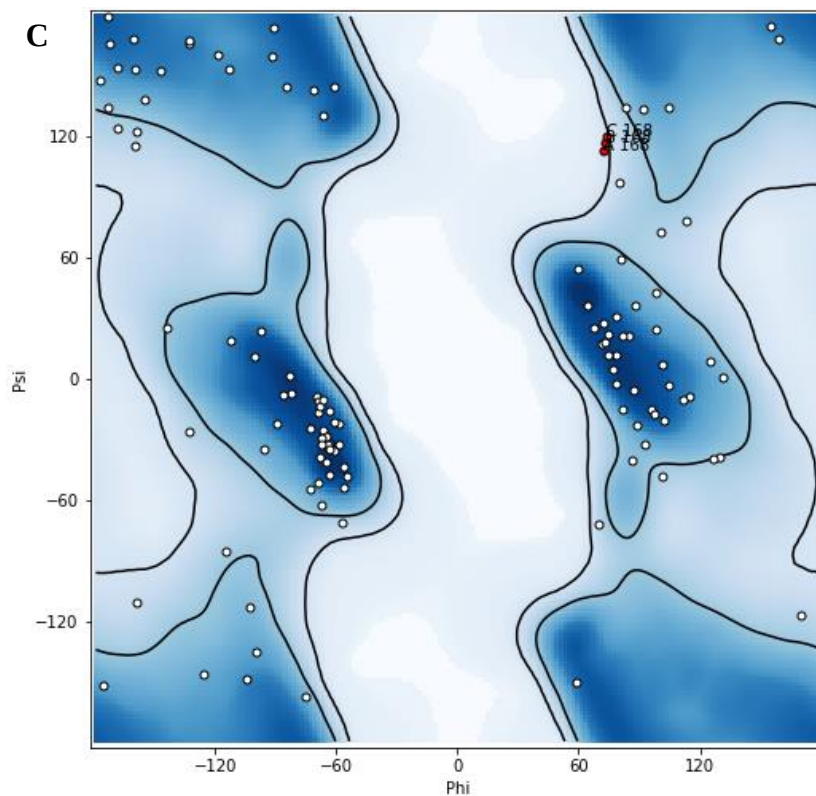
2.4.5.1 Avaliação dos ângulos torcionais da cadeia principal

A qualidade estereoquímica da estrutura no tocante aos ângulos phi (φ) e psi (ψ) pode ser constatada nos gráficos de Ramachandran (Figura 32). Dos 1.299 aminoácidos analisados, 89,2% estão em regiões favoráveis, 10,1% em regiões permitidas e 0,6% em regiões não permitidas.

O resíduo Asn315 em CaGAPDH também é identificado na região não permitida, mas sua conformação modelada concorda com as Asn's correspondentes de *T. cruzi* e *H. sapiens* - isoforma somática, conformação que deve ser assumida devido a seu papel durante a catálise (Figura 32-A). Um Asp238 está nas regiões não permitidas, mas observa-se que nesses monômeros a densidade eletrônica corrobora suas conformações (Figura 33-A), assim como para a Val281 (Figura 32-B).

Na estrutura refinada de CaGAPDH, Gly168 é vista, em alguns monômeros na região não permitida no gráfico de Ramachandran (Figura 32-C). Este resíduo está presente em uma volta e é altamente conservado, suas carbonilas fazem ligações de hidrogênio com os N de cadeias principais de outra volta próxima, dos resíduos Lys249 e Lys250. Por outro lado, suas N's adjacentes também faz ligações de hidrogênio. Na Figura 32-D estão apresentados os resíduos de Pro's modelados na estrutura.

Figura 32 - Gráficos de Ramachandran da enzima *CaGAPDH*.



Legenda: as áreas em azul mais escuro são chamadas de regiões favoráveis; em azul mais claro de regiões permitidas e em branco de regiões não permitidas. (A) gráfico geral; Gly's, Pro's, Val's e Ile's por terem gráficos específicos, não são mostradas; (B) gráfico específico para resíduos de Val's e Ile's. (C) gráfico específico para Gly's. (D) gráfico específico para trans-Pro's. Figuras geradas pelo programa Molprobit. Fonte: O autor.

2.4.5.2 Avaliação da geometria dos rotâmeros

A validação realizada pelo programa Molprobitry permitiu constatar que de um total de 1.246, apenas 32 não estão entre os mais comuns, porém, estão ajustados corretamente na densidade eletrônica, o que confirma a posição em que foram modelados.

2.4.5.3 Coeficiente de correlação no espaço real (RSCC) e valor residual no espaço real (RSR)

Para estimar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, realizaram-se cálculos dos índices RSCC e RSR, mostrados na Tabela 6 (por monômero e global) e nos gráficos (por resíduo) da Figura 33 (A, B, C e D).

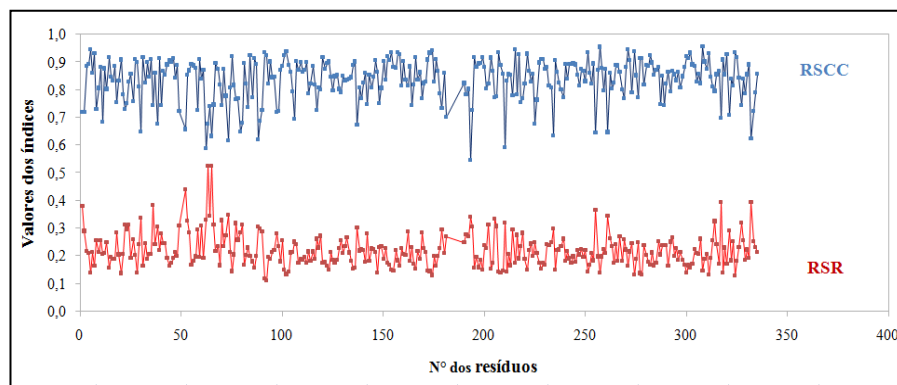
Tabela 6 - Valores globais de RSCC e RSR por monômero.

Monômeros	RSCC	RSR
A	0,8725	0,1948
B	0,8778	0,1912
C	0,8367	0,2123
D	0,8426	0,2107
Todos os monômeros	0,8573	0,2026

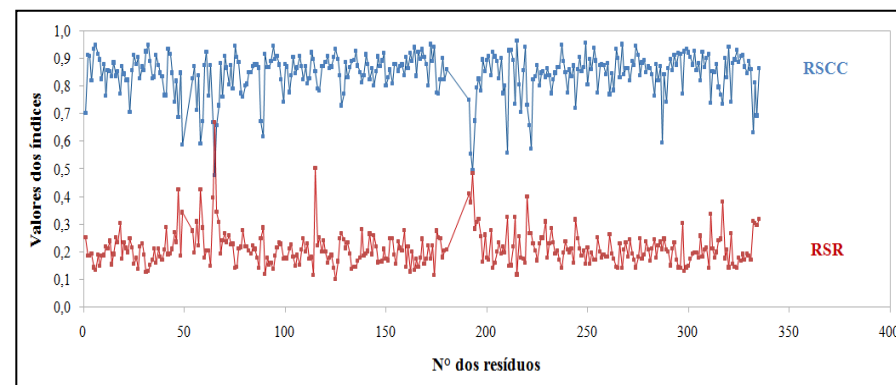
Fonte: O autor.

Figura 33 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.

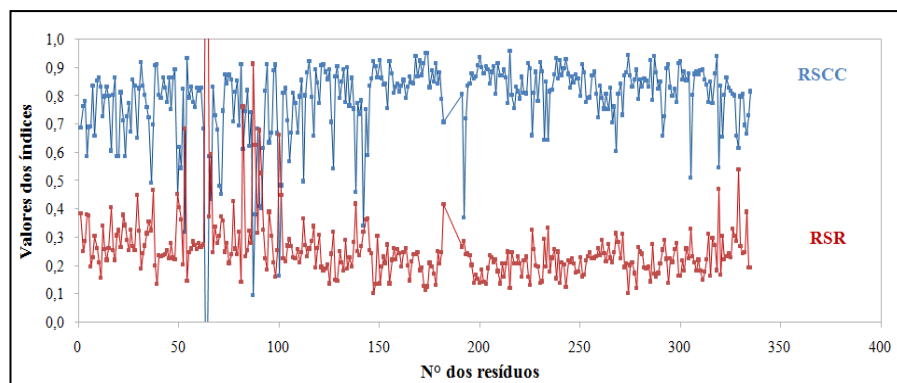
A



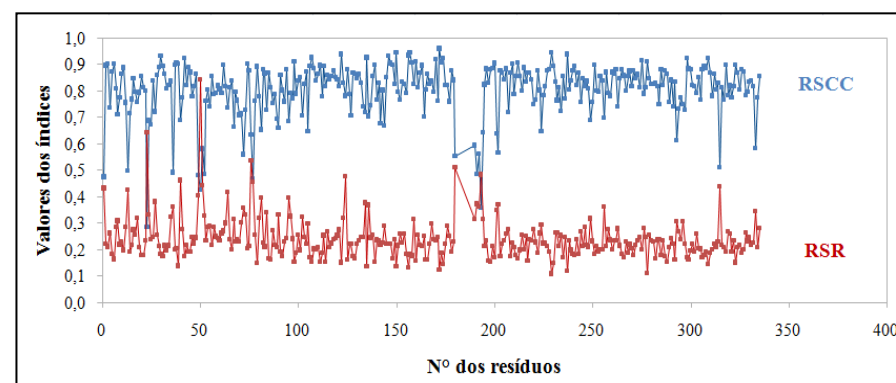
B



C



D



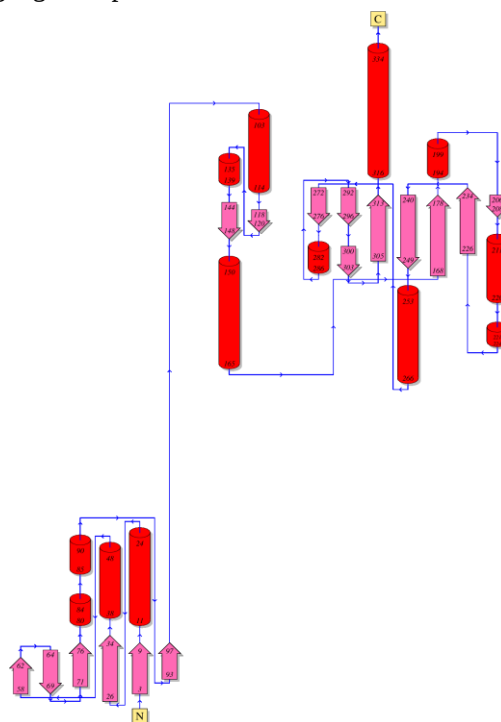
Legenda: (A) monômero A; (B) monômero B; (C) monômero C e (D) monômero D.
Fonte: O autor.

2.4.6 Análises e comparações estruturais

2.4.6.1 Estrutura da *Ca*GAPDH e topologia

A estrutura global do homotetrâmero na unidade assimétrica é representada na Figura 30-B. Cada monômero pode ser dividido em domínios que abrangem os seguintes resíduos: 1-152 e 316-335 (domínio de interação com o NAD^+) e 153-315 (domínio catalítico), de acordo com o alinhamento sequencial com a estrutura da GAPDH de *Homo sapiens* PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006). A Figura 34 mostra um diagrama de topologia do homotetrâmero que explicita os elementos de estrutura secundária e sua conectividade.

Figura 34 - Diagrama de topologia gerado pelo PDBSum.



Legenda: em forma de cilindros vermelhos estão as hélices- α , em setas rosas as fitas- β e em linhas em azuis os loops.

Fonte: O autor.

Os demais resultados indicaram (Tabela 7) que entre os monômeros A:C e B:D há maior área interfacial, maior número de ligações de hidrogênio e pontes salinas, portanto, estes monômeros apresentam maior interação entre si do que com os outros monômeros.

Tabela 7 - Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C, e D) correspondentes ao homotetrâmero.

Monômeros	Nº de resíduos em contato	Áreas de interface/Å ²	Nº de pontes salinas	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de contatos sem ligações
A : B	10 : 7	458 : 479	1	6	50
A : C	39 : 40	1904 : 1909	4	21	205
B : D	40 : 41	1856 : 1860	4	18	199
A : D	9 : 11	747 : 775	1	3	72
B : C	9 : 8	636 : 676	1	5	63
C : D	7 : 6	340 : 341	-	2	20

Legenda: o símbolo ":" representa as inter-relações entre os monômeros, entre os resíduos e áreas de interface.

Fonte: Laskowski (2018).

2.4.6.2 Análises e comparações entre monômeros e domínios da CaGAPDH

A superposição pareada dos quatro monômeros de CaGAPDH não revelou diferenças estruturais significativas, como pode ser observado pelos valores de RMSD entre 0,3802-0,5184 Å (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de RMSD (Å) entre Ca's para os quatro monômeros da CaGAPDH.

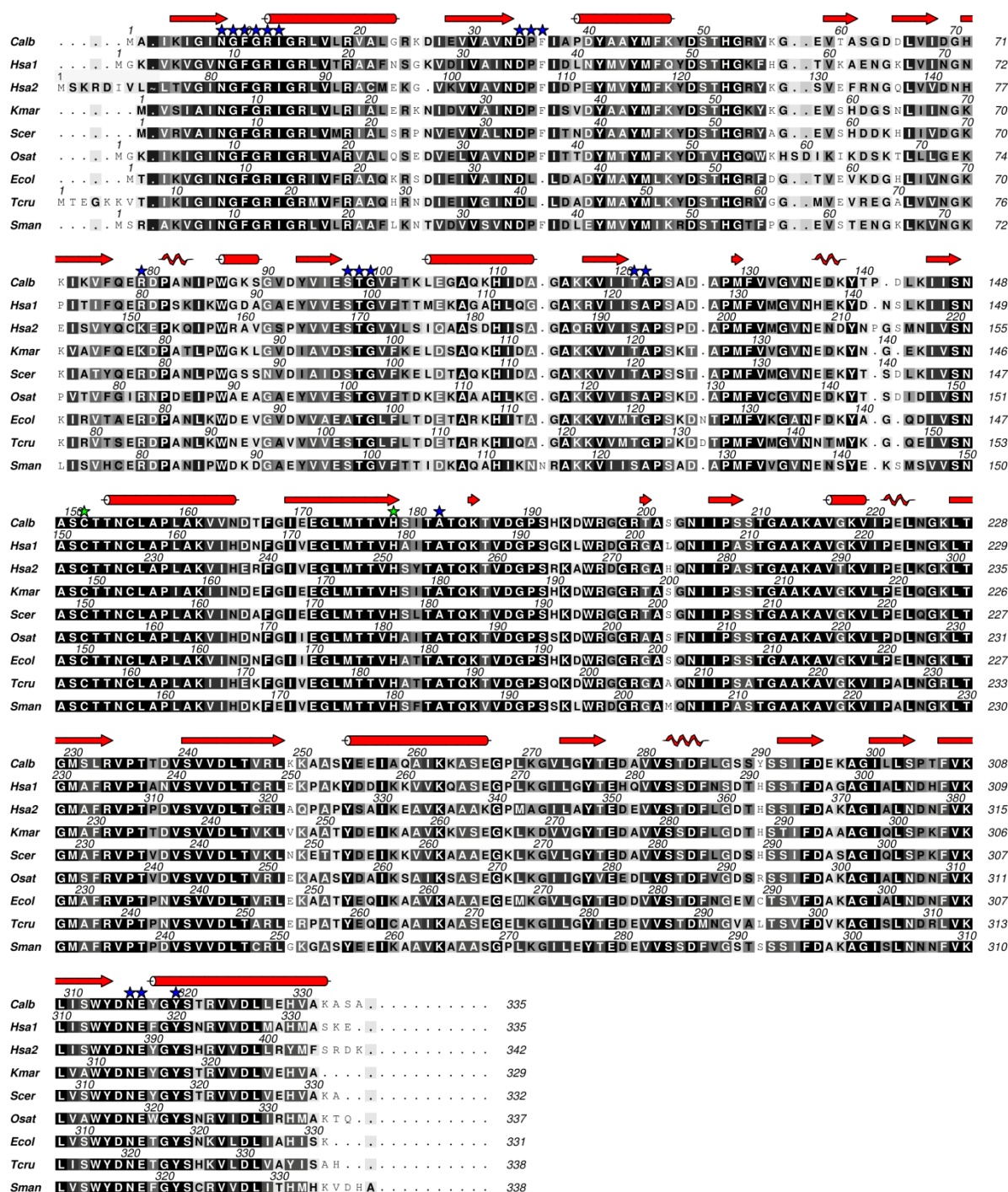
Monômero	D	C	B
A	0,5184	0,4884	0,3802
B	0,5034	0,4811	
C	0,4787		

Fonte: O autor.

2.4.6.3 Alinhamento das sequências e comparação com proteínas homólogas

O alinhamento sequencial foi realizado com as estruturas de GAPDH's dos seguintes organismos: *Homo sapiens*, isoforma somática, *Hsa1* - PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006), *Homo sapiens*, isoforma gamética, *Hsa2* - PDB ID: 3H9E (CHAIKUAD et al., 2011), *Kluyveromyces marxianus*, *Kmar* - PDB ID: 2I5P (FERREIRA DA SILVA et al., 2006), *Saccharomyces cerevisiae*, *Scer* - PDB ID: 4IQ8 (LIU et al., 2012), *Oryza sativa* - *Osat* - PDB ID: 3E5R (TIEN et al., 2008), *Escherichia coli*, *Ecol* - PDB ID: 1S7C (SHIN et al., 2004), *Trypanosoma cruzi*, *Tcr* - PDB ID: 4LSM (EDWARDS; ABENDROTH, 2013), *Schistosoma mansoni*, *Sman* - PDB ID: 7JH0 (BOREIKO; SILVA; IULEK, 2021). A sequência de *Hsa2* tem 68% de identidade com a *Hsa1* e contém uma região extra de proliprolina com 72 resíduos no N-terminal (CHAIKUAD et al., 2011; WELCH et al., 2000). Para melhor visualização do alinhamento, mostrado na Figura 35, a sequência desta foi truncada entre os resíduos 9-75. A Tabela 9 os valores de RMSD da sobreposição entre Ca's.

Figura 35 - Alinhamento da sequência de aminoácido da CaGAPDH com as das homólogas representativas.



Legenda: estrelas azuis indicam os resíduos equivalentes a *Hsa1* que devem fazer contato com o NAD⁺. Estrelas verdes indicam os resíduos catalíticos. Em vermelho estão as fitas- β e as hélices- α na estrutura de CaGAPDH. Os resíduos 9 a 75 de *Hsa2* são representados por um til (~).

Fonte: O autor.

Em geral, todas as estruturas GAPDH são semelhantes, com o RMSD entre seus C α 's entre 0,706 (*S. cerevisiae*) e 1,011 Å (*S. mansoni*), para um mínimo de 305 resíduos sobrepostos.

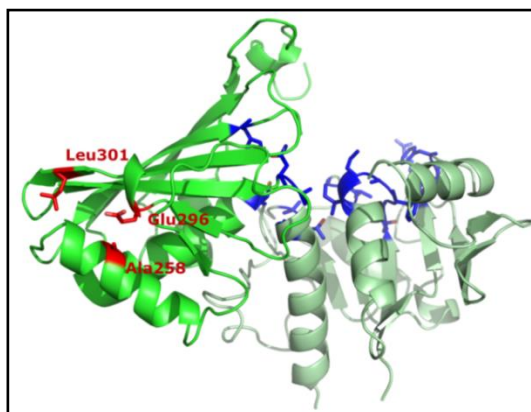
Tabela 9 - Valores de RMSD entre Ca's referentes às sobreposição de CaGAPDH com as estruturas de *Kluyveromyces marxianus* (código PDB 2I5P), *Saccharomyces cerevisiae* (código PDB 4IQ8), *Homo sapiens* 1 (código PDB 1U8F) e *Homo sapiens* 2 (código PDB 3H9E), *Escherichia coli* (código PDB 1S7C) *Oryza sativa* (código PDB 3E5R), *Schistosoma mansoni* (código PDB 7JH0), *Trypanosoma cruzi* (código PDB 4LSM).

Organismo / Código PDB	RMSD (Å) / Nº. de resíduos envolvidos
<i>Kluyveromyces marxianus</i> / 2I5P	0,812 / 305
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 4IQ8	0,706 / 319
<i>Homo sapiens</i> 1 / 1U8F	0,807 / 318
<i>Homo sapiens</i> 2 / 3H9E	0,971 / 320
<i>Escherichia coli</i> / 1S7C	0,898 / 317
<i>Oryza sativa</i> / 3E5R	0,921 / 321
<i>Schistosoma mansoni</i> / 7JH0	1,011 / 316
<i>Trypanosoma cruzi</i> / 4LSM	0,935 / 318

Fonte: O autor.

Dentre as sequências de GAPDH atualmente conhecidas (UNIPROT, 2021), CaGAPDH é uma das duas proteínas a apresentar um Glu em sua posição 296, que fica em frente, em sua estrutura, à sua Ala258, presente apenas em *Plasmodium falciparum*, das 335 sequências de GAPDH disponíveis até o momento (UNIPROT, 2021). Essas duas mutações são destacadas na Figura 36. É importante notar que Glu296 é mais comumente uma Ala (ou, em frequência menor, uma Ser-Gly), enquanto Ala258 é mais comumente uma Lys-Asn. Portanto, hipotetizamos que essas duas mutações conjugadas, hidrofóbica para hidrofílica e vice-versa, podem conservar uma propriedade estrutural dessa região. Finalmente, pode-se observar que Leu301 na CaGAPDH é raro em sua posição, mas observa-se que geralmente há, aí, um resíduo hidrofóbico, então conservado.

Figura 36 - Estrutura do monômero A da CaGAPDH com seus resíduos incomuns indicados.



Legenda: o domínio de ligação NAD⁺ está em um tom mais claro; os resíduos equivalentes que devem entrar em contato com NAD⁺ são destacados em azul. Os resíduos menos conservados (incomuns) na sequência/estrutura de CaGAPDH estão indicados em vermelho.

Fonte: O autor.

2.5 CONCLUSÕES

- Os protocolos de expressão e purificação permitiram que a enzima *CaGAPDH* fosse produzida de forma eficiente, proporcionando quantidade e qualidade suficiente para os testes de cristalização;
- O melhor cristal forneceu conjunto de imagens de difração de raios X que permitiu a determinação da estrutura à resolução de 2,98 Å;
- Simetria translacional não cristalográfica está presente devido a um eixo ncs de ordem 2 quase paralelo ao eixo 2_1 do cristal que coincide com o parâmetro b da cela unitária;
- A comparação da *CaGAPDH* com todas as sequências das proteínas GAPDH disponíveis revelou que existe uma região com duas mutações conjugadas, Glu296 no lugar de (comumente) Ala e Ala258 no lugar de (comumente) Lys/Asn, provavelmente conservando propriedades estruturais;
- A estrutura da *CaGAPDH* foi depositada no PDB (código: 7LRP).

PERSPECTIVAS

A estrutura da TcHAL poderá subsidiar a busca por inibidores para o desenvolvimento de novos quimioterápicos contra doença de Chagas, além disso, promover a busca de atividade inibitória *in vitro*. A partir do desenvolvimento dos protocolos de purificação e cristalização relatados, o trabalho traz informações para ensaios de co-cristalização com os inibidores selecionados *in vitro* e/ou *in silico*. Estes estudos também poderão ser realizados com a estrutura da CaGAPDH, mediante sua comprovação como alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos para o combate da candidíase. Com a estrutura da TcIP obtida por modelagem por homologia, poderão ser realizados estudos de inibição *in silico* mas, em paralelo, de preferênica, deve-se buscar outros métodos cromatográficos para se obtê-la finalmente numa pureza adequada para a realização dos ensaios de cristalização e, então, determinação da estrutura experimental por cristalografia de raios X.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKÓCZIC, G.; CHEN, V. B.; ECHOLS, N.; HEADD, J.; HUNG, L. W.; JAIN, S.; KAPRALD, G. J.; KUNSTLEVE, R. W. G.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R. D.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.; ZWART, P. H. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, p. 94–106, 2011.
- AFONINE, P. A.; MORIARTY, N. W.; MUSTYAKIMOV, M.; SOBOLEV, O. V.; TERWILLIGER, T. C.; TURK, D.; URZHUMTSEV, A.; ADAMS, P. D. FEM: Feature-enhanced map. **Acta Crystallographica Section D**, v. D71, p. 646-666, 2015.
- AFONINE, P. V.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; MORIARTY, N. W.; MUSTYAKIMOV, M.; TERWILLIGER, T. C.; URZHUMTSEV, A.; ZWART, P. H.; ADAMS, P. D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D**, D. 68, n. Pt4, p. 352-367, 2012.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARÃES, A. R. C.; CAPRILES, P. V. S. Z.; DARDENNE, L. E.; DEGRAVE, W. M. A new approach for potential drug target discovery through *in silico* metabolic pathway analysis using *Trypanosoma cruzi* genome information. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1100-1110, 2009.
- AMBROSIO, A. L. B.; FRANCHINI, K. G. Cristalografia macromolecular: a biologia sob a ótica dos raios X. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, 2017.
- ASHMARINA, L. I.; MURONETZ, V. I.; NAGRADOVA, N. K. Immobilized D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Can Exist as a Trimer. **Febs Letters**, v. 128, n. 1, p. 22-26, 1981.
- ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.
- BACON, G. E. **X-Ray and Neutron Diffraction**. 1 ed. Amsterdã: Elsevier, 1966.
- BAEDEKER, M.; SCHULZ, G. E. Structures of two histidine ammonia-lyase modifications and implications for the catalytic mechanism. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 6, p. 1790-1797, 2002.
- BALANÑA-FOUCE, R.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; GARCÍA-ESTRADA, C.; REGUERA, R. M. Trypanosomatids topoisomerase-visited. New structural findings and role in drug discovery. **International Journal for Parasitology**, n. 3, v. 4, p. 326-337, 2014.

BARINOVA, K. V.; ELDAROV, M. A.; KHOMYAKOVA, E. V.; MURONETZ, V. I.; SCHAMALHAUSEN, E. V. Isolation of recombinant human untagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *E. coli* producer strain. **Protein Expression and Purification**, v. 137, p. 1-6, 2017.

BARISÓN, M. J.; DAMASCENO, F.; MANTILLA, B. S.; SILBER, A. M. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, n. 4, v. 48, p. 437-449, 2016.

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

BELLERA, C. L.; BALCAZAR, D. E.; VANRELL, M. C.; CASASSA, A. F.; PALESTRO, P. H.; GAVERNET, L.; GAVERNET, L.; LABRIOLAD, C. A.; ALVEZE, J. G.; BRUNO-BLANCHA, L. E.; ROMANOC, P. S.; Carrillo, C.; TALEVI, A. Computer-guided drug repurposing: identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 338-348, 2015.

BENVENUTI, M.; MANGANI, S. Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1633-1651, 2007.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; MARIN-NETO, J. A.; MAGUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. V.; GILMAN, R. H.; REYES, P. A.; SALVATELLA, R.; MOORE, A. C. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States a systematic review. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, 2007.

BERRY, M. D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for small-molecule disease-modifying therapies in human neurodegenerative disorders. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 29, n. 5, p. 337-245, 2004.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 312, p. 1-19, 2020.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: A WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. Pt5, 2009.

BOIANI, M.; GONZALEZ, M. Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 409-424, 2005.

BOREIKO, S.; SILVA, M.; IULEK, J. Structure determination and analyses of the GAPDH from the parasite *Schistosoma mansoni*, the first one from a platyhelminth. **Biochimie**, v. 184, p. 18-25, 2021.

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

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 609, 2010.

CALABRESE, J. C.; JORDAN, D. B.; BOODHOO, A.; SARIASLANI, S.; VANNELLI, T. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11403-11416, 2004.

CALLAWAY, E. Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology. **Nature**, v. 578, p. 201, 2020.

CANE, D. E.; SOHNG, J. K. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone: kinetic and mechanistic studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 270, n. 1, p. 50-61, 1989.

CANE, D. E.; SOHNG, J. K. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone. 2. Identification of the site of alkylation by tetrahydropentalenolactone. **Biochemistry**, v. 33, n. 21, p. 6524-6530, 1994.

CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS E PREVENÇÃO (CDC), **Drug-Resistant Candida Species**. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/candida-508.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2020.

CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS - CDC. (2016). **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/treatment.html>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

CHAGAS, C. Nova especie morbida do homem, produzida por um Trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*): nota prévia. **Brasil Médico**, v. 23, n. 16, p. 161, 1909.

CHAIKUAD, A.; SHAFQT, N.; AL-MOKHTAR, R.; CAMERON, G.; CLARKE, A. R.; BRADY, L.; OPPERMANN, U.; FRAYNE, J.; YUE, W. W. Structure and kinetic characterization of human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDS. **Biochimie**, v. 435, p. 401-409, 2011.

CHANDER, J.; SINGLA, N.; SIDHU, S. K.; GOMBAR, S. Epidemiology of *Candida* blood stream infections: experience of a tertiary care centre in North India. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 9, p. 670-675, 2013.

CHEN, V. B.; BRYAN, W. A.; HEADD, D. A.; KEEDY, M. A.; IMMORMINO, M. R.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. Pt1, p. 12-21, 2010.

CHEN, X.; ZHANG, Z.; CHEN, Z.; LI, Y.; SU, S.; SUN, S. Potential Antifungal Targets Based on Glucose Metabolism Pathways of *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-12, 2020.

CHETRI, P. B.; SHUKLA, R. TRIPATHI, T. Identification and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Fasciola gigantica*. **Parasitology Research**, v. 118, p. 861-872, 2019.

CHRISTIANSON, C. V.; MONTAVON, T. J.; VAN LANEN, S. G.; SHEN, B.; BRUNER, S. D. The structure of L-tyrosine 2,3-aminomutase from the C-1027 enediyne anti tumor antibiotic biosynthetic pathway. **Biochemistry**, v. 46, n. 24, p. 7205-7214, 2007.

COSTA, T. R. D.; IGNATIOU, A.; ORLOVA, E. V. Structural Analysis of Protein Complexes by Cryo Electron Microscopy. **Bacterial Protein Secretion Systems**, v. 1615, p. 377-413, 2017.

CRISTOVÃO-SILVA, A. C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; LEITE, A. C. L.; PEREIRA, V. R. A.; HERNANDEZ, M. Z. Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. **Frontiers in Pharmacology**, n. 873, v. 10, p. 1-6, 2019.

DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **Newsletter On Protein Crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.

DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray Crystallography**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1999.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007.

ECKHART, L.; SCHMIDT, M.; MILDNER, M.; MLITZ, V.; ABTIN, A.; BALLAUN, C.; FISCHER, H.; MRASS, P.; TSCHACHLER, E. Histidase expression in human epidermal keratinocytes: regulation by differentiation status and all-trans retinoic acid. **Journal of Dermatological Science**, v. 50, n. 3, p. 209-215, 2008.

EDWARDS, T. E.; ABENDROTH, J. **Crystal Structure of a glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi***. 2013. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/4LSM>>. Acesso em: 09 fev. 2020.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.

ENDE, M. V.; WIJNANTS, S.; DIJCK, P. V. Sugar Sensing and Signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 99, p. 1-16, 2019.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENO, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M. Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols Bioinformatics**, v. 54, p. 2.9.1-2.9.31, 2006.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 7, p. 1204–1214, 2013.

FENG, L.; WANNINAYAKE, U.; STROM, S.; GEIGER, J.; WALKER, K. D. Mechanistic, mutational, and structural evaluation of a taxus phenylalanine aminomutase, **Biochemistry**, v. 50, n. 14, p. 2919-2930, 2011.

FREIDA, B.; LEVIN-SPARENBERG, E. WAGNER, J. FOXMAN, B. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Annals of Epidemiology**, v. 27, p. 575-582, 2017.

FERREIRA-DA-SILVA, F.; PEREIRA, P. J. B.; GALES, L.; ROESSLE, M.; SVERGUN, D.; FERREIRA, P. M.; DAMAS, A. M. The crystal and solution structures of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reveal different quaternary structures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33433–33440, 2006.

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS - FVS/AM. (2019). **FVS confirma dez casos de Doença de Chagas em Barreirinha, e um segue em investigação**. Disponível em: <<http://www.saude.am.gov.br/visualizar-noticia.php?id=3917>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

FURATA, T.; TAKAHASHI, H.; SHIBASAKI, H.; KASUYA, Y. Reversible Stepwise Mechanism Involving a Carbanion Intermediate in the Elimination of Ammonia from L-Histidine Catalyzed by Histidine Ammonia-Lyase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 18, p. 12600-12605, 1992.

GIL, M. L.; VILLAMOÈN, E.; MONTEAGUDO, C.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Clinical strains of *Candida albicans* express the surface antigen glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in vitro and in infected tissues. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1999.

GIVOT, I. L.; SMITH, T. A.; ABELES, R. H. Studies on the Mechanism of Action and the Structure of the Electrophilic Center of Histidine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 23, p. 6341-6353, 1969.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-94, 2010.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

HANSON, K. R.; HAVIR, E. A. L-Phenylalanine ammonia-lyase: IV. Evidence that the prosthetic group contains a dehydroalanyl residue and mechanism of action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 141, n. 1, p. 1-17, 1970.

HASAN, S. S.; MILLER, A.; SAPPARAPU, G.; FERNANDEZ, E.; KLOSE, T.; LONG, F.; FOKINE, A.; PORTA, J. C.; JIANG, W.; DIAMOND, M. S.; CROWE JUNIOR, J. E.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nature Communications**, v. 16, n. 8, p. 1-6, 2017.

HEBERLING, M. M.; MASMAN, M. F.; BARTSCH, S.; WYBENGA, G. G.; DIJKSTRA, B. W.; MARRINK, S. J.; JANSSEN. Ironing Out Their Differences: Dissecting the Structural Determinants of a Phenylalanine Aminomutase and Ammonia Lyase. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 4, p. 989-997, 2015.

HUMBERT, L.; CORNU, M.; PROUST-LEMOINE, E.; BAYRY, J.; WEMEAU, J. L.; VANTYGHM, M. C.; SENDID, B. Chronic Mucocutaneous Candidiasis in Autoimmune Polyendocrine Syndrome Type 1. **Frontiers in Immunology**, v. 19, n. 9, p. 1-9, 2018.

IRWIN, J. J.; STERLING, T.; MYSINGER, M. M.; BOLSTAD, E. S.; COLEMAN, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.

ISMAIL, S. A.; PARK, H. W. Structural analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D**, D. 61, p. 1508-1513, 2005.

JENKINS, J. L.; TANNER, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D62, p. 290-301, 2006.

JUN, S.; SATTLER, S. A.; CORTEZ, G. S.; VERMERRIS, W.; SATTLER, S. E.; KANG, C. Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1452-1468, 2018.

JUNG, D. W.; KIM, W. H.; SEO, S.; OH, E.; YIM, S. H.; HA, H. H.; CHANG, Y. T.; WILLIAMS, D. R. Chemical Targeting of GAPDH Moonlighting Function in Cancer Cells Reveals Its Role in Tubulin Regulation. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 11, p. 1533-1545, 2014.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**, D. 66, p. 125-132, 2010.

KABSCH, W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. **Acta Crystallographica Section A**, v. A32, p. 922-923, 1976.

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

KIKHNEY, A. G.; SVERGUN, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. **FEBS Letters**, v. 589, n. 19, p. 2570-2577, 2015.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. xDIMPAN and xDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Crystallographica Section D**, v. 52, n. Pt4, p. 826-828, 1996.

KOBAYASHI-SAKAMOTO, M.; TAMAI, R.; ISOGAI, E.; KIYOURA, Y. Gastrointestinal colonisation and systemic spread of *Candida albicans* in mice treated with antibiotics and prednisolone. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 191-199, 2018.

KRUG, D.; MÜLLER, R. Discovery of additional members of the tyrosine aminomutase enzyme family and the mutational analysis of CmdF. **Chem Bio Chem**, v. 10, n. 4, p. 741-750, 2009.

KYNDT, J. A.; MEYER, T. E.; CUSANOVICH, M. A.; VAN BEEUMEN, J. J. Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. **FEBS Letters**, v. 512, n. 1-3, p. 240-244, 2002.

LAN, J.; GE, J.; YU, J.; SHAN, S.; ZHOU, H.; FAN, S.; ZHANG, Q.; SHI, X.; WANG, Q.; ZHANG, L.; WANG, X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, p. 215-220, 2020.

LANGER, M.; PAULING, A.; RÉTEY, J. The role of Dehydroalanine in catalysis by Histidine Ammonia-Lyase. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 34, p. 1464-1465, 1995.

LASKOWSKI, R. A.; JABŁOŃSKA, J.; PRAVDA, L.; VAŘEKOVA, R. S.; THORNTON, J.M. PDBsum: structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, p. 129-134, 2018.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

LIU, N.; TU, J.; DONG, G. WANG, Y.; SHENG, C. Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p. 5484-5511, 2018.

LIU, Q.; WANG, H.; HUIHUI, L.; TENG, M.; LI, X. Preliminary crystallographic analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallographica Section F**, F.68, p. 978-980, 2012.

LOUIE, G. V.; BOWMAN, M. E.; MOFFITT, M. C.; BAIGA, T. J.; MOORE, B. S.; NOEL, J. P. Structural Determinants and Modulation of Substrate Specificity in Phenylalanine-Tyrosine Ammonia-Lyases. **Chemistry & Biology**, v. 13, n. 12, p. 1327-1338, 2006.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUÑIS, G. A. **Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection**. Capítulo 29. In: Telleira, J., Tibayrenc, M., editors. American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2 ed., Amsterdam: Elsevier, 2017.

MACDONALD, M. J.; D'CUNHA, G. B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 273-282, 2007.

MAIN, P. A theoretical comparison of the β , γ' and $2F_o-F_c$ syntheses. **Acta Crystallografica**, v. A35, p. 779-785, 1979.

MARVELGENT BIOSCIENCES. (2020). **IMAC Resins Selection Guide**. Disponível em: <<https://marvelgent.com/pages/imac-selection-guideline>>. Acesso em: 06 nov. 2020.

MATTHEWS, B. W. Solvent Content of Protein Crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, p. 491-497, 1968.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; VERGARA, L. J. N.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIE, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. **Biochemical Pharmacology**. v. 65, p. 999-1006, 2003.

MAYA, J. D.; CASSELS, B.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 146, p. 601-620, 2007.

MAZU, T. K.; BRICKER, B. A.; FLORES-ROZAS, H.; ABLORDEPPEY, S. Y. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. **Mini-Reviews Medicinal Chemical**, v. 16, p. 555-578, 2016.

MCCARTHY, M. W.; KONTOYIANNIS, D. P.; CORNELLY, O. A.; PERFECT, J. R.; WALSH, T. J.; Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S474–S483, 2017.

MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, p. 658-674, 2007.

MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. 1. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS - MSF. (2018). **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/>>. Acesso em: 06 nov. 2020.

MIKHAYLOVA, E. R.; LAZAREV, V. F.; NIKOTINA, A. D.; MARGULIS, B. A.; GUZHOVA, I. V. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase augments the intercellular transmission and toxicity of polyglutamine aggregates in a cell model of Huntington disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 136, p. 1052-1063, 2016.

MIRANDA, R. R. **Estudos estruturais da enzima Histidina Amônio Liase de *Trypanosoma cruzi***. 74p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

MOFFITT, M. C.; LOUIE, G. V.; BOWMAN, M. E.; PENCE, J.; NOEL, J. P.; MOORE, B. S. Discovery of Two Cyanobacterial Phenylalanine AmmoniaLyases: Kinetic and Structural Characterization. **Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 1004-1012, 2007.

MOHAMED, A. A.; LU, X. L.; MOUNMIN, F. A. Diagnosis and Treatment of Esophageal Candidiasis: Current Updates. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, n. 9, p. 1-6, 2019.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17–30, 2009.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on the reapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

MURONETZ, V. I.; KURAVSKY, M. L.; BARINOVA, K. V.; SCHMALHAUSEN, E. V. Sperm-Specific Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: An Evolutionary Acquisition of Mammals. **Uspekhi Biologicheskoi Khimii**, v. 80, p. 1672–1689, 2015.

NALETOVA, I.; SCHMALHAUSEN, E.; KHARITONOV, A.; KATRUKHA, A.; SASO, L.; CAPRIOLI, A.; MURONETZ, V. Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 2052-2058, 2008.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205-217, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. (2021). **OMS lança novo roteiro 2021-2030 para as Doenças Tropicais Negligenciadas**. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/oms-lanca-novo-roteiro-2021-2030-para-as-doencas-tropicais-negligenciadas/>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. (2019). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 05 fev. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Control of Neglected Tropical Diseases**. (2019). Disponível em: <<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. (2015). **Weekly Epidemiological Record**. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2015/en>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - OPAS (2016). **Neglected Infectious Diseases in the Americas: Success Stories and Innovation to Reach the Neediest**. Disponível em: <<https://reliefweb.int/report/world/neglected-infectious-diseases-americas-success-stories-and-innovation-reach-neediest>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

ORRY, A. J.; ABAGYAN, R. **Homology Modeling: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2012.

O'SULLIVAN, O.; SUHRE, K.; ALBERGEL, C.; HIGGINS, D. G.; NOTREDAME, C. 3DCoffee: combining protein sequences and structures with in multiple sequence alignments. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 2, p. 385-395, 2004.

PAES, L. S.; MANTILLA, B. S.; BARISON, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 20, p. 2074-2099, 2011.

PAINTER, J.; MERRITT, E. A. Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLSmotion. **Acta Crystallographica Section D**, D. 62, p. 439-450, 2006.

PAPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VASQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

PINAZO, M. J.; CAÑAS, E.; ELIZALDE, J. I.; GASCÓN, J.; GIMERO, F.; GOMEZ, J.; GUHL, F.; ORTIZ, V.; POSADA EDE, J.; PUENTE, S.; REZENDE, J.; SALAS, J.; SARAIVA, J.; TORRICO, F.; TORRUS, D.; TREVIÑO, B. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2010.

PLACZEK, L. J. S.; SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D. BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. **Nucleic Acids Research**, v. 47, D542-D549, 2019.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infections Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

READ, R. J. Sigmaa - Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. **Acta Crystallographica Section A**, v. A42, p.140-149, 1986.

RÉTEY, J. Discovery and role of methylidene imidazolone, a highly electrophilic prosthetic group. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1647, p. 179-184, 2003.

RENAULD, J. P. **Structural Biology in Drug Discovery: methods, techniques, and practices**. 1.ed. New Jersey: Wiley, 2020.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3426-3436, 2004.

RODRIGUEZ, C. E.; FUKUTO, J. M.; TAGUCHI, K.; FROINES, J.; CHO, A. K. The interactions of 9,10-phenanthrenequinone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a potential site for toxic actions. **Chemico-Biological Interactions**, v. 155, p. 97-110, 2005.

ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M. F.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon- γ in Mediating Parasitologic Cure. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002.

RÖTHER, D.; POPPE, L.; VIERGUTZ, S.; LANGER, B.; RÉTEY, J. Characterization of the active site of histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*. **European Journal Biochemistry**, v. 268, n. 23, p. 6011-6019, 2001.

RUPP, B. **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. New York: Garland Science, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAN FRANCISCO, J.; BARRIA, I.; GUTIÉRREZ, B.; NEIRA, I.; MUNOZ, C.; SAGUA, H.; ARAYA, J. E.; ANDRADE, J. C.; ZAILBERGER, A.; CATALÁN, A.; REMONSELLEZ, F.; VEGA, J. L.; GONZÁLEZ, J. Decreased cruzi pain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 1, p. 55–61, 2017.

SCARIM, C. B.; JORNADA, D. H.; CHELUCCI, R. C.; DE ALMEIDA, L.; DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824-838, 2018.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA JARAMILLO, A. M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R. H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; SANCHEZ LEON, Z.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; MONJE RUMI, M.; LEVI, J. E.; RAMIREZ, J. D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M. I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A. M.; GONZALEZ, C. I.; ACOSTA VIANA, K.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; TRIANA CHAVEZ, O.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; SOSA ESTANI, S.; DA SILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. e931, 2011.

SCHWEDE, T. F.; RÉTEY, J.; SCHULZ, G. E. Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. **Biochemistry**, v. 38, n. 17, 5355-5361, 1999.

SCRIVER, C. R.; LEVY, H. L. Histidinaemia. Part I: Reconciling retrospective and prospective findings. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 6, n. 2, p. 51-53, 1983.

SEGAL, H. L.; BOYER, P. D. The role of sulfhydryl groups in the activity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 204, p. 265-281, 1953.

SHATSKY, M.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. MultiProt - A Multiple Protein Structural Alignment Algorithm. In: GUIGÓ, R. e GUSFIELD, D. (Ed.). **Algorithms in Bioinformatics**. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 2452, p. 235-250, 2002.

SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein science: a publication of the protein society**, v. 15, n. 11, p. 2507-2524, 2006.

SHIN, D. H.; THOR, J.; YOKOTA, H.; KIM, S. H. **Crystal structure of MES buffer bound form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli***. 2004. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/1S7C>>. Acesso em: 09 fev. 2020.

SIMPSON, A.; MOSS, D.; SLINGSBY, C.; The avian eye lens protein delta-crystallin shows a novel packing arrangement of tetramers in a supramolecular helix. **Structure**, v. 15, n. 4, p. 403-412, 1995.

SIROVER, M. A. Subcellular Dynamics of Multifunctional Protein Regulation: Mechanisms of GAPDH Intracellular Translocation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 7, p. 2193-2200, 2012.

SKARZYNSKI, T.; MOODY, P. C.; WONACOTT, A. J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 193, p. 171-187, 1987.

SMITH, G. R.; HALPERN, Y. S.; MAGASANICK, B. Genetic and Metabolic Control of Enzymes Responsible for Histidine Degradation in *Salmonella typhimurium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 10, p. 3320-3329, 1971.

STEIN, N. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, p. 641-643, 2008.

STROM, S. WANNINAYAKE, U.; RATNAYAKE, N. D.; WALKER, K. D.; GEIGER, J. H. Insights into the Mechanistic Pathway of the *Pantoea agglomerans* Phenylalanine Aminomutase. **Angewandte Chemie International**, v. 51, n. 12, 2898-2902, 2012.

SZARECKA, A.; DOBSON, C. Protein Structure Analysis: Introducing Students to Rational Drug Design. **Protein Structure Analysis**, v. 81, n. 6, p. 423-429, 2019.

TAYLOR, R. G.; LEVY, H. L.; MCINNES, R. R. Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations. **Molecular Biology Medicine**, v. 8, n. 1, p. 101-116, 1991.

TELLES, D. R.; KARKI, N.; MARSHALL, M. W. Oral Fungal Infections: Diagnosis and Management. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 319-349, 2017.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. D480-D489, 2021.

TIEN, Y. C.; LIN, Y. H.; CHANG, S. L.; CHEN, C. J. **Crystal structure and functional Analysis of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Oryza sativa***. 2008. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/3E5R>>. Acesso em: 09 fev. 2020.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; LASSNIGG, A.; PRESTERL, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 199-204, 2012.

TSUCHIYA, K.; TAJIMA, H.; KUWAE, T.; TAKESHIMA, T.; NAKAMO, T.; TANAKA, M.; SUNAGA, K.; FUKUHARA, Y.; NAKASHIMA, K.; OHAMA, E.; MOCHIZUKI, H.; MUZUNO, Y.; KATSUBE, N.; ISHITANI, R. Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 317-326, 2005.

TURRENS, J. F.; WATTS JR, B. P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 125-129, 1996.

TYAGI, R.; ESWARAMOORTHY, S.; BURLEY, S. K.; RAUSHEL, F. M.; SWAMINATHAN, S. A Common Catalytic Mechanism for Proteins of the HslI Family, **Biochemistry**, v. 47, p. 5608-5615, 2008.

TYAGI, R.; KUMARAN, D.; BURLEY, S. K.; SWAMINATHAN, S. X-ray structure of imidazolonepropionase from *Agrobacterium tumefaciens* at 1.87Å resolution. **Proteins**, v. 69, p. 652-658, 2007.

UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* anti bodies from acute to chronic chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 10, n. 6, p. 407-413, 1996.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'ÁVILA REIS, D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, 2000.

WATTS, K. T.; MIJTS, B. N.; LEE, P. C.; MANNING, A. J. Discovery of a Substrate Selectivity Switch in Tyrosine Ammonia-Lyase, a Member of the Aromatic Amino Acid Lyase Family. **Chemistry & Biology**, v. 13, n. 12, p.1317-1326, 2006.

WELCH, J. E.; BROWN, P. L.; O'BRIEN, D. A.; MAGYAR, P. L.; BUNCH, D. O.; MORI, C.; EDDY, E. M. Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 328-338, 2000.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; BURKHARDT, K.; BERMAN, H. M. Validation of Protein Structures for Protein Data Bank, **Methods in Enzymology**, v. 25, n. 12, 1916-1927, 2017.

WIEMAN, H.; TØNDEL, K.; ANDERSSSEN, E.; DRABLØS, F. Homology-Based Modelling of Targets for Rational Drug Design. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 793-804, 2004.

WINN, M. D.; CHARLES, C.; COWTAN, K. D.; DODSON, E. J.; LESLIE, A. G. W. MCCOY, A.; STUART, J.; GARIB, N.; POWELL, H. R.; RANDY, J. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D Biology Crystallography**, v. D4449, n. Pt4, p. 235-242, 2011.

WYATT, P. G.; GILBERT, I. H.; READ, K. D.; FAIRLAMB, A. H. Target Validation: Linking Target and Chemical Properties to Desired Product Profile. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, 2011.

YESILKAYA, A.; AZAP, Ö.; AYDIN, M.; OK, M. A. Epidemiology, species distribution, clinical characteristics and mortality of candidaemia in a tertiary care university hospital in Turkey, 2007-2014. **Mycoses**, v. 60, n. 7, p. 433-439, 2017.

YOKO, K.; AKIHIKO, M.; KIYOFUMI, A. M. C. C.; SATOSHI, S. H. M.; MARIKO, S. Molecular characterization of histidinemia: identification of four missense mutations in the histidase gene. **Human Genetics**, v. 116, n. 5, p. 340-346. 2005.

YU, Y.; LIANG, Y. H.; BROSTROMER, E.; QUAN, J. M.; PANJIKAR, S.; DONG, Y. H.; SU, X. D. A Catalytic Mechanism Revealed by the Crystal Structures of the Imidazolonepropionase from *Bacillus subtilis*. **Human Genetics**, v. 116, n. 5, p. 340-346. 2005. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 36929-36936, 2006.

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355-1373, 2015.

**APÊNDICE A – ETAPAS ENVOLVIDAS EM CATABOLISMO DA HISTIDINA EM
*T. CRUZI***

APÊNDICE A

Etapas envolvidas no catabolismo da L-histidina em *T. cruzi*. As enzimas Histidina Amônio Liase (HAL) e Imidazolona Propionase (IP) estão destacadas em verde.

