

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

SHEILA BOREIKO

ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS UROCANATO HIDRATASE DE
Trypanosoma cruzi, GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Schistosoma*
mansoni E GLICOSE-6-FOSFATO-1-EPIMERASE DE *Naegleria gruberi*

PONTA GROSSA
2020

SHEILA BOREIKO

ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS UROCANATO HIDRATASE DE
Trypanosoma cruzi, GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Schistosoma*
mansoni E GLICOSE-6-FOSFATO-1-EPIMERASE DE *Naegleria gruberi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Curso de Doutorado em Química – Associação
Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, da Universidade
Estadual de Ponta Grossa para a obtenção do título de
Doutor em Química.

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

PONTA GROSSA
2020

B731 Boreiko, Sheila
Estudos estruturais das enzimas Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi*,
Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Schistosoma mansoni* e Glicose-6-
Fosfato-1-Epimerase de *Naegleria gruberi* / Sheila Boreiko. Ponta Grossa, 2020.
113 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. Urocanato hidratase. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Gliceraldeído-3-fosfato
desidrogenase. 4. *Schistosoma mansoni*. I. Iulek, Jorge. II. Silva, Marcio. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 541



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

SHEILA BOREIKO

“Estudos Estruturais das Enzimas Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi*, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Schistosoma mansoni* e Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de *Naegleria gruberi*”

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/Campus Ponta Grossa/PR

Prof. Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio

IFSC/São Carlos/SP

Profa. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri

UTFPR/Campus Francisco Beltrão/PR

Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão

UEPG/PR

Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira

UEPG/PR

Ponta Grossa, 19 de agosto de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Romaiana Picada Pereira, Professor(a)**, em 22/08/2020, às 16:47, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Weigert Galvao, Professor(a)**, em 24/08/2020, às 20:07, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Iulek, Professor(a)**, em 25/08/2020, às 21:34, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **MARCIO SILVA, Usuário Externo**, em 26/08/2020, às 15:20, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.

Documento assinado eletronicamente por **Maria Helene Giovanetti Canteri, Usuário Externo**, em



10/09/2020, às 08:45, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Berteli Ambrosio, Usuário Externo**, em 12/09/2020, às 10:48, 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 **0286839** e o código CRC **92763DB4**.

Dedico aos meus pais, Pedro e Olga, e ao meu esposo Alfonso.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por ter iluminado e me guiado durante esta caminhada, por todas as alegrias, pela saúde e pela força que me concedeu para que eu conseguisse concluir mais esta etapa.

Aos meus pais, pelas orações e por estarem ao meu lado ao longo da minha vida e por entenderem as minhas faltas em momentos considerados importantes por eles.

Ao meu esposo Alfonso, por todo amor, apoio e compreensão.

As minhas sobrinhas Kethlin e Stephani, por me ajudarem em várias situações pessoais durante todo o período do doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Iulek, por ter-me dado a oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa e ter-me ensinado quão importante é a organização e a dedicação para um profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Márcio Silva, pelos inúmeros ensinamentos, incentivo e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques pelos conselhos, discussões e observações desde o período do mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Viviane Paula Martini, pela amizade e disposição para esclarecer as dúvidas.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber e a Raissa Melo, pelo fornecimento das bactérias contendo o gene codificante da enzima TcUH e pela contribuição na elaboração do artigo.

Aos meus amigos Van e Robi por fazerem parte da minha vida.

Às minhas primas Cris e Carol por todo o incentivo e apoio.

Aos meus amigos Deize, Denilson, Jorge, Rodrigo e William pelo apoio e por todos os momentos de alegria e descontração.

Ao meu colega de laboratório Renato, por todos as discussões e ajuda principalmente com a parte computacional.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao programa de Pós Graduação em Química, pela oportunidade de realização deste projeto.

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 estrutural de enzimas participantes de rotas metabólicas de organismos patogênicos ou seus congêneres pode servir de base para o planejamento de inibidores. Neste contexto, o presente trabalho traz as estruturas tridimensionais de três enzimas: Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi*, Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Schistosoma mansoni* e Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de *Naegleria gruberi*. A Urocanato Hidratase participa da via metabólica da L-histidina: foi cristalizada, teve sua estrutura resolvida a 2,16 Å de resolução e foi depositada no PDB sob código 6UEK. Comparações estruturais indicaram diferenças entre as conformações dos monômeros A e C, exploradas para entender mudanças estruturais na catálise; também utilizou-se a estrutura para fazer considerações sobre mutações naturais encontradas nas enzimas humanas correspondentes. A Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase participa da via glicolítica e teve sua estrutura resolvida a 2,51 Å de resolução, que foi depositada no PDB sob código 7JH0. Esta é a única GAPDH que apresenta a sequência NNR (resíduos 114-116), que leva (especialmente a R116) a uma rede de ligações de hidrogênio que possivelmente repercute na flexibilidade dos resíduos para interagir com o anel adenina do NAD⁺, resíduos esses especulados como importantes para o desenho diferencial de inibidores. A Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase, também faz parte da via glicolítica, teve sua estrutura modelada por homologia ante a impossibilidade de se obter cristais de boa qualidade.

Palavras-chave: Urocanato Hidratase. *Trypanosoma cruzi*. Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Structural studies of enzymes that participate in the metabolic pathways of pathogenic organisms or their congeners can serve as a basis for planning inhibitors. In this context, this work unveils the three-dimensional structures of three enzymes: Urocanate Hydratase from *Trypanosoma cruzi*, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Schistosoma mansoni* and Glucose-6-Phosphate-1-Epimerase from *Naegleria gruberi*. Urocanate Hydratase participates in the L-histidine metabolic pathway; it was crystallized and had its structure solved at 2.16 Å resolution, which was deposited in the PDB under code 6UEK. Structural comparisons indicated differences in the conformation of monomers A and C, which were explored to understand structural changes in the catalysis; we also use the structure to make considerations about natural mutations found in the corresponding human enzymes. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase participates in the glycolytic pathway and had its structure solved at 2.51 Å of resolution, which was deposited in the PDB under code 7JH0. This is the only GAPDH that has the NNR sequence (114-116), which leads to (especially R116) a network of hydrogen bonds that possibly reflects on the flexibility of the residues to interact with the NAD⁺ adenine ring, residues that are speculated to be important for the differential design of inhibitors. Glucose-6-Phosphate-1-Epimerase, also part of the glycolytic pathway, had its structure modeled by homology due to the impossibility of obtaining crystals of good quality.

Keywords: Urocanate Hydratase. *Trypanosoma cruzi*. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Dados químicos, bioquímicos e farmacológicos do Benzonidazol. ..	24
Figura 2	– Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	26
Figura 3	– Estrutura tridimensional das proteínas homólogas à <i>TcUH</i> depositadas no PDB.	27
Figura 4	– Cristais obtidos no experimento de cristalização com a enzima <i>TcUH</i> a 9,5 mg mL ⁻¹	32
Figura 5	– Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima <i>TcUH</i> com a proteína mais similar disponível no PDB (<i>PpUH</i>).	35
Figura 6	– Gráfico de Ramachandran da estrutura da <i>TcUH</i>	36
Figura 7	– Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.	38
Figura 8	– Resíduos modelados na densidade eletrônica que não estão entre os rotâmeros mais comuns.	39
Figura 9	– Estrutura tridimensional da <i>TcUH</i>	40
Figura 10	– Diagrama de topologia para a estrutura da <i>TcUH</i>	40
Figura 11	– Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas <i>TcUH</i> , <i>PpUH</i> , <i>GkUH</i> , <i>BsUH</i> e <i>HsUH</i>	42
Figura 12	– Comparação da Met257 (<i>TcUH</i> , verde) com suas correspondentes (<i>PpUH</i> , azul, <i>BsUH</i> , amarelo) nas estruturas homólogas.	43
Figura 13	– Sobreposição dos monômeros da <i>TcUH</i>	44
Figura 14	– Orientações relativas entre domínios.	45
Figura 15	– Sobreposição entre os monômeros A (verde) e C (magenta) da <i>TcUH</i> nos quais os domínios NAD ⁺ estão em cores claras.	47
Figura 16	– Sobreposição do monômero A de <i>TcUH</i> com estruturas as homólogas.	48
Figura 17	– Mutações encontradas <i>HsUH</i> 's e suas posições correspondentes na <i>TcUH</i>	50
Figura 18	– Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	53
Figura 19	– Representação das estruturas químicas das principais drogas usadas para o tratamento da esquistossomose.	55
Figura 20	– Estrutura tridimensional da proteína <i>BmGAPDH</i>	57
Figura 21	– Conversão de Gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-Bisfosfoglicerato.	57
Figura 22	– SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 37 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L ⁻¹ de IPTG para a enzima <i>SmGAPDH</i>	64

Figura 23	– SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 20 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L ⁻¹ de IPTG para a enzima <i>SmGAPDH</i>	64
Figura 24	– SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 20 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L ⁻¹ de IPTG para a enzima <i>SmGAPDH</i>	65
Figura 25	– (A) Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da <i>SmGAPDH</i> por cromatografia de afinidade. (B) Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.	66
Figura 26	– Cristais obtidos nos experimentos de cristalização.	68
Figura 27	– Cristais obtidos nos experimentos de cristalização.	69
Figura 28	– Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima <i>SmGAPDH</i> com a da proteína mais similar disponível no PDB (<i>BmGAPDH</i>). ...	61
Figura 29	– Gráfico de Ramachandran da estrutura da <i>SmGAPDH</i>	62
Figura 30	– Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.	74
Figura 31	– Estrutura tridimensional da <i>SmGAPDH</i>	75
Figura 32	– Densidade eletrônica para os ligantes modelados na estrutura da <i>SmGAPDH</i>	76
Figura 33	– Densidade eletrônica para cisteínas modificadas nos 4 monômeros da <i>SmGAPDH</i>	77
Figura 34	– Diagrama de topologia para a estrutura da <i>SmGAPDH</i>	78
Figura 35	– Alinhamento das sequências de aminoácidos da <i>SmGAPDH</i> com as homólogas representativas.	80
Figura 36	– Conformação dos resíduos 114-116 e ligações de hidrogênio entre Arg116 com Ala83, Ile85 e Ala110 no monômero A.	82
Figura 37	– Ciclo de vida de <i>Naegleria spp.</i>	85
Figura 38	– Interconversão entre α -D-glicose 6-fosfato e β -D-glicose 6-fosfato, catalisada pela Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase.	86
Figura 39	– Estrutura tridimensional das proteínas homólogas à G6P-1E depositadas no PDB. A) <i>ScG6P-1E</i> . B) <i>SeG6P-1E</i>	87
Figura 40	– SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 20 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L ⁻¹ de IPTG para a enzima <i>NgG6P-1E</i>	92
Figura 41	– (A) Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da <i>NgG6P-1E</i> por cromatografia de afinidade. (B) Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.	93
Figura 42	– Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNLS com a utilização do kit JCSG.	94
Figura 43	– Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNBio por meio do refinamento.	95

Figura 44	– Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima <i>NgG6P-1E</i>	97
Figura 45	– A) Estrutura da enzima <i>NgG6P-1E</i> obtida por modelagem por homologia. B) Topologia de <i>NgG6P-1E</i> gerada pelo PDBSum.	97
Figura 46	– Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas <i>ScG6P-1E</i> (código PDB: 2CIR) e <i>StG6P-1E1E</i> (código PDB: 2HTB).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Dados estatísticos do processamento e refinamento. Os valores entre parênteses correspondem à última faixa de resolução.	34
Tabela 2	– Valores de RSCC e RSR por cadeia e global.	37
Tabela 3	– Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C e D) correspondentes aos tetrâmero.	41
Tabela 4	– Valores de RMSD (Å) entre Ca's das estruturas sobrepostas.	44
Tabela 5	– Área da interface e número de interações eletrostáticas entre os domínios (central e NAD ⁺).	45
Tabela 6	– Proteínas homólogas à enzima TcUH com estruturas depositadas no PDB.	48
Tabela 7	– Valores de RMSD entre Ca's referentes às sobreposição das estruturas de UH de <i>Pseudomonas putida</i> (código PDB 1UWK), <i>Geobacillus kaustophilus</i> (código PDB 1X87) e <i>Bacillus subtilis</i> (código PDB 2FKN).	49
Tabela 8	– Condições em que se obtiveram cristais da SmGAPDH.	67
Tabela 9	– Dados estatísticos do processamento e refinamento.	70
Tabela 10	– Valores de RSCC e RSR por cadeia e global.	73
Tabela 11	– Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C e D) correspondentes aos tetrâmero.	78
Tabela 12	– Valores de RMSD (Å) entre Ca's para os quatro monômeros da SmGAPDH.	79
Tabela 13	– Valores de RMSD entre Ca's referentes às sobreposição de SmGAPDH com as estruturas de <i>Brugia malayi</i> (código PDB 4K9D), <i>Homo sapiens</i> 1 (código PDB 1U8F) e <i>Homo sapiens</i> 2 (código PDB 3H9E), <i>Trypanosoma cruzi</i> (código PDB 4LSM), <i>Arabidopsis thaliana</i> (código PDB 4Z0H), <i>Kluyveromyces marxianus</i> (código PDB 2I5P) e <i>Chlamydia trachomatis</i> (código PDB 6OK4).	81
Tabela 14	– Proteínas homólogas à enzima NgG6P-1E, obtidos a partir de alinhamentos feitos com as estruturas depositadas no PDB.	96

LISTA DE SIGLAS

AmB	Anfotericina B
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BmGAPDH	GAPDH de <i>Brugia malayi</i>
BsUH	Urocanato Hidratase de <i>Bacillus subtilis</i>
G6P-1E	Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GkUH	Urocanato Hidratase de <i>Geobacillus kaustophilus</i>
HsUH	Urocanate Hydratase de <i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropil β -d-1-tiogalactopiranósido
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
PpUH	Urocanato Hidratase de <i>Pseudomonas putida</i>
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NgG6P-1E	Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de <i>Naegleria gruberi</i>
PAM	Meningoencefalite Amebiana Primária
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RSCC	Valor coeficiente de correlação no espaço real
RSR	Valor residual no espaço real
RMSD	Desvio Quadrático Médio das Distâncias
ScG6P-1E	Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SeG6P-1E	Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de <i>Salmonella enterica</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SmGAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase <i>Schistosoma mansoni</i>
TcUH	Urocanato Hidratase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
UH	Urocanato Hidratase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVO GERAL.....	21
 CAPÍTULO 1 – UROCANATO HIDRATASE DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcUH).....	 22
1.1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1.1 Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> : Aspectos Gerais.....	22
1.2 ENZIMA UROCANATO HIDRATASE (UH).....	27
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
1.4.1 Procedimentos Experimentais.....	28
1.4.1.1 Clonagem, expressão e purificação.....	28
1.4.1.2 Otimização das condições de cristalização.....	28
1.4.1.3 Coleta de dados.....	28
1.4.2 Procedimentos Computacionais.....	29
1.4.2.1 Determinação de estrutura por difração de raios X.....	29
1.4.2.1.1 <i>Processamento das imagens</i>	29
1.4.2.1.2 <i>Faseamento inicial por substituição molecular</i>	29
1.4.2.1.3 <i>Modelagem e refinamento</i>	29
1.4.2.1.4 <i>Validação do modelo final</i>	30
1.4.2.2 Análises e comparações estruturais.....	30
1.4.2.2.1 <i>Topologia</i>	30
1.4.2.2.2 <i>Comparações entre os monômeros e os domínios da TcUH</i>	30
1.4.2.2.3 <i>Comparações estruturais com proteínas homólogas</i>	30
1.4.2.2.4 <i>Análises dos contatos com os ligantes (NAD⁺ e urocanato) e alinhamento das sequências</i>	31
1.4.2.2.5 <i>Análises da orientação relativa dos domínios</i>	31
1.4.2.2.6 <i>Análises das ligações de hidrogênio e pontes salinas</i>	31
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1.5.1 Procedimentos Experimentais.....	32
1.5.1.1 Expressão e purificação.....	32
1.5.1.2 Otimização das condições de cristalização.....	32

1.5.2	Procedimentos Computacionais.....	33
1.5.2.1	Determinação da estrutura por difração de raios X.....	33
1.5.2.1.1	<i>Processamento das imagens.....</i>	33
1.5.2.1.2	<i>Faseamento inicial por substituição molecular.....</i>	34
1.5.2.1.3	<i>Modelagem e refinamento.....</i>	35
1.5.2.1.4	<i>Validação do modelo final.....</i>	36
1.5.2.2	Análises e comparações estruturais.....	39
1.5.2.2.1	<i>Estrutura da TcUH e topologia.....</i>	39
1.5.2.2.2	<i>Análises dos contatos com os ligantes (NAD⁺ e urocanato) e alinhamento das sequências.....</i>	41
1.5.2.2.3	<i>Análises e comparações entre monômeros de TcUH, domínios e estrutura proteica homóloga.....</i>	43
1.5.2.2.4	<i>Análises da orientação relativa dos domínios.....</i>	44
1.5.2.2.5	<i>Análises das ligações de hidrogênio e pontes salinas.....</i>	45
1.5.2.2.6	<i>Comparações estruturais com proteínas homólogas.....</i>	47
1.5.2.2.7	<i>Mutações da Urocanato Hidratase de Homo sapiens (HsUH) e correlações com a estrutura da TcUH.....</i>	49
1.6	CONCLUSÕES.....	51

CAPÍTULO 2 – GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Schistosoma mansoni* (SmGAPDH).....

2.1	INTRODUÇÃO.....	52
2.1.1	Esquistossomose e o <i>Schistosoma mansoni</i> : Aspectos Gerais.....	52
2.1.2	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH).....	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.3.1	Procedimentos Experimentais.....	59
2.3.1.1	Obtenção dos clones contendo o gene da enzima SmGAPDH.....	59
2.3.1.2	Transformação de bactérias eletrocompetentes por eletroporação.....	59
2.3.1.3	Expressão e extração da SmGAPDH.....	60
2.3.1.4	Purificação por cromatografia de afinidade.....	60
2.3.1.5	Cristalização da SmGAPDH.....	61
2.3.1.6	Coleta de dados.....	61
2.3.2	Procedimentos Computacionais.....	61

2.3.2.1	Determinação da estrutura por difração de raios X.....	61
2.3.2.1.1	<i>Processamento das imagens</i>	61
2.3.2.1.2	<i>Faseamento inicial por substituição molecular</i>	62
2.3.2.1.3	<i>Modelagem e refinamento</i>	62
2.3.2.1.4	<i>Validação</i>	62
2.3.2.2	Análises e comparações estruturais.....	62
2.3.2.2.1	<i>Topologia</i>	62
2.3.2.2.2	<i>Comparações entre os monômeros e domínios da SmGAPDH</i>	62
2.3.2.2.3	<i>Análises dos contatos com o cofator (NAD⁺) e alinhamento das sequências</i>	62
2.3.2.2.4	<i>Comparações estruturais com proteínas homólogas</i>	63
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
2.4.1	Procedimentos Experimentais.....	63
2.4.1.1	<i>Clonagem</i>	63
2.4.1.2	<i>Expressão</i>	63
2.4.1.3	<i>Purificação por cromatografia de afinidade</i>	65
2.4.1.4	<i>Cristalização da SmGAPDH</i>	66
2.4.2	Procedimentos Computacionais.....	69
2.4.2.1	Determinação da estrutura por difração de raios X.....	69
2.4.2.1.1	<i>Coleta de dados e processamento das imagens</i>	69
2.4.2.1.2	<i>Faseamento inicial por substituição molecular</i>	70
2.4.2.1.3	<i>Modelagem e refinamento</i>	71
2.4.2.1.4	<i>Validação do modelo final</i>	71
2.4.2.2	Análises e comparações estruturais.....	75
2.4.2.2.1	<i>Estrutura da SmGAPDH e topologia</i>	75
2.4.2.2.2	<i>Análises e comparações entre monômeros e domínios da SmGAPDH</i>	78
2.4.2.2.3	<i>Alinhamento das sequências e comparação com proteínas homólogas</i>	79
2.5	CONCLUSÕES.....	83
CAPÍTULO 3 – GLICOSE-6-FOSFATO-1-EPIMERASE DE <i>Naegleria gruberi</i> (NgG6P-1E)		84
3.1	INTRODUÇÃO.....	84
3.1.1	<i>Naegleria fowleri e Naegleria gruberi: Aspectos Gerais</i>	84
3.1.2	<i>Enzima Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase (G6P-1E)</i>	86

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	87
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
3.3.1	Procedimentos Experimentais.....	88
3.3.1.1	Obtenção de clones contendo o gene da enzima <i>NgG6P-1E</i>	88
3.3.1.2	Transformação de bactérias eletrocompetentes por eletroporação.....	88
3.3.1.3	Expressão.....	88
3.3.1.4	Purificação por cromatografia de afinidade.....	88
3.3.1.5	Cristalização da <i>NgG6P-1E</i>	89
3.3.1.5.1	<i>Triagem inicial</i>	89
3.3.1.5.2	<i>Refinamento das condições de cristalização</i>	89
3.3.1.6	Coleta de dados.....	90
3.3.2	Procedimentos Computacionais.....	90
3.3.2.1	Modelagem por homologia.....	90
3.3.2.2	Análise do modelo gerado por homologia.....	91
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
3.4.1	Procedimentos Experimentais.....	91
3.4.1.1	Clonagem.....	91
3.4.1.2	Expressão.....	91
3.4.1.3	Purificação por cromatografia de afinidade.....	92
3.4.1.4	Cristalização da <i>NgG6P-1E</i>	93
3.4.1.4.1	<i>Triagem inicial</i>	93
3.4.1.4.2	<i>Refinamento das condições de cristalização</i>	94
3.4.1.5	Coleta de dados.....	95
3.4.2	Procedimentos Computacionais.....	96
3.4.2.1	Modelagem por homologia.....	96
3.4.2.2	Análise do modelo gerado por homologia.....	97
3.5	CONCLUSÕES.....	98
	PERSPECTIVAS.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101
	APÊNDICE A – Etapas envolvidas em catabolismo da histidina em <i>T. cruzi</i>.....	112

INTRODUÇÃO GERAL

As proteínas são as macromoléculas mais versáteis nos sistemas vivos, estão no centro da maioria dos processos biológicos, o que gera a necessidade de entender seu funcionamento para explicar os fundamentos da vida (LIEBSCHNER et al., 2019). Seu enovelamento converte as informações unidimensionais, codificadas a partir de uma sequência de genes, em uma estrutura tridimensional biologicamente ativa (TUINSTRA et al., 2008).

A função de uma proteína depende de sua estrutura, porém, a determinação de estruturas de proteínas tem sido um grande desafio há décadas. A principal técnica usada para este fim é a cristalografia de raios X, a qual permite determinar as posições atômicas, as interações inter e intramoleculares e a estrutura geral de qualquer molécula (AITIPAMULA; VANGALA, 2017).

A cristalografia de proteínas vem crescendo desde que a primeira proteína foi estudada por esta técnica (mioglobina – 6 Å) em 1958 (KENDREW et al., 1958). Por exemplo, nos últimos 10 anos, o número de estruturas determinadas por difração de raios X correspondeu a um aumento de 52% em relação ao da década anterior (BERMAN et al., 2000). Isso pode ser justificado devido à disponibilidade de fontes de raios X síncrotron muito poderosas, bem como à introdução de novos algoritmos e *softwares* sofisticados para a resolução e refinamento da estrutura (WLODAWER et al., 2014).

Quando estruturas de proteínas são determinadas, os modelos macromoleculares revelam a base química da sua função, ajudam a explicar o funcionamento de máquinas moleculares, esclarecem a base molecular da disfunção em doenças e são usadas para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (FÖRSTER; SCHULZE-BRIESE, 2019).

No contexto atual, em que cresce a demanda pelo conhecimento de estruturas proteicas em nível molecular, o presente trabalho compreendeu a elucidação da estrutura tridimensional de duas proteínas com função enzimática: Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi* (TcUH) e Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Schistosoma mansoni* (SmGAPDH). Também foram desenvolvidos protocolo para expressão, purificação, ensaios de cristalização e modelagem por homologia da enzima Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de *Naegleria gruberi* (NgG6P-1E).

Para auxiliar a organização desta tese, ela foi dividida em 3 capítulos, tal que cada um deles compreende uma introdução, objetivos específicos, resultados e discussões e conclusões referentes a cada enzima estudada.

No capítulo 1 é descrito o estudo da Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi*, que compreende a cristalização, a determinação da estrutura tridimensional e análises comparativas, em nível estrutural, com proteínas homólogas.

No capítulo 2 é descrito o estudo da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase *Schistosoma mansoni*, que compreende o desenvolvimento de protocolo de expressão, purificação e cristalização. Também realizou-se a determinação da estrutura tridimensional e análises comparativas com várias GAPDH's de diferentes espécies.

No capítulo 3 é descrito o estudo da Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de *Naegleria gruberi*, que compreende o desenvolvimento de protocolo de expressão, purificação, ensaios de cristalização e modelagem por homologia da estrutura.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar estruturalmente as enzimas *TcUH*, *SmGAPDH* e *NgG6P-1* com vistas a buscas de inibidores diferenciais para prejudicar o metabolismo dos patógenos envolvidos nas doenças de Chagas, Esquistossomose e Meningoencefalite Amebiana Primária, respectivamente.

CAPÍTULO 1 - UROCANATO HIDRATASE DE *Trypanosoma cruzi* (TcUH)

1. 1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*: Aspectos Gerais

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma zoonose endêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina e mais de 10 mil pessoas morrem todos os anos em decorrência de manifestações clínicas da doença de Chagas, e mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença (OWS, 2019). A Tripanossomíase é transmitida por aproximadamente 130 espécies de triatomíneos da família Reduviidae e capazes de infectar mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens (XAVIER et al., 2014).

No território brasileiro há a ocorrência de 68 espécies de triatomíneos, das quais 13 são consideradas com importância epidemiológica: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lutzi*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius robustus*, *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma infestans*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* e *Triatoma vitticeps* (BRASIL, 2019a). A propagação da doença está relacionada às migrações humanas descontroladas, à degradação ambiental, às mudanças climáticas, às altas concentrações populacionais em áreas urbanas e às condições socioeconômicas precárias (DIAS et al., 2016).

Os mecanismos para transmissão da infecção de seres humanos por doença de Chagas podem ser divididos em primários e secundários. Os primários envolvem os vetores biológicos, a transfusão de sangue, a via oral (alimentos contaminados) ou ainda transmissão através da placenta ou do canal do parto. Os secundários estão relacionados com acidentes laboratoriais, manipulação de animais infectados, transplante de órgãos, sexualmente (feridas, espermatozoides ou fluidos menstruais) e infecção induzida criminalmente por inoculação ou por via oral (COURA, 2007).

Atualmente no Brasil, a transmissão oral é a principal forma de contágio da doença de chagas (BRASIL, 2019a). Os surtos mais recentes desta forma de transmissão aconteceram com a ingestão de alimentos *in natura*, como suco bacaba (no Pará e no Maranhão em 2006), caldo de cana (em Santa Catarina em 2005 e na Bahia em 2006) e polpa de açaí (no Pará, 2006 e em 2007 e no Amazonas em 2007) (RUEDA et al., 2014). Em 2017, a transmissão oral

correspondeu 73% (869 casos), seguidos pela transmissão vetorial com 8,9% (105 casos) (BRASIL, 2019a).

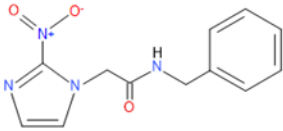
A cardiopatia chagásica possui duas fases clínicas, uma aguda e outra crônica. Os casos agudos geralmente começam com picadas de insetos triatomíneos infectados quando perfuram a pele para sugar sangue e, simultaneamente, depositam fezes contendo tripomastigotas de *T. cruzi*. Esta fase normalmente é assintomática porém alguns poucos sintomas apresentam-se inespecíficos e se assemelham a uma doença viral comum (KRATZ et al., 2018). Febre e cefaleias começam 1 ou 2 semanas após a entrada do parasita na corrente sanguínea (BOSCARDIN et al., 2010), os indivíduos também podem apresentar a conjuntivite unilateral (sinal de Romaña) (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012) e, eventualmente, alguns sintomas como linfadenopatia e esplenomegalia, mialgia, mal-estar, dores musculares, sudorese e hepatoesplenomegalia (BOSCARDIN et al., 2010). No Brasil, entre o período de 2008 a 2017, foram registrados casos confirmados de doença de Chagas aguda na maioria dos estados brasileiros, entretanto, a maior distribuição, aproximadamente 95% dos casos, foi na região Norte (BRASIL, 2019b).

A fase crônica começa no momento em que as manifestações clínicas da fase aguda (se houver) desaparecem. Essa fase há três principais tipos de manifestações: a forma indeterminada, a qual não compromete os órgãos, e as formas cardíacas caracterizada principalmente por insuficiência, arritmias e tromboembolismo e as formas digestivas a qual apresenta inchaço do esôfago e do cólon (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). O tratamento atual depende de dois medicamentos nitroheterocíclicos, introduzidos nos anos 60 e 70, respectivamente: o Nifurtimox, um nitrofurano e o Benzonidazol (Figura 1), um derivado nitroimidazole (KRATZ et al., 2018; URBINA; DOCAMPO, 2003).

No Brasil, o Benzonidazol é o fármaco de escolha disponível, entretanto o Nifurtimox pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância aos pacientes que não respondam ao tratamento com Benzonidazol (BRASIL, 2019a), o qual age via estresse redutivo, envolvendo a interferência na síntese de macromoléculas por meio de ligações covalentes entre intermediários de nitroredução e vários componentes celulares do parasita, tais como DNA, lipídios e proteínas. Também tem mostrado efeitos positivos melhorando a fagocitose, estimulando a resposta imune do hospedeiro por meio da produção de γ -interferon (PAES et al., 2011). Este medicamento é altamente ativo na fase aguda da doença (SCARIM et al., 2018), mas sua eficácia na fase crônica permanece controversa (DUSCHAK; COUTO, 2007; PAES et al., 2011). No entanto, poucos pacientes são diagnosticados precocemente, pois o estágio agudo

se comporta silenciosamente ou porque os pacientes não têm acesso a um diagnóstico e tratamento adequados (SCARIM et al., 2018).

Figura 1 - Dados químicos, bioquímicos e farmacológicos do Benzonidazol.

Fórmula estrutural	
Fórmula molecular	$C_{12}H_{12}N_4O_3$
Peso molecular	260,25 g/mol
Mecanismo de ação	Após ativação pelas nitroredutases trypanosomal os metabolitos formados interagem com várias biomoléculas levando a morte do parasita
Duração do tratamento	60 dias
Indicação	Fase aguda e crônica com algumas limitações
Via de administração	Oral

Fonte: Adaptado de KRATZ et al. (2018).

Desde a descoberta da doença, nenhuma droga demonstrou eficácia para as fases indeterminada e crônica (SCARIM et al., 2018), além disso, os medicamentos atuais apresentam diversos efeitos colaterais, incluindo anorexia, vômitos, dermatia alérgica e polineuropatia periférica (DUSCHAK; COUTO, 2007). Tendo em vista que o Nifurtimox e o Benznidazol estão longe de ter os requisitos para considerá-los ideais como drogas anti-chagásicas, a busca por novos compostos com baixa toxicidade e eficácia aumentada durante as fases indeterminada e crônica, continua relevante (DUSCHAK; COUTO, 2007; FIELD et al., 2017).

O *Trypanosoma cruzi* possui o ciclo de vida dividido em três estágios morfológicos: amastigota, tripomastigota e epimastigota (Figura 2). Cada estágio confere ao parasita a capacidade de sobreviver em diferentes ambientes (BRENER, 1973) uma vez que é capaz de utilizar carboidratos e aminoácidos como fonte de energia (CAZZULO, 1994). Como consequência, algumas vias metabólicas específicas de *T. cruzi*, que envolvem proteínas/enzimas foram avaliadas como alvos terapêuticos, bem como vários medicamentos que interferem nessas vias prometem terapias potenciais promissoras, abrindo a possibilidade

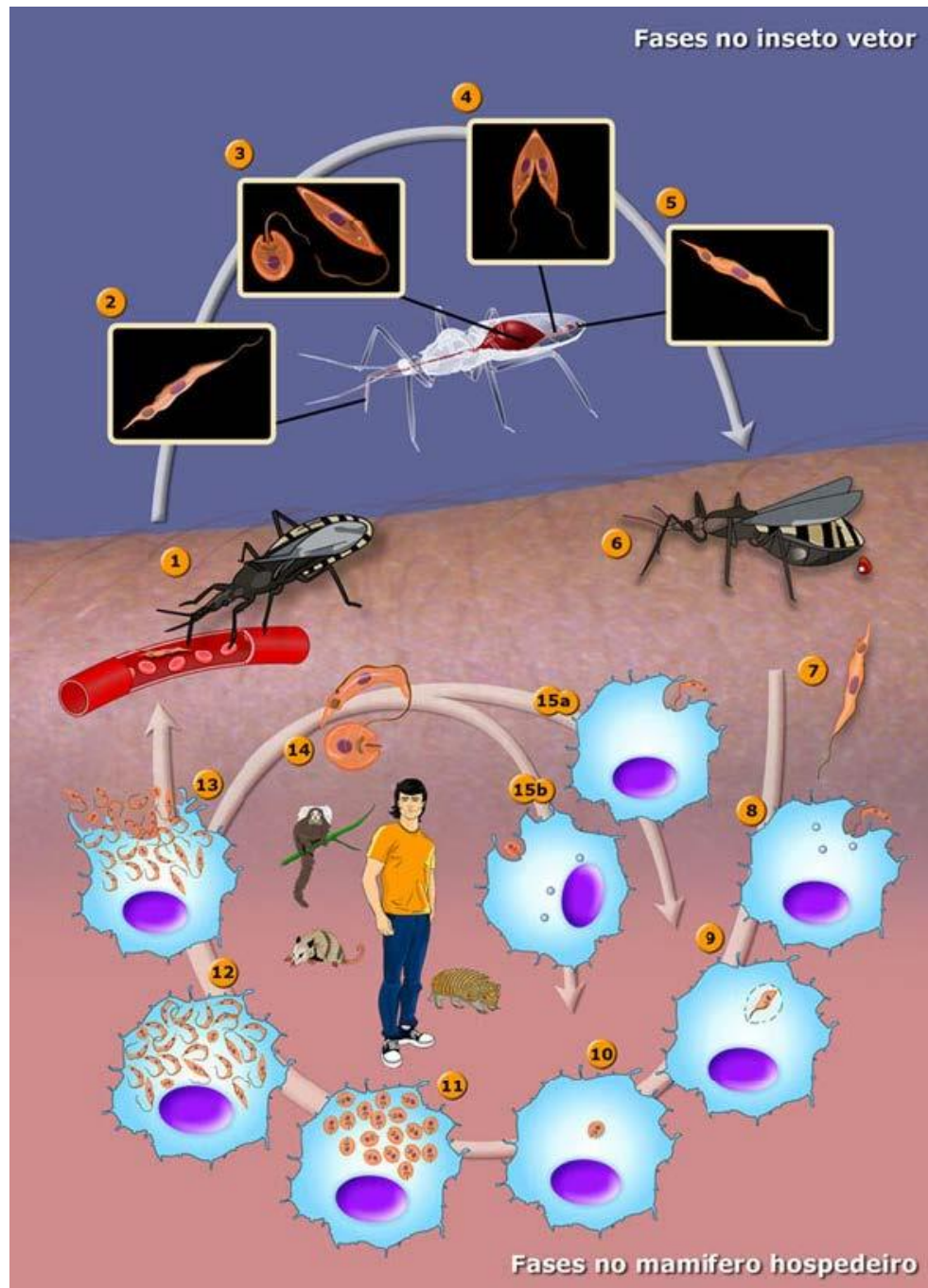
de desenvolvimento de drogas mais específicas e menos tóxicas para o tratamento da doença de Chagas (CHATELAIN, 2017).

A L-histidina pode desempenhar um papel relevante como fornecedora de intermediários do ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), uma vez que opera, em parte, baseado na conversão de histidina em glutamato e, posteriormente, em α -cetoglutarato no estágio de insetos. *T. cruzi*. Esse fato faz da histidina uma fonte de energia eficiente para o parasita. Também foi demonstrado que no parasita a histidina e o urocanato aumentam quando os mesmos atingem a fase estacionária, o que pode estar relacionado à sua resistência ao estresse nutricional (BARISÓN et al., 2017).

A rota metabólica da histidina (APÊNDICE A) compreende as seguintes enzimas: histidina amônia liase (EC 4.3.1.3), urocanato hidratase (EC 4.2.1.49), 4-imidazolona-5-propionase (EC 3.5.2.7) e formimino glutamase (EC 3.5.3.8). O glutamato final pode, por sua vez, ser i) convertido em outros aminoácidos, por exemplo, glutamina (CRISPIM et al., 2018); ii) utilizado como doador de $-NH_2$ em reações de transaminação, tendo como principal aceitador o piruvato, produzindo alanina e o ciclo-ácido tricarboxílico (TCA) α -cetoglutarato intermediário (α -KG); ou iii) desaminado por uma glutamato desidrogenase (GDH) para formar α -KG (BARISÓN et al., 2016; PAES et al., 2011, 2013).

No caso particular deste trabalho, o interesse está na segunda enzima da via, Urocanato Hidratase (UH).

Figura 2 - Ciclo de vida do *T. cruzi*.



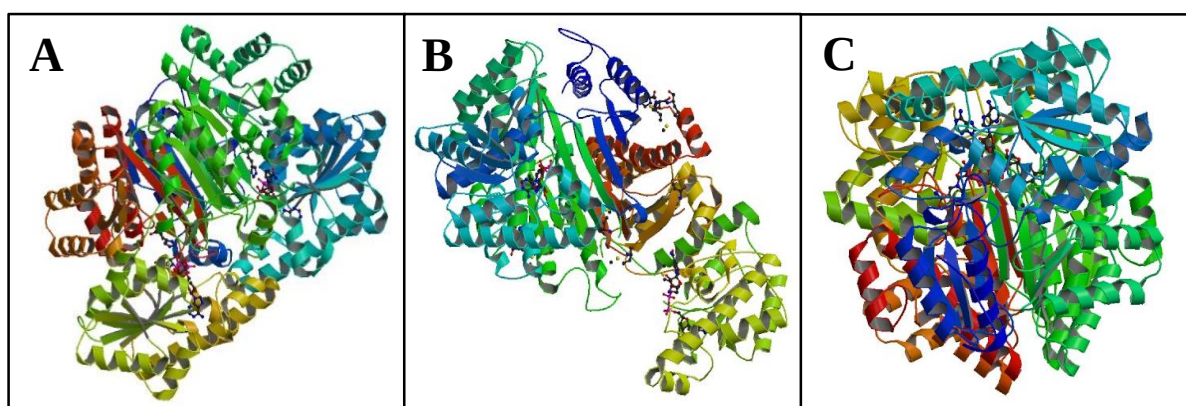
Legenda: 1. O triatomíneo (fêmea ou macho) pica o hospedeiro vertebrado e ingere tripomastigotas circulantes. 2. Tripomastigotas metacíclicos. 3. Tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas e alguns esferomastigotas. 4. Epimastigotas multiplicam-se no intestino médio do inseto vetor. 5. Epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior. 6. O vetor transmite tripomastigotas metacíclicos nas fezes próximo ao local da picada de um hospedeiro mamífero. 7. Tripomastigotas metacíclicas se formam. 8. O tripomastigota metacíclico infecta macrófagos. 9. O tripomastigota metacíclico transforma-se em amastigota. 10. O Amastigota é liberado do vacúolo parasitóforo. 11. Os Amastigotas multiplicam-se no citoplasma. 12. Os Amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas. 13. Tripomastigotas são liberados para fora da célula. 14. Formas Amastigotas e tripomastigotas. 15. (a) Tripomastigotas e (b) amastigotas infectam macrófagos. Na parte central da figura, estão os mais importantes reservatórios envolvidos na manutenção do parasita nos ambientes doméstico e peridoméstico.

Fonte: Adaptado de Teixeira et al. (2012).

1.2 ENZIMA UROCANATO HIDRATASE (UH)

A enzima UH (E.C 4.2.1.49) é encontrada em diferentes organismos e foi isolada a partir de vários procariotos e eucariotos, incluindo humanos. Considerando o repositório virtual, no “*Protein Data Bank*” (PDB), atualmente, existem apenas seis estruturas de UH’s determinadas cristalograficamente: Urocanato Hidratase de *Pseudomonas putida* (PpUH – códigos PDB: 1UWK, 1UWL, 1W1U e 2V7G) (Figura 3-A), Urocanato Hidratase de *Geobacillus kaustophilus* (GkUH – código PDB: 1X87) (Figura 3-B) e Urocanato Hidratase de *Bacillus subtilis* (BsUH – código PDB: 2FKN) (Figura 3-C).

Figura 3 - Estrutura tridimensional das proteínas homólogas à TcUH depositadas no PDB.



Legenda: A) PpUH, B) GkUH e C) BsUH
 Fonte: BERMAN et al. (2000).

Conforme descrito, sob condições fisiológicas, a PpUH é um homodímero e apresenta uma molécula de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) ligado em cada monômero (KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004; KLEPP et al., 1990).

Alguns dos compostos já caracterizados como inibidores ou com ação inibidora significativa em uma enzima UH são: boro-hidreto de potássio, imidazolpropionato, fumarato, fenil-hidrazina, hidroxilamina, semicarbazida, cianeto de potássio (GEORGE; PHILLIPS, 1970), 4-bromocrotonato (LANE et al., 1976), tioglicolato, 2-mercaptoetanol, tioglicolato, ditioeritritol, 3-mercaptopropionato (HUG; O'DONNELL; HUNTER, 1978), íon cúprico (HUG; ROTH, 1973) e ácido 2-fluorourocânico (KLEE et al., 1977).

A elucidação da estrutura tridimensional de TcUH por cristalografia de raios X adiciona informações valiosas *per se*, como a melhor compreensão da enzima em nível molecular. Identificada como alvo molecular terapêutico no Banco de Dados de Alvos da OMS/TDR (Agüero et al., 2008), sua estrutura 3D pode ser usada para buscas *in silico* de

inibidores, que, a longo prazo, indicariam compostos líderes para o desenvolvimento de novos agentes antichagásticos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições de cristalização da *TcUH* obtidos durante o período do mestrado, a fim de obter dados a maior resolução;
- Obter cristais da *TcUH* com qualidade melhorada para resolução da estrutura por difração de raios X;
- Refinar a estrutura proteica a partir de dados de difração de raios X;
- Realizar estudos de comparações estruturais da enzima estudada com proteínas homólogas.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Procedimentos Experimentais

1.4.1.1 Clonagem, expressão e purificação

Os protocolos referentes a estes procedimentos foram obtidos durante o período do mestrado e foram publicados (BOREIKO; SILVA; IULEK, 2016). Desta forma os experimentos para expressão e purificação foram repetidos para obtenção da enzima *TcUH* pura a ser utilizada nos novos ensaios de cristalização.

1.4.1.2 Otimização das condições de cristalização

Para melhorar a qualidade dos cristais obtidos anteriormente (BOREIKO; SILVA; IULEK, 2016), novos ensaios de cristalização foram preparados manualmente usando o método de difusão de vapor em gota suspensa (MCPHERSON, 1999) alterando a concentração da enzima para 8,0, 9,5 e 12,0 mg mL⁻¹, quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As gotas continham 2 µL de solução de reservatório misturada a 2 µL de solução de proteína e foram equilibradas contra 500 µL de solução de reservatório em placas de 24 poços a 18 °C.

1.4.1.3 Coleta de dados

Os dados de difração de raios X foram coletados em comprimento de onda de 1.458 Å na presença de nitrogênio a 100 K, usando uma fonte de radiação síncrotron, na estação W01B-MX2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), com um detector PILATUS 2M (Dectris). O cristal foi coletado com um crioloop e congelado diretamente em uma corrente de nitrogênio a 100 K, uma vez que a condição de cristalização já era crioprotetora.

1.4.2 Procedimentos Computacionais

1.4.2.1 Determinação de estrutura por difração de raios X

1.4.2.1.1 *Processamento das imagens*

Indexação, integração e escalonamento foram realizados com os programas computacionais Xds/Xscale (KABSCH, 2010).

1.4.2.1.2 *Faseamento inicial por substituição molecular*

Realizou-se uma busca com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível no site do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), para identificar qual estrutura depositada no PDB apresentava maior percentagem de identidade e ampla cobertura com a enzima *TcUH*. Após definição da homóloga a ser utilizada, a sequência desta e da *TcUH* foram alinhadas com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000), com o modo *default*. Esse alinhamento foi usado como entrada no programa Chainsaw (STEIN, 2008) com o modo "maxi", o qual mantém o número máximo de átomos comuns aos resíduos da estrutura alvo e do modelo. A determinação das funções de rotação e translação foi realizada pelo programa *Phaser* (MCCOY et al., 2007).

1.4.2.1.3 *Modelagem e refinamento*

Para a modelagem e refinamento, a estrutura da *TcUH* foi inicialmente submetida ao programa *Phenix.autobuild* (AFONINE et al., 2005), o qual utilizou fatores de estrutura e dados de incertezas obtidas do modelo de partida resultante da substituição molecular.

O ajuste manual das posições atômicas foi realizado através de um processo interativo com os programas *Phenix.refine* (AFONINE et al., 2005) e COOT - *Crystallographic Object-Oriented Toolkit* (EMSLEY; COWTAN, 2004). Os mapas utilizados para visualização de densidade eletrônica foram Fourier diferença mFo-DF com σ igual a 3 e densidade eletrônica $2mFo-DFc$ com σ igual a 1.

1.4.2.1.4 Validação do modelo final

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

1.4.2.2 Análises e comparações estruturais

1.4.2.2.1 Topologia

A estrutura foi analisada pela ferramenta PDBSum (LASKOWSKI, 2009) para obtenção do diagrama de topologia e para cálculo das áreas de contato entre os monômeros.

1.4.2.2.2 Comparações entre os monômeros e os domínios da TcUH

As comparações entre os monômeros e os domínios foram realizadas por meio de sobreposição estrutural com a utilização do programa MultiProt (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004). O cálculo do RMSD (do inglês, Root Mean Square Deviation, ou seja, Desvio Quadrático Médio das Distâncias) entre os C α s foi realizado com o programa Lsqkab (KABSCH, 1976).

1.4.2.2.3 Comparações estruturais com proteínas homólogas

Sobreposições estruturais foram realizadas com a utilização do programa MultiProt (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004). As estruturas das proteínas homólogas foram

selecionadas com base em uma busca feita pela ferramenta BLAST, disponível no site do NCBI. Ainda, outros critérios utilizados para seleção foram a resolução e a presença de ligantes.

O cálculo do RMSD entre os C α s das proteínas homólogas foi realizado com o programa Multiprot (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004).

1.4.2.2.4 *Análises dos contatos com os ligantes (NAD⁺ e urocanato) e alinhamento das sequências*

Os contatos com o NAD⁺ foram determinados com o programa Ncont do pacote *Collaborative Computational Project* No.4 (CCP4) através da análise da estrutura da TcUH refinada considerando-se até 3,5 Å de distância para qualquer átomo.

Os contatos com o urocanato na estrutura homóloga (PDB: 1UWK) foram determinados com o programa Ncont até 3,5 Å de distância e, através do alinhamento da sequência desta com a TcUH, os aminoácidos de contato equivalentes foram presumidos.

O alinhamento entre as sequências foi obtido com o programa M-Coffee, o qual utiliza vários algoritmos combinados. Em seguida, faz uso do T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000) para combinar todos esses resultados em um único alinhamento final. A visualização do alinhamento se deu por meio do programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009) sendo as estruturas secundárias estimadas pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). O fundo da Figura do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

1.4.2.2.5 *Análises da orientação relativa dos domínios*

As análises da orientação relativa dos domínios, foi feita com o programa DynDom (*Protein Domain Motion*) (HAYWARD; KITAO; BERENDSEN, 1997) o qual determina o movimento dos domínios, a região e os resíduos que funcionam como dobradiças para os movimentos.

1.4.2.2.6 *Análises das ligações de hidrogênio e pontes salinas*

A análise dos resíduos e átomos que interagem formando ligações de hidrogênio e pontes salinas entre domínios foi feita pelo programa PISA (KRISSINEL; HENRICK, 2007). Com o mesmo, também foram calculados os valores de ΔG (kcal/mol) e a área da superfície

molecular ($\text{\AA}^2$) envolvida na interface.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1 Procedimentos Experimentais

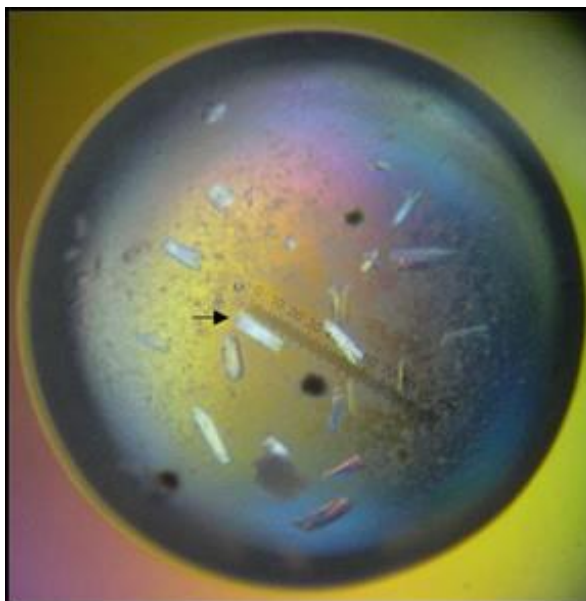
1.5.1.1 Expressão e purificação

Os experimentos de produção da enzima recombinante possibilitaram produzir quantidade suficiente da enzima expressa. A purificação também foi eficiente e permitiu a obtenção da enzima com grau de pureza adequado para os ensaios de cristalização.

1.5.1.2 Otimização das condições de cristalização

Cristais foram obtidos nas três concentrações de proteína testadas (8,0, 9,5 e 12,0 mg mL^{-1}). O cristal que proveu melhor resolução foi obtido em 0,04 mol L^{-1} de di-hidrogenofosfato de potássio, 16,0% (m/V) de polietileno glicol 8000 e 24,0% (V/V) de glicerol, estando a enzima na concentração de 9,5 mg mL^{-1} (Figura 4).

Figura 4 - Cristais obtidos no experimento de cristalização (enzima TcUH a 9,5 mg mL^{-1}).



Legenda: Dimensões aproximadas do cristal apontado: $240 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$.
Fonte: A autora.

1.5.2 Procedimentos Computacionais

1.5.2.1 Determinação da estrutura por difração de raios X

1.5.2.1.1 *Processamento das imagens*

Para o cristal em destaque na Figura 2, foram obtidas no total 720 imagens de difração, que foram então processadas a 2,16 Å de resolução. O processamento indicou que o cristal pertence ao grupo de espaço $P2_1$, com parâmetros de cela $a = 84,61$, $b = 134,79$, $c = 113,40$ Å e $\beta = 93,25^\circ$. A unidade assimétrica contém um tetrâmero de massa molecular 299.080 Da, consequentemente, o coeficiente de Matthews (MATTHEWS, 1968) calculado foi 2,14 Å³/Da, com teor de solvente de 42,43%.

O corte de resolução em 2,16 Å foi realizado com base nos valores dos índices de completeza, relação sinal/ruído $\langle I/\sigma(I) \rangle$, R_{merge} , R_{meas} e, principalmente, $CC_{1/2}$ (EVANS; MURSHUDOV, 2013). A Tabela 1 traz as estatísticas do processamento e refinamento dos dados de difração do cristal obtido.

Tabela 1- Dados estatísticos do processamento e refinamento.

Dados do Processamento	
Parâmetros de cristal	
Grupo de espaço	$P2_1$
Dimensão da cela unitária	
a, b, c (Å)	84,61; 134,79; 113,40
α, β, γ (°)	90; 93,25; 90
Coleta de dados	
Faixa de resolução (Å)	113,22 – 2,16 (2,22-2,16)
Nº. de reflexões únicas	128119 (9011)
R_{merge}	7,3 (73,7)
Média [$I/\sigma(I)$]	15,52 (2,05)
Completeza (%)	94,3 (84,2)
$CC_{1/2}$	99,8 (68,2)
Multiplicidade	5,7 (4,1)
Dados do Refinamento	
R_{work}	0,2181
R_{free}	0,2546
Desvio Médio Quadrático	
Comprimento de ligação (Å)	0,002
Ângulo de ligação (°)	0,544
Fator de B-médio (Å ²)	
Global	51,825
Macromoléculas	52,132
Solvente	42,145
Ligantes	51,819
Estatística de Ramachandram (%)	
Favoráveis	90,1
Adicionalmente permitidas	9,3
Generosamente permitidas	0,3
Não permitidas	0,2

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

Fonte: A autora.

1.5.2.1.2 Faseamento inicial por substituição molecular

A proteína escolhida para produzir o modelo para substituição molecular foi a *PpUH* (36% de identidade de sequencial e 81% de cobertura), código PDB 1UWK (KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004). O alinhamento utilizado como entrada para o programa Chainsaw está representado na Figura 5. Para obter um resultado mais avançado na substituição molecular, a estrutura do modelo foi dividida em 2 domínios, devido aos monômeros da *TcUH* possuírem orientação entre domínios diferente. Assim, a divisão deu-se da seguinte forma: domínio central (resíduos 1-219 e 436-675 do modelo) e domínio do NAD⁺ (resíduos 220-435 do modelo).

Figura 5 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima TcUH com a proteína mais similar disponível no PDB (PpUH).



Legenda: O fundo da figura foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993). A região com barra amarela mostra os aminoácidos do domínio do NAD⁺ e a região com barra turquesa os aminoácidos do domínio central.

Fonte: A autora.

1.5.2.1.3 Modelagem e refinamento

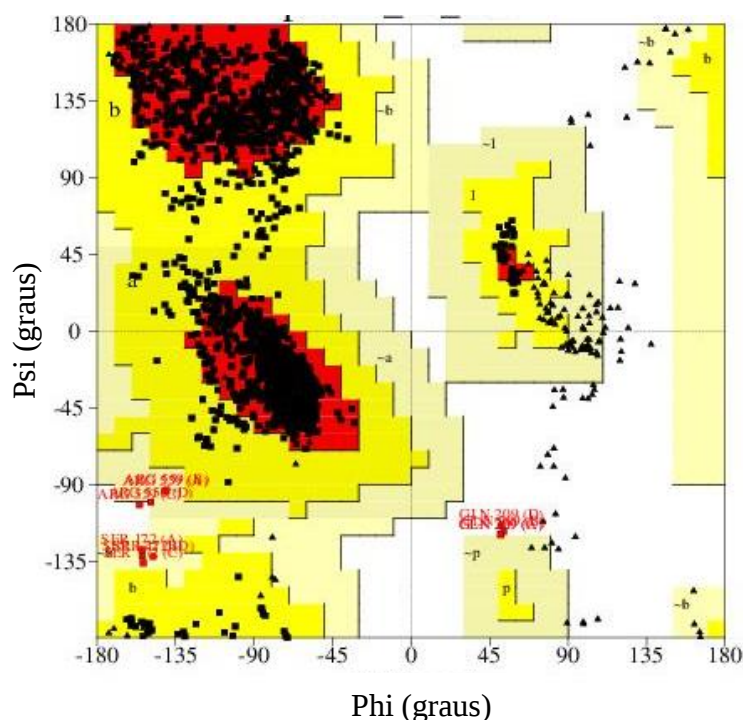
Durante o refinamento/modelagem, verificou-se que a qualidade da densidade eletrônica em várias porções das cadeias A e B é superior à das cadeias C e D. Assim, no modelo final, 376 resíduos tiveram suas cadeias laterais não completamente modeladas devido à ausência de densidade eletrônica convincente. Devido à mesma razão, alguns resíduos de aminoácidos da cadeia principal não foram modelados: (a) monômero A: 1, 2, 422-431, 673-675; (b) monômero B: 1, 2, 24, 418-431, 672-675; (c) monômero C: 1, 2, 332-335, 422-440,

667-675 e (d) monômero D: 1-7, 17-18, 23-30, 293-294, 313-314, 329-337, 394-399, 417-437, 475-488, 498-505, 668-675. Estes totalizaram 15, 22, 34 e 86 resíduos nos monômeros A, B, C e D, respectivamente.

1.5.2.1.4 Validação do modelo final

O resultado do programa Procheck no tocante aos ângulos phi (φ) e psi (ψ) está representado no gráfico de Ramachandran (Figura 6). Dos 3129 aminoácidos analisados, 90,1% estão em regiões mais favoráveis, 9,3% nas regiões adicionalmente permitidas, 0,3% nas regiões generosamente favoráveis e 0,2% em regiões não permitidas (Figura 6).

Figura 6 - Gráfico de Ramachandran da estrutura da TcUH.



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

No tocante às Ser172, Gln209 e Arg559, em destaque nas regiões generosamente favoráveis ou não permitidas do gráfico, em todos os monômeros a densidade eletrônica corrobora as conformações adotadas no modelo. Nas estruturas das proteínas homólogas (*PpUH* - PDB: 1UWK, *GkUH* - PDB: 1X87 e *BsUH* - PDB: 2FKN) estes resíduos estão nas regiões permitidas, exceto *GkUH* (números de resíduo Gln126 e Arg450), os quais não foram

modelados. A Gln209 e a Arg559 fazem contato com NAD^+ e são conservados nas estruturas homólogas, enquanto Ser172 está envolvida em uma rede de ligações de hidrogênio através de $\text{O}\gamma$ a Thr158- $\text{O}\gamma 1$ e Arg178- $\text{N}\eta 2$ e através do N a His156, em uma região próxima ao centro do tetrâmero. Nas estruturas homólogas, os resíduos Thr ocupam essa posição, que, no entanto, apresentam interações semelhantes.

Para se estimar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, realizaram-se cálculos dos índices RSCC e RSR para cada monômero e resíduo, mostrados na Tabela 2 (por cadeia e global) e nos gráficos (por resíduo) das Figuras 7 (A-D).

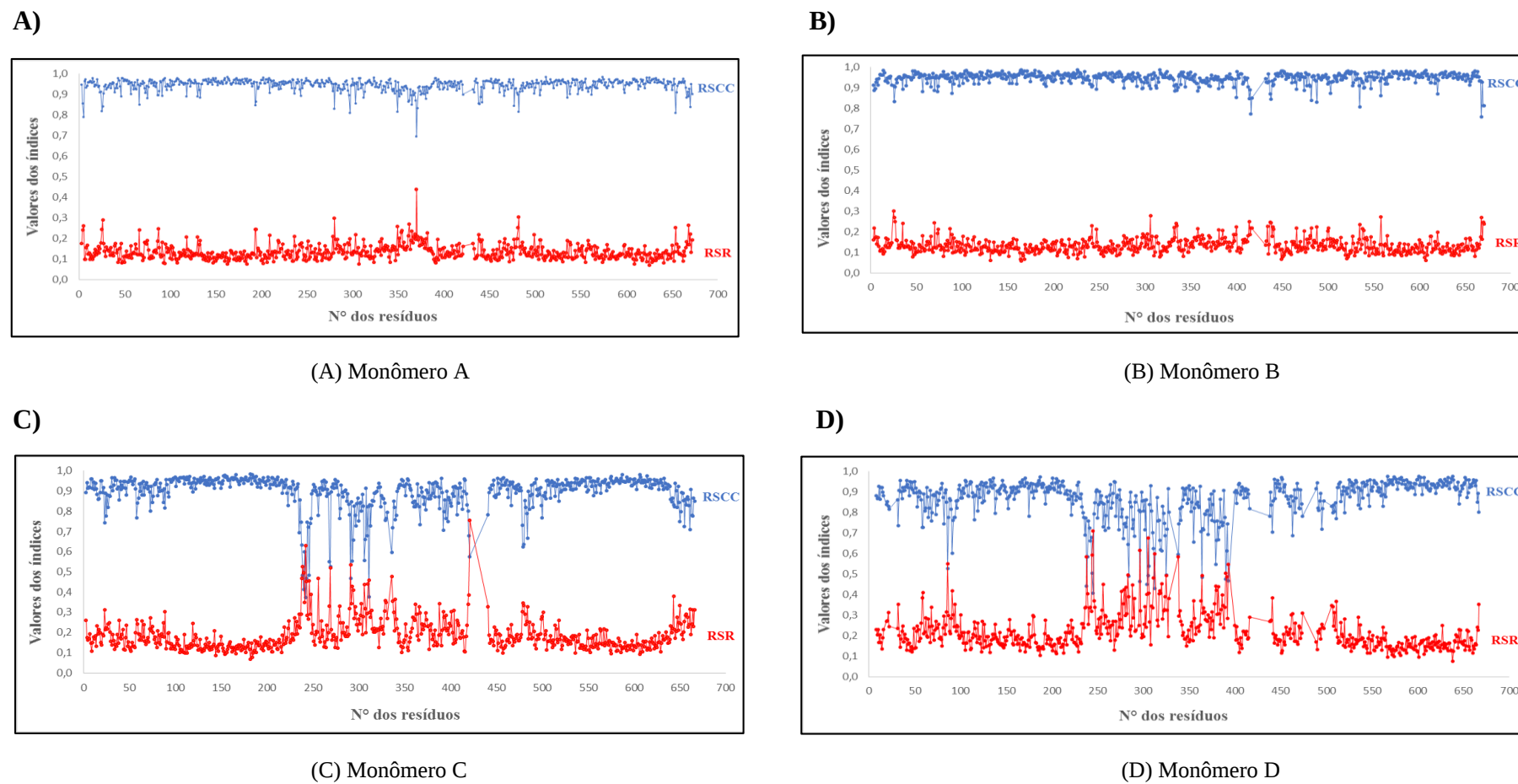
Nas Figuras 8C e 7D (correspondentes aos monômeros C e D), observam-se trechos onde os valores de RSCC apresentam-se relativamente baixos e de RSR relativamente altos; estes trechos pertencem ao domínio do NAD^+ , ou seja, estão compreendidos entre os resíduos 220 e 435.

Tabela 2 - Valores de RSCC e RSR por cadeia e global.

Cadeia	RSCC	RSR
A	0,9450	0,1356
B	0,9466	0,1335
C	0,8966	0,1878
D	0,8670	0,2200
Todas as cadeias	0,9152	0,1677

Fonte: A autora.

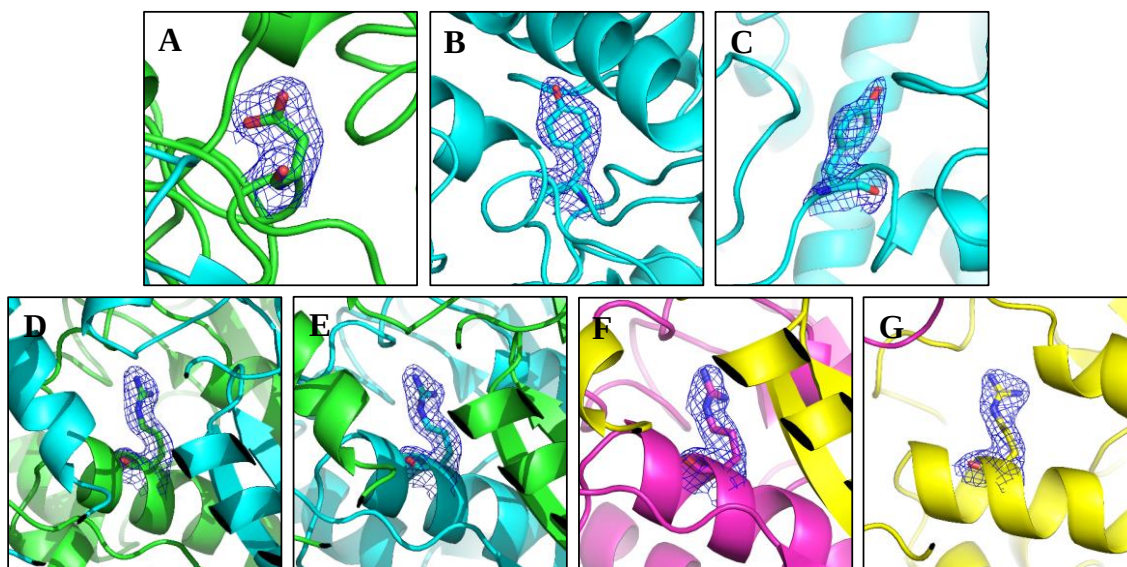
Figura 7 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.



Fonte: A autora

A validação realizada pelo programa Molprobity (CHEN et al., 2010) foi específica para verificação da normalidade dos rotâmeros. Apenas 7 deles não estão entre os mais comuns (Asp563 do monômero A, Tyr404 e Tyr437 do monômero B e Arg636 do monômero A, B C e D), porém, estão perfeitamente ajustados na densidade eletrônica, o que confirma a posição em que foram refinados (Figura 8 - A-G).

Figura 8 - Resíduos modelados na densidade eletrônica que não estão entre os rotâmeros mais comuns.



Legenda: A) Asp563 do monômero A. B) Tyr404 do monômero B. C) Tyr437 do monômero B. D) Arg636 do monômero A. E) Arg636 do monômero B. F) Arg636 do monômero C. G) Arg636 do monômero D. O contorno do mapa de densidade eletrônica em azul corresponde a $2mFo-DFc$ a 1.0σ .

Fonte: A autor.

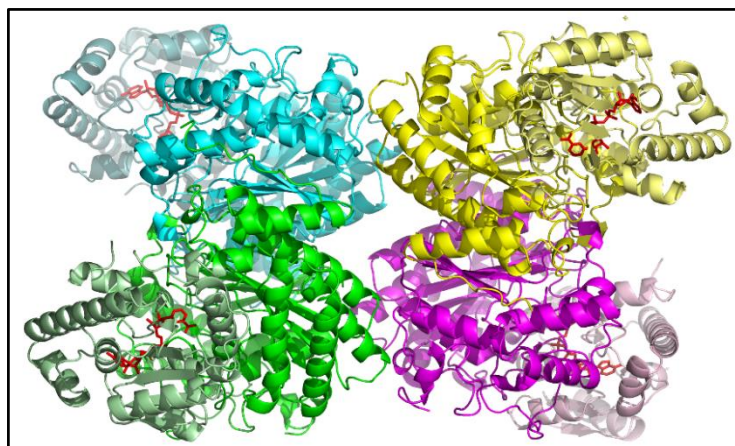
1.5.2.2 Análises e comparações estruturais

1.5.2.2.1 Estrutura da TcUH e topologia

TcUH é uma proteína relativamente grande (675 aminoácidos por monômero) que cristalizou como homotetrâmero na unidade assimétrica (Figura 9). Cada monômero apresenta dois domínios, a saber, um domínio central (resíduos 1–224 e 443–675 para *TcUH*, de acordo com os resultados do DynDom), que forma as interfaces entre os protômeros e a sequência inserida no domínio de ligação ao NAD^+ (resíduos 225–442 para *TcUH*, de acordo com os resultados do DynDom). Na estrutura *TcUH*, existem quatro moléculas de NAD^+ , uma por monômero. No entanto, o NAD^+ não foi adicionado às gotas de cristalização e sua presença na estrutura *TcUH* corrobora com relatos anteriores de que o mesmo deve estar presente durante o enovelamento da proteína (LENZ; RÉTEY, 1993). Sabe-se que o NAD^+ atua como um eletrófilo

para a UH (RÉTEY, 1994).

Figura 9 - Estrutura tridimensional da TcUH.

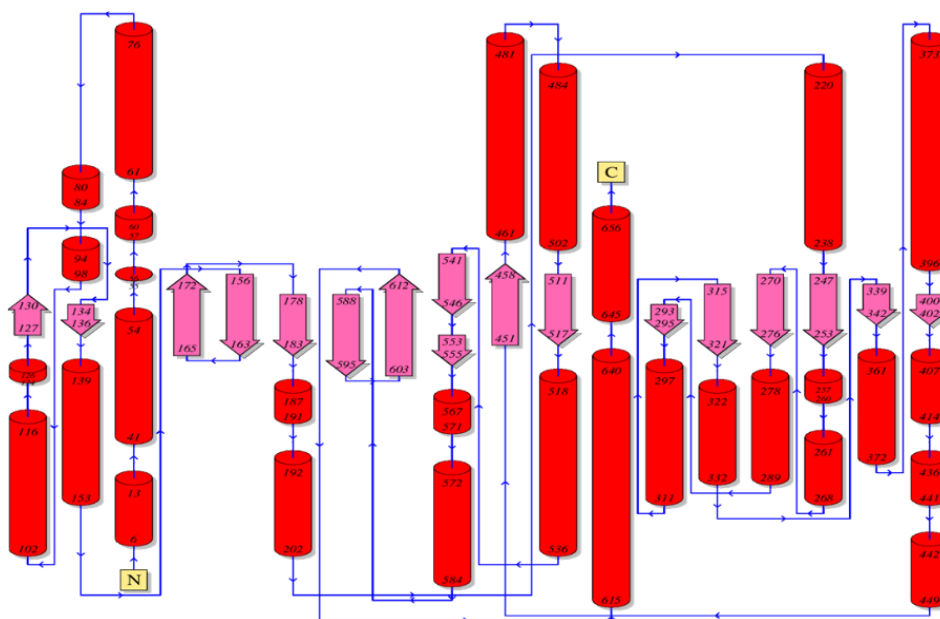


Legenda: Monômero A em verde, monômero B em ciano, monômero C em magenta e monômero D em amarelo, domínio NAD⁺ em tom mais claro e moléculas NAD⁺ em bastão vermelho. Esta e outras figuras de estrutura foram preparadas usando o programa PyMOL (DeLano, 2002).

Fonte: A autora.

A Figura 10 mostra o diagrama de topologia que representa os elementos de estrutura secundária, produzido pela ferramenta PDBsum (LASKWOSKI, 2001) para um dos monômeros (B).

Figura 10 - Diagrama de topologia para a estrutura da TcUH.



Legenda: Os cilindros vermelhos representam as hélices- α , as setas rosas as fitas- β e as linhas azuis os *loops*.
Figura gerada por meio da ferramenta PDBsum.

Fonte: A autora.

Os demais resultados obtidos pelo PDBsum (Tabela 3) indicaram que entre os monômeros A:B e C:D há maior área interfacial e maior número de ligações de hidrogênio; portanto, estes monômeros apresentam maior interação entre si do que com os demais monômeros. Este fato também pode ser considerado um indicativo de que a enzima é um homodímero em condições fisiológicas, assim como a enzima *PpUH* (KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004).

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

Monômeros	Nº de resíduos na interface	Área da Interface (Å ²)	Nº de pontes salinas	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de contatos sem ligações
A : B	87 : 84	3818 : 3814	4	52	596
A : C	9 : 9	455 : 427	1	1	44
B : C	1 : 1	135 : 139	-	-	1
B : D	10 : 10	422 : 445	1	1	45
C : D	77 : 80	3478 : 3496	2	50	515

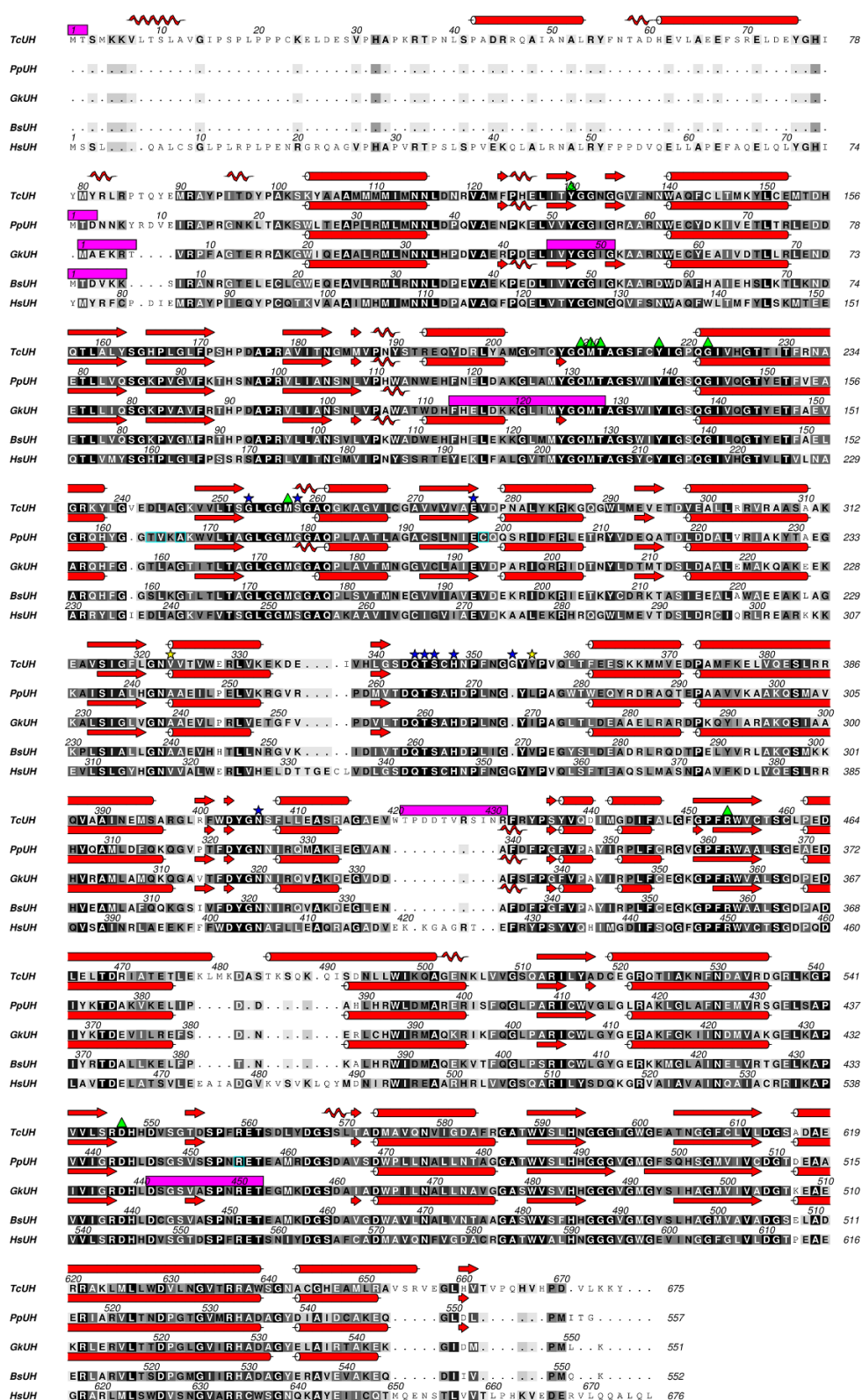
Legenda: O símbolo ":" representa as inter-relações entre os monômeros, entre os resíduos e áreas de interface. Dados obtidos pela ferramenta PDBsum.

Fonte: A autora.

1.5.2.2.2 Análises dos contatos com os ligantes (NAD^+ e urocanato) e alinhamento das sequências

Apesar do enovelamento da *TcUH* e das homólogas serem similares, existem diferenças, observadas pelo alinhamento (Figura 11), no sítio ligante do NAD^+ entre as estruturas homólogas, considerando-se uma distância de até 3,5 Å com o ligante. A Gli em *PpUH* (resíduo 179), *GkUH* (resíduo 174) e *BsUH* (resíduo 175) é alterada para Ser258 em *TcUH*. Além disso, uma Ala em *PpUH* (resíduo 244), *GkUH* (resíduo 239) e *BsUH* (resíduo 240) é alterada para Val323 em *TcUH*. No entanto, os resíduos hidrofóbicos em *PpUH* (resíduo 275), *GkUH* (resíduo 270) e *BsUH* (resíduo 271), Leu, Ile e Val, respectivamente, correspondem a uma Tyr356 em *TcUH*. Vale destacar que estes diferentes resíduos em *TcUH* apresentam suas cadeias laterais relativamente próximas ao NAD^+ principalmente a Ser258, a qual forma uma ligação de hidrogênio através de seu $\text{O}\gamma$. No entanto, quando comparados à sequência do Urocanato Hidratase de *Homo sapiens* (*HsUH* - eucarioto), esses resíduos são idênticos aos da *TcUH*.

Com relação aos contatos para urocanato, o alinhamento (Figura 11) mostra que esse local é totalmente conservado entre todas as enzimas.

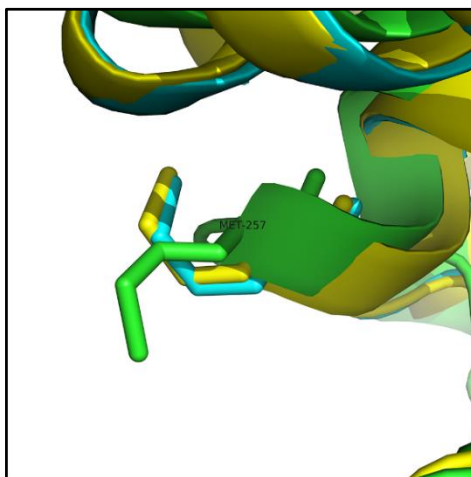
Figura 11 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas *TcUH*, *PpUH*, *GkUH*, *BsUH* e *HsUH*.

Legenda: Estrelas azuis indicam os resíduos que fazem contato com o NAD⁺ nos 4 monômeros. Estrelas amarelas indicam os resíduos que fazem contato com o NAD⁺ nas homólogas e que são diferentes na *TcUH*. Triângulos verdes indicam resíduos que fazem contato com o urocanato em *PpUH*. Em vermelho estão as fitas-β e as hélices-α.

Fonte: A autora.

A conformação desses resíduos também é conservada, com exceção do Met257, que no *TcUH* assume uma conformação diferente (Figura 12), em comparação com as outras estruturas em que foi modelada.

Figura 12 - Comparação da Met257 (*TcUH*, verde) com suas correspondentes (*PpUH*, azul, *BsUH*, amarelo) nas estruturas homólogas.

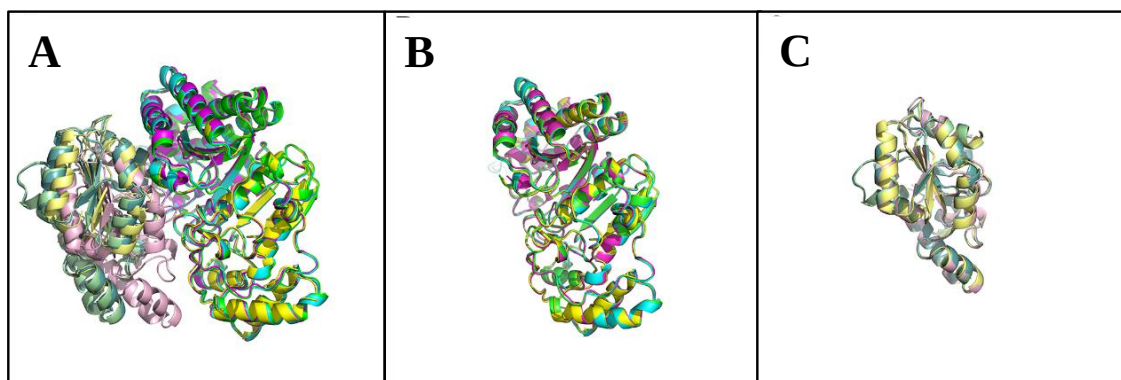


Fonte: A autora.

1.5.2.2.3 *Análises e comparações entre monômeros de TcUH, domínios e estrutura proteica homóloga*

As superposições entre os quatro monômeros de *TcUH* revelam diferenças na orientação relativa dos domínios, o que levou a um RMSD entre monômeros (A e C) de até 3.572 Å. No entanto, quando domínios únicos são sobrepostos, os valores de RMSD diminuem acentuadamente, sugerindo que os domínios são estruturalmente conservados (Figura 13) (Tabela 4).

Figura 13 - Sobreposição dos monômeros da TcUH.



Legenda: Monômero A em verde, monômero B em ciano, monômero C em magenta e monômero D em amarelo. A) Sobreposição global dos monômeros, B) Sobreposição dos domínios centrais e C) Sobreposição dos domínios do NAD⁺.

Fonte: A autora.

Tabela 4 - Valores de RMSD (Å) entre Cα's das estruturas sobrepostas.

Monômero	D	C	B
A	1,144-0,382-0,526	3,572-0,392-0,684	0,582-0,460-0,320
B	0,991-0,468-0,528	3,345-0,420-0,667	-
C	3,258-0,460-0,827	-	-

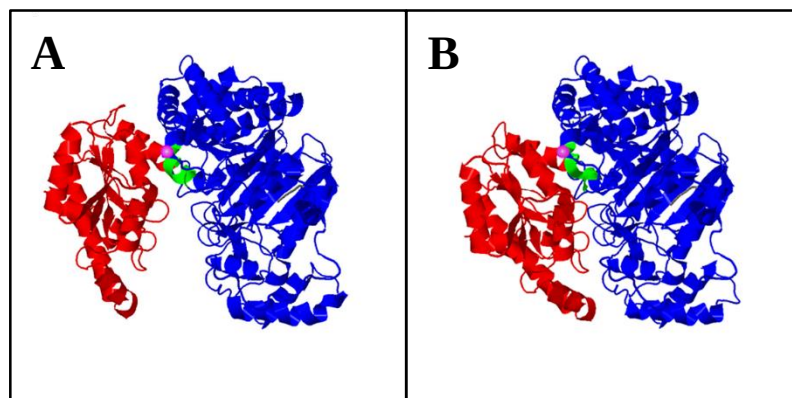
Legenda: Nas células, os valores são para: monômero completo - domínio central - domínio do NAD⁺.

Fonte: A autora.

1.5.2.2.4 Análises da orientação relativa dos domínios

A análise feita com o programa DynDom, que compara os monômeros em conjuntos de dois a dois, destacou uma diferença significativa na orientação do domínio do NAD⁺ entre os monômeros A e C, principalmente (B e C e B e D, mostram praticamente as mesmas diferenças, dado que A e B, entre eles, não apresentam diferença significativa). Na comparação entre os monômeros A e C, o programa definiu duas regiões de flexão, envolvendo os resíduos 220-225 e 442-443, que são um ponto de suporte para a rotação relativa entre domínios e, nessa estrutura, são terminais de α -hélices e suas vizinhanças. A rotação e translação estimadas entre domínios são 22,9° e 0,1 Å (Figura 14), respectivamente. Quando a comparação foi feita com os monômeros A e D, a diferença de orientação entre domínios ainda é significativa, embora menor, envolvendo aproximadamente as mesmas "regiões flexíveis", com rotação e translação estimadas de 8,6° e 0,1 Å, respectivamente.

Figura 14 - Orientações relativas entre domínios.



Legenda: A) Monômero A and B) Monômero C. Os domínios centrais ("fixos") são mostrados em azul e os domínios NAD⁺ ("móveis") são mostrados em vermelho, regiões de flexão são mostradas em verde e as posições eixo de rotação perpendicular são mostradas em magenta. Figura produzida por Dyndom (HAYWARD; KITAO; BERENDSEN, 1997).

Fonte: A autora.

1.5.2.2.5 Análises das ligações de hidrogênio e pontes salinas

O monômero A, que possui uma conformação "aberta" (Figura 14-A), apresenta 23 interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio + pontes salinas), estimadas pelo PISA (KRISSINEL; HENRICK, 2007), entre os domínios. No entanto, o monômero C apresenta 11 interações eletrostáticas entre os domínios (Tabela 5); a única interação (ligação de hidrogênio) presente nos dois monômeros é Gly222-N → Gly219-O.

Tabela 5 – Área da interface e número de interações eletrostáticas entre os domínios (central e NAD⁺).

Monômero	Área da interface (Å)	Número de interações eletrostáticas (HB + SB)
A	1043,1	23
B	1121,5	16
C	1261,0	11
D	532,9	2

Fonte: A autora.

Esses números de interações eletrostáticas podem parecer incoerentes, considerando a proximidade geral entre os domínios. De fato, o monômero C apresenta mais interações (total de 8 contra 2 do monômero A) longe da região de conexão isto é, uma região de flexão, mais a hélice 221-238, que parece mediar interações entre os domínios mas o monômero A apresenta muito mais interações (total de 21 contra 3 do monômero C) nessa região de conexão.

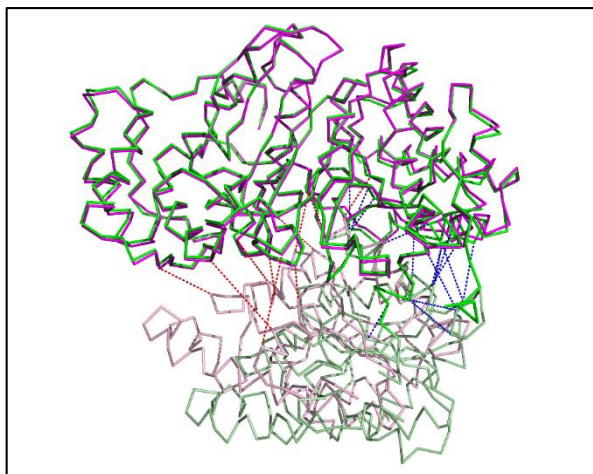
Parece que, para promover mudanças na orientação do domínio (ou como resultado disso), várias ligações de hidrogênio e pontes salinas devem ser interrompidas e envolvem principalmente a hélice 221-238, posicionada em uma espécie de interface central entre os domínios. Como outra consequência da mudança de orientação do domínio, a *coiled coil* entre a parte (resíduos 222-231) desta hélice e a que compreende os resíduos 258-267 (no domínio NAD⁺) é alterada, com os “passos” médios calculados pelo programa Twister (STRELKOV; BURKHARD, 2002) como 49,7 Å para o momento A e 60,1 Å para o monômero C.

Além disso, no monômero C, as cadeias laterais de muitos resíduos em interação entre essas duas primeiras hélices estavam desordenadas, o que correlaciona-se com a diferença na área interfacial entre elas, calculada em 244,6 e 185,8 Å² para o monômero A e C, respectivamente. Por outro lado, a hélice 221-238 do monômero A apresenta interações eletrostáticas adicionais também com a hélice 485-504, contudo, sua região C-terminal está mais próxima da região N-terminal do que no monômero C.

Vale ressaltar que as interações Arg232-N η 2 $\rightarrow$ Ser492-O γ e aArg232-N ϵ $\rightarrow$ Asp493-O δ 1 estão presentes apenas na estrutura TcUH, porque nas enzimas homólogas essa Arg não é conservada (Figura 11). No entanto, outras interações observadas apenas no Monômero A, entre os resíduos Lys237 $\rightarrow$ Asp440, Tyr238 $\rightarrow$ Asp440 e Asp403 $\rightarrow$ Tyr437, não devem estar presentes no Monômero C porque, neste último, os resíduos Tyr437 e Asp440 estão bastante distantes de seus parceiros. De fato, eles são desordenados na estrutura cristalina, provavelmente devido à ausência dessas interações. Por outro lado, as interações entre os resíduos Gln221 $\rightarrow$ Ala512, Gln221 $\rightarrow$ Arg513 e Gln221 $\rightarrow$ Ile514 não são encontradas no monômero C, provavelmente devido a mera desordem da cadeia lateral da Gln221. Finalmente, a interação Asn233-N δ 2 $\rightarrow$ Gln490-O ϵ 1 não está presente no monômero C devido à grande distância entre seus C α 's, 10.62 Å, enquanto no monômero A essa distância é de apenas 8,28 Å. A interação Tyr217-O η $\rightarrow$ Gln256-O, embora na "link region", está presente apenas no monômero C (o monômero A apresenta uma maior distância de C α entre esses dois resíduos); vale ressaltar que o resíduo Tyr217 deve interagir com o substrato urocanato (de acordo com a estrutura homóloga) e o resíduo Gln256 faz parte de uma sequência conservada rica em resíduos de glicina (253-259), portanto, essas diferentes conformações estruturais podem ser relevantes durante a reação. Ainda, a interação Gly222 $\rightarrow$ Arg454, que envolve a hélice central de interface (resíduos 221-238), está presente apenas no monômero C, uma vez que o resíduo Gly222 está mais próximo da hélice 485-504 nesse monômero.

A Figura 15 mostra as diferenças nas interações eletrostáticas entre monômeros e as regiões da estrutura em que estão concentradas.

Figura 15 - Sobreposição entre os monômeros A (verde) e C (magenta) da TcUH nos quais os domínios NAD⁺ estão em cores claras.



Legenda: As interações eletrostáticas presentes apenas no monômero A são coloridas em azul e as presentes apenas no monômero C são coloridas em vermelho.

Fonte: A autora.

Essa diferença de conformação entre monômeros permite observar que, quando na conformação fechada (monômero C), a molécula NAD⁺ ligada, através da nicotinamida e da ribose, é trazida para contato próximo com o loop 595-603, especialmente Gly597, como já apontado em *PpUH* (KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004). Esse loop apresenta ainda outra região rica em glicina (595-601, que possui cinco resíduos de glicina e, portanto, provavelmente deve ser altamente flexível), altamente conservada (Figura 11), com a exceção pontual do resíduo Thr598 em *TcUH* (que possui uma treonina no lugar de uma valina, este último presente nas estruturas homólogas e até na enzima humana). De fato, uma região mais extensa, que inclui as β -fitas ao redor e além, é bem conservada entre essas sequências, embora algumas mutações pontuais, geralmente conservadas, estejam presentes.

1.5.2.2.6 Comparações estruturais com proteínas homólogas

Tomando por base o conceito de proteínas homólogas as quais são derivadas de um ancestral comum, a estrutura da *TcUH* foi comparada com as estruturas de outras UH's, pertencentes a outros organismos (Tabela 6).

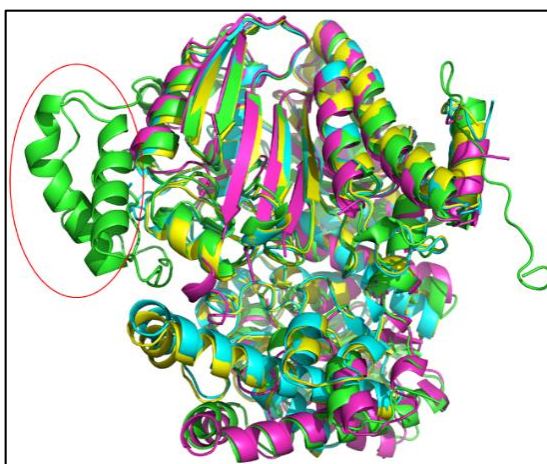
Tabela 6 - Proteínas homólogas à enzima TcUH com estruturas depositadas no PDB.

Código PDB	Resolução (Å)	Organismo	Identidade (%)	Cobertura (%)
1UWK	2,23	<i>Pseudomonas putida</i> (Pp)	36	81
1X87	2,40	<i>Geobacillus kaustophilus</i> (Gk)	36	81
2FKN	2,20	<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)	35	79

Fonte: A autora.

Uma sobreposição entre essas estruturas indicou que o enovelamento é bastante conservado, com exceção de 2 α -hélices extras que existem na TcUH, em destaque na Figura 16. Essas hélices compreendem os resíduos de aminoácidos 42 a 53 e 61 a 75, que se localizam em uma região mais longa no N-terminal da TcUH. Outra diferença significativa é que as hélices contíguas 462-479 e 485-504 são mais longas em TcUH e provavelmente na proteína humana (Figura 11), que também apresenta várias inserções, comparadas às estruturas homólogas.

Figura 16 - Sobreposição do monômero A de TcUH com estruturas as homólogas.



Legenda: TcUH (monômero A) em verde, 1UWK (monômero A) em amarelo, 1X87 (monômero A) em roxo e 2FKN (monômero A) em azul. A elipse vermelha destaca as duas α -hélices extras na TcUH.

Fonte: A autora.

Como pode ser visualizado nas Tabelas 7 A e B, pelos valores de RMSD entre C α s das estruturas superpostas, o monômero C da TcUH apresenta-se mais semelhante à conformação de BsUH na entrada 2FKN, enquanto que o monômero A se assemelha mais à conformação de GkUH na entrada 1X87.

Tabela 7 - Valores de RMSD entre Ca^{2+} 's referentes à sobreposição das estruturas de UH de *Pseudomonas putida* (código PDB 1UWK), *Geobacillus kaustophilus* (código PDB 1X87) e *Bacillus subtilis* (código PDB 2FKN).

A)

Enzima/Organismo	RMSD (Å) / N. de resíduos		
	Domínio central	Domínio do NAD^+	Global
<i>Pp</i> UH (monômero A)	1,0763 / 245	1,5987 / 210	2,6768 / 457
<i>Gk</i> UH (monômero A)	1,3487 / 254	1,5911 / 192	1,5461 / 447
<i>Bs</i> UH (monômero A)	1,2345 / 334	1,5739 / 201	2,6418 / 456

Legenda: Utilizando o monômero A da *Tc*UH

Fonte: A autora.

B)

Enzima/Organismo	RMSD (Å) / N. de resíduos		
	Domínio central	Domínio do NAD^+	Global
<i>Pp</i> UH (monômero A)	1,1684 / 249	1,4537 / 194	1,4430 / 523
<i>Gk</i> UH (monômero A)	1,3369 / 250	1,6359 / 185	3,0789 / 390
<i>Bs</i> UH (monômero A)	1,1831 / 331	1,4163 / 194	1,3900 / 521

Legenda: Utilizando o monômero C da *Tc*UH.

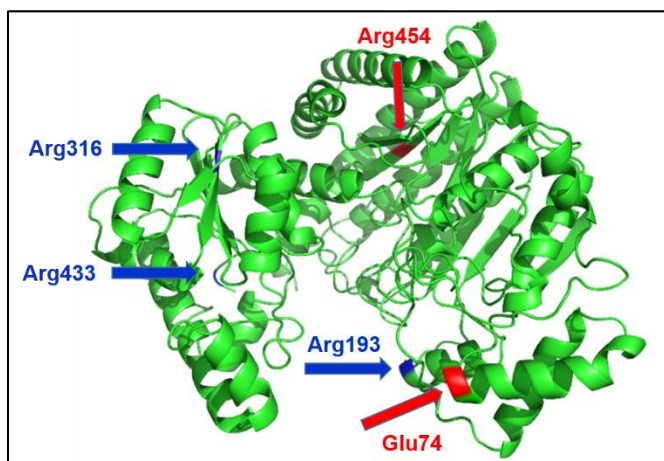
Fonte: A autora.

1.5.2.2.7 Mutações da Urocanato Hidratase de *Homo sapiens* (*Hs*UH) e correlações com a estrutura da *Tc*UH

*Tc*UH é a primeira UH dos eucariotos a ter sua estrutura resolvida e a mais próxima das *Hs*UH's (isoformas 1 e 2). Por isso, foi utilizada sua estrutura como substituta para fazer considerações sobre mutações encontradas nas enzimas humanas.

Três mutações não deletérias na *Hs*UH's (isoformas 1), estão listadas no banco de dados DMDM (Domain Mapping of Disease Mutations) (Peterson et al., 2010), Arg188 → Trp, Ser311 → Thr e Arg429 → Cys. Estes resíduos correspondem a Arg193, Ser316, Arg433 na sequência *Tc*UH (Figura 11 e Figura 17). Na estrutura da *Tc*UH, observa-se que essas posições aparentemente poderiam acomodar essas mutações sem grandes deslocamentos ou interrupções na interação.

Figura 17 - Mutações encontradas *HsUH*'s e suas posições correspondentes na *TcUH*.



Legenda: Mutações não deletérias (azul) e mutações deletérias (vermelhas) em *TcUH* (estrutura mais semelhante até o momento).

Fonte: A autora.

De acordo com o alinhamento (Figura 11), a Arg193 da *TcUH* corresponde a um triptofano nas bactérias, portanto, pode-se esperar que essa seja uma mutação não prejudicial nas enzimas de *T. cruzi* e *Homo sapiens*. Em relação a Ser316 em *T. cruzi*, observa-se que esse resíduo faz uma ligação de hidrogênio por meio do O γ com N da cadeia principal da Met292, portanto, a interação deve ser mantida na mutação treonina, considerando que há espaço suficiente na estrutura para acomodar o C γ extra. Em relação a Arg433, a mesma encontra-se, geralmente desordenada na estrutura da *TcUH*, de modo que só pode ser modelada nos monômeros A e B e, mesmo neste caso, não estão com as cadeias laterais completas.

Duas mutações deletérias na *HsUH*'s (isoformas 1), foram relatadas por Espinós et al. (2015), Leu70 $\rightarrow$ Pro e Arg450 $\rightarrow$ Cys. Estes resíduos correspondem ao Glu74 e a Arg454 na sequência de *TcUH* (Figura 11, Figura 17). Conforme descrito no seu artigo, o resíduo Leu70 foi previsto como parte de uma α -hélice, o que pode-se confirmar agora (*TcUH* Glu74, Figura 11), mas é apenas o penúltimo resíduo no N-terminal. É sabido que os resíduos prolina podem interromper as hélices (LI et al., 1996), mas considerando o local de mutação, não foi possível conceber as consequências dessa interrupção na estrutura e na alteração da função da *TcUH*. Em relação à mutação Arg450 $\rightarrow$ Cys (*TcUH* Arg454), embora a estrutura *TcUH* não contenha o substrato (urocanato), a superposição das estruturas de *PpUH* com *TcUH* mostrou que a conformação da cadeia lateral da arginina é mantida. Espinós et al. (2015) citaram a interação desse resíduo com urocanato (observado na estrutura de *PpUH*) e sua importância óbvia, e podemos complementar agora seu provável papel desempenhado em fornecer as conformações

fechadas/abertas (entre os domínios), interação que Arg454-Gly222 interrompeu quando essa transição ocorre.

1.6 CONCLUSÕES

- Os ensaios de cristalização permitiram a obtenção de cristais melhores, dos quais um forneceu um conjunto de imagens de difração de raios X que permitiu o refinamento da estrutura a maior resolução, 2,16 Å;
- A estrutura cristalográfica foi resolvida com o cofator (NAD⁺) presente no sítio catalítico em todos os monômeros;
- Análises estruturais indicaram que os monômeros A e C apresentam diferentes conformações; de modo que o monômero A da *TcUH* (conformação aberta) se assemelha à conformação da *GkUH*, enquanto o monômero C (conformação fechada) se assemelha às conformações da *PpUH* e *BsUH*;
- O monômero A, apresenta 23 interações eletrostáticas (ligações de hidrogênio + pontes salinas), entre os domínios enquanto que o monômero C apresenta 11.
- Dado que *TcUH* é a primeira UH de eucariotos a ter sua estrutura resolvida, ela foi utilizada como modelo para fazer considerações sobre mutações na correspondente humana. As mutações não deletérias podem ser acomodadas sem grandes deslocamentos ou interrupções de interação, enquanto que as mutações deletérias em um caso pode interromper uma α -hélice e, em outro caso, além de interromper a interação da enzima com o substrato, pode interferir no movimento entre domínios;
- A estrutura da *TcUH* foi depositada no PDB (código: 6UEK), a qual eventualmente poderá ser utilizada para o *screening* virtual de inibidores para a doença de Chagas;
- Este trabalho foi publicado no *International Journal of Biological Macromolecules* com título *Structure of Urocanate Hydratase from the protozoan Trypanosoma cruzi* (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813019380468>).

CAPÍTULO 2 - GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Schistosoma mansoni* (SmGAPDH)

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Esquistossomose e o *Schistosoma mansoni*: Aspectos Gerais

A esquistossomose é uma doença endêmica em 74 países, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* que, uma vez dentro do organismo humano, vivem nas veias do mesentério e do fígado (GRYSEELS et al., 2006; ROSS et al., 2002). No Brasil, a esquistossomose é conhecida popularmente como “xistose”, “barriga d’água” ou “doença dos caramujos (BRASIL, 2019c). Considerando a doença parasitária em humanos, seis espécies são relevantes: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma malayense* e *Schistosoma intercalatum* (ROSS et al., 2002). A espécie *Schistosoma mansoni* é predominante em infecções no Brasil, África, Oriente Médio, Caribe, Venezuela e Suriname (WHO, 2020a).

A esquistossomose é elencada como uma doença negligenciada no Brasil cuja prevalência ocorre em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em áreas pobres e rurais, onde as condições de saneamento e qualidade de vida são precárias (MARTINS et al., 2015). A transmissão ocorre pelo contato do homem com águas contaminadas, provenientes de córregos naturais, lagoas e lagos, entretanto, nas últimas décadas reservatórios e sistemas de irrigação artificiais têm contribuído para a disseminação da esquistossomose (GRYSEELS et al., 2006). Como o contato com a água infectada nem sempre pode ser evitado, especialmente por pessoas em áreas endêmicas cuja ocupação ou atividade cotidiana os expõe a essas águas, a OMS recomenda a quimioterapia preventiva visando o controle da morbidade. O tratamento preventivo é então realizado com o medicamento Praziquantel que é disponibilizado à população de alto risco: crianças em período escolar de área endêmicas, pescadores, agricultores, trabalhadores de irrigação e mulheres cujas tarefas domésticas as colocam em contato com água infectada. Estimativas mostram que pelo menos 290,8 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo para a esquistossomose em 2018, das quais mais de 97,2 milhões de pessoas foram tratadas (WHO, 2020b).

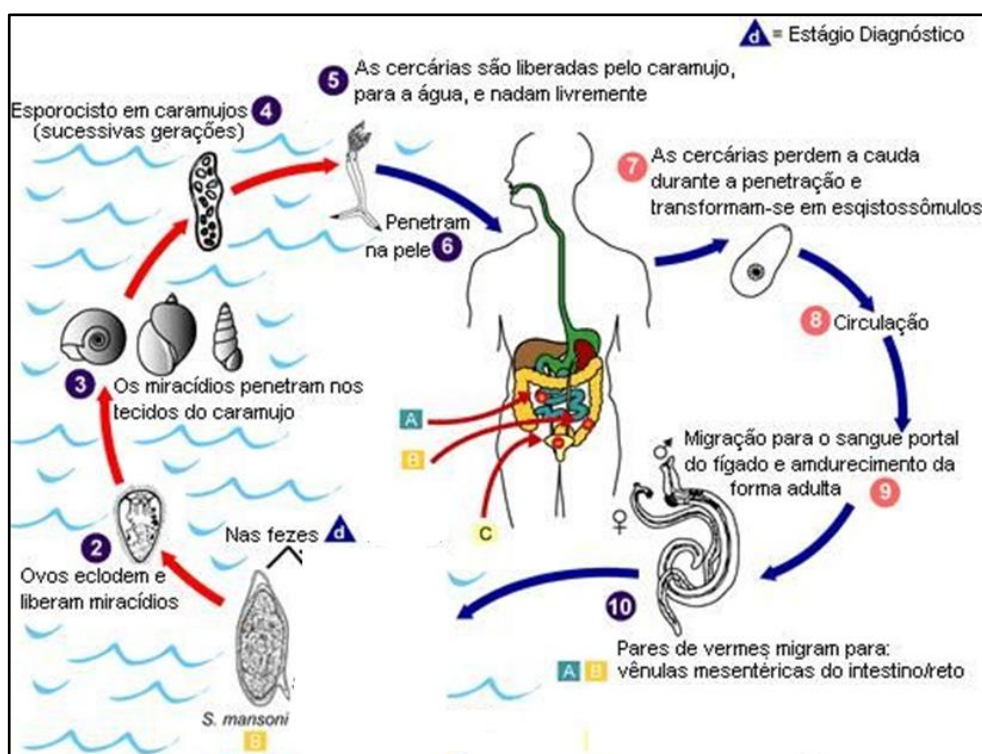
No Brasil estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivam em áreas com risco de contrair a doença, sendo os estados das regiões Nordeste e Sudeste os mais afetados. Entretanto, a doença é detectada em todas as regiões do país e as áreas endêmicas abrangem os Estados de

Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, portanto não atinge grandes áreas (BRASIL, 2019c).

Estratégias para prevenir a infecção pelo *Schistosoma* incluem o tratamento medicamentoso preventivo, controle do caramujo, abastecimento de água potável, saneamento, saúde e educação. Embora esses métodos tenham sido usados em diferentes áreas endêmicas, nenhum deles foi completamente satisfatório e alguns, como o controle do caramujo, provaram ser difíceis de implementar e ineficazes em várias áreas endêmicas (GAZZINELLI et al., 1998)

O ciclo biológico do esquistossoma ocorre em 2 hospedeiros (Figura 18): caramujos e mamíferos. Ocorre reprodução assexuada ou sexuada, dependendo do tipo de hospedeiro. A reprodução assexuada ocorre em caramujos que vivem livremente em água doce. Nos caramujos, o ciclo começa com o desenvolvimento de miracídios em um esporocisto. Os esporocistos se multiplicam e evoluem para cercárias. As cercárias são as formas infectantes para os hospedeiros mamíferos, como humanos, camundongos e cães. Em mamíferos infectados as cercárias crescem, amadurecem sexualmente, acasalam e produzem ovos (NELWAN, 2019).

Figura 18 - Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.

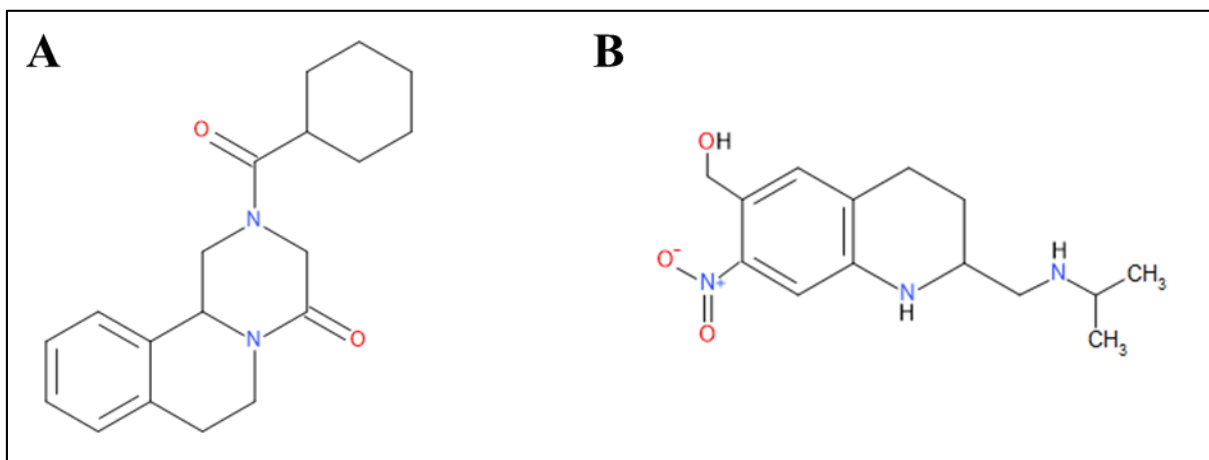


Fonte: Adaptado de CDC (2019).

As manifestações clínicas da xistose permitem dividir a evolução da doença em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é normalmente assintomática, entretanto, minutos após a infecção cercariana, pode aparecer urticária local que geralmente dura algumas horas (GRYSEELS, 2012); após 1 a 4 semanas a infecção pode levar à febre de Katayama, caracterizada por febre associada a linfadenopatia, dor de cabeça, anorexia, dor abdominal e, com menor frequência, diarreia, náusea, vômito e tosse seca (GRYSEELS, 2012; SILVA JUNIOR et al., 2013). A doença é detectada por alterações encontradas nos exames laboratoriais de rotina como eosinofilia, hemograma e presença de ovos de *S. mansoni* em exames coproscópicos (BRASIL, 2014). Aproximadamente 10% dos pacientes evoluem para a fase crônica (LEITE et al., 2015). A forma crônica começa a partir do 6º mês após a infecção e pode durar vários anos. Com o progresso da doença, diferentes órgãos podem ser acometidos, incluindo complicações graves, como hipertensão pulmonar, hipertensão portal, ascite e ruptura de varizes esofágica.

Esta fase, portanto, pode se apresentar de maneira polimórfica, compreendendo as formas digestivas (intestinais, hepatointestinal e hepatoesplênica), os distúrbios vasculares pulmonares (hipertensiva e a cianótica), as formas pseudoneoplásicas, a nefropatia esquistossomótica e as lesões ectópicas (neuroesquistossomose) (SOUZA et al., 2011). No tocante ao tratamento medicamentoso, existem 2 drogas disponíveis: o Praziquantel (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a] isoquinolina-4-ona) e a Oxamniquina ((RS)-1,2,3,4-tetrahidro-2- isopropilaminomethyl-7-nitro-6-quinolilmetanol) (Figura 19), utilizados desde as décadas de 60 e de 70, respectivamente (INOBAYA et al., 2014). Ambos são ministrados em pacientes acometidos pela doença, tanto na fase aguda quanto na fase crônica.

Figura 19 - Representação das estruturas químicas das principais drogas usadas para o tratamento da esquistossomose.



Legenda: A) Praziquantel. B) Oxamniquina.
 Fonte: KIM et al. (2019).

O Praziquantel, um derivado pirazino-isoquinoleínico, é um medicamento anti-helmíntico direcionado a uma ampla gama de infecções parasitárias (INOBYA et al., 2014) e apresenta efeitos colaterais leves (diarreia e dor abdominal), não existindo evidências de que provoque lesões tóxicas graves no fígado ou em outros órgãos (SILVA JUNIOR et al., 2013). Aproximadamente 80% da droga é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, metabolizada pelo fígado e excretada principalmente pela urina, pela bÍlis e então pelas fezes (CHAI, 2013; INOBYA et al., 2014). A Oxamniquina é um derivado da aminoetiltetrahydroquinolona, atualmente é usada principalmente no Brasil, é tão eficaz quanto o praziquantel, mas pode provocar efeitos colaterais mais pronunciados, principalmente sonolência, indução do sono e convulsões epilépticas (GRYSEELS et al., 2006). Sabe-se que é eficaz apenas contra *S. mansoni* (CIOLI et al., 2008; INOBYA et al., 2014), particularmente nos estágios invasivos e contra os vermes adultos, sendo os vermes masculinos mais sensÍveis à droga do que os vermes femininos (INOBYA et al., 2014). O metabolismo do medicamento é por oxidação e a excreção ocorre principalmente pela urina (INOBYA et al., 2014). Apesar de ambos os medicamentos serem considerados eficazes, existe uma preocupação com o desenvolvimento da resistência ao *S. mansoni* ao Praziquantel (ABDUL-GHANI; LOUTFY; HASSAN, 2009) principalmente pelo fato das baixas taxas de cura nos surtos ocorridos no norte do Senegal e no Egito (DOENHOFF et al., 2002). Outra causa possível de falha do tratamento, além da resistência, é a ineficácia do Praziquantel no tratamento de estágios iniciais da doença (INOBYA et al., 2014). A Oxamniquina tem preço superior ao do Praziquantel, assim é improvável que seja usada na África e pode ser particularmente propensa ao problema da

resistência aos medicamentos, mas merece consideração porque foi eficaz contra *S. mansoni* em uma área (Norte do Senegal) em que o Praziquantel produziu inesperadamente baixas taxas de cura (STELMA et al., 1997).

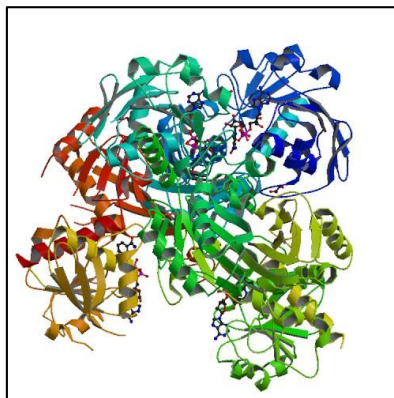
Diante do exposto, fica claro que a infecção por *S. mansoni* constitui, ainda, um importante problema de saúde pública, o qual pode ser contornado com o desenvolvimento de novos medicamentos, o controle vetorial (caracol), a modificação ambiental da água, saneamento e higiene e outras ferramentas inovadoras como o desenvolvimento de vacinas (MO et al., 2014). O desenvolvimento de vacinas é reconhecido como uma prioridade para complementar o controle, especialmente porque há evidências de que humanos adquirem imunidade a esquistossomos, sugerindo que o desenvolvimento de tais vacinas é viável (WAINE et al., 1993; WAINE; MCMANUS, 2005).

Considerando a abordagem terapêutica por quimioterapia, a princípio, proteínas envolvidas no metabolismo da glicólise poderiam ser alvos para o planejamento de medicamentos, desde que essas moléculas alvo apresentem diferenças exploráveis suficientes quando comparadas com suas homólogas de humano (VERLINDE et al., 2002). No caso particular deste trabalho, o interesse está na sexta enzima da via glicolítica, a Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), uma das enzimas mais importantes envolvidas no metabolismo da energia celular.

2.1.2 Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH)

A enzima GAPDH (E.C 1.2.1.12) é encontrada em diferentes organismos e foi isolada a partir de vários procariotos e eucariotos, incluindo humanos (BERMAN et al., 2000). Atualmente, no PDB, há 180 depósitos de estruturas de GAPDH's, sendo a estrutura da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Brugia malayi* (BmGAPDH - código PDB: 4K9D (Figura 20) a que possui maior homologia com a SmGAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Schistosoma mansoni*).

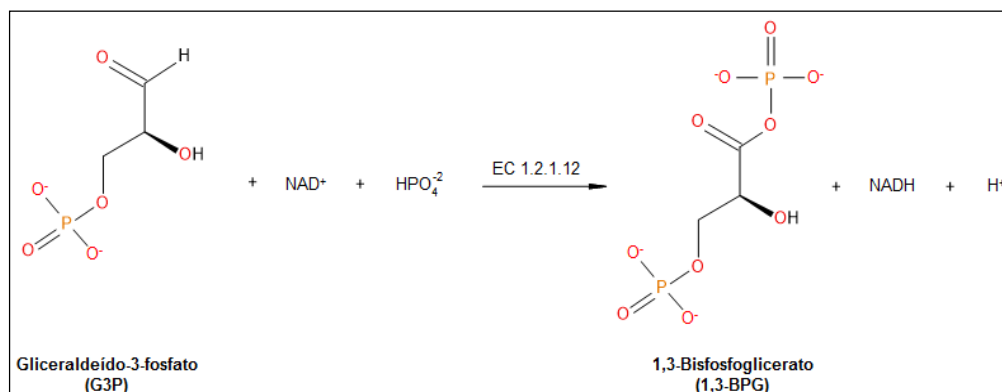
Figura 20 - Estrutura tridimensional da proteína *BmGAPDH*.



Fonte: FAIRMAN et al. (2013).

A GAPDH faz parte da família de oxidoreduases conhecidas especialmente pelo seu papel fundamental no metabolismo da glicólise, o qual envolve uma série de reações enzimáticas para produzir energia celular, principalmente na forma de trifosfato de adenosina (ATP). Neste metabolismo, a GAPDH catalisa a sexta etapa do processo de glicólise, atuando na conversão de gliceraldeído-3-fosfato em D-glicerato 1,3-bifosfato na presença de NAD^+ e assimilando um fosfato inorgânico (Figura 21).

Figura 21 - Conversão de Gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-Bisfosfoglicerato.



Fonte: SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG (2002).

Além da glicólise, a GAPDH está envolvida em vários processos não-metabólicos, incluindo: replicação e reparo de DNA, controle traducional de expressão gênica, resposta ao estresse oxidativo, início da apoptose, transporte e fusão da membrana, exportação de tRNA, dentre outros. Também há relatos do seu envolvimento em doenças neurodegenerativas, como por exemplo, doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson (revisado por SIROVER, 1999, 2011; TRISTAN et al., 2011). As propriedades multifuncionais da GAPDH

provavelmente são reguladas, pelo menos em parte, por sua oligomerização, modificações pós-traducionais e localização intracelular (citoplasma, vesículas, mitocôndrias e núcleos da células) (TRISTAN et al., 2011).

De forma geral, as GAPDH's são homotetrâmeros com peso molecular ~150 kDa e cada subunidade pesa ~37 kDa. Cada monômero possui um sítio de ligação ao NAD⁺ (cofator) e um sítio de ligação ao gliceraldeído-3-fosfato (substrato). A caracterização enzimática destas enzimas revelam que o pI está entre 4,25 e 9,1, a temperatura ótima entre 25 e 87 °C e o pH ótimo entre 7 e 10 (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2002 - www.brenda-enzymes.org/).

Os estudos das GAPDH's estão sempre em expansão; é considerada uma proteína clássica, não apenas por seu papel na glicólise, mas também por ser uma proteína modelo para análises cinéticas enzimáticas, modelagem cristalográfica e também para isolamento e caracterização de genes (SIROVER, 2014). Também, devido à multifuncionalidade, a elucidação bioquímica e funcional das GAPDH em vários contextos está sempre em expansão. Em poucas décadas, o foco da pesquisa com GAPDH progrediu gradualmente de uma proteína de interesse para enzimologistas para uma proteína multifuncional de interesse também para cientistas clínicos (GANAPATHY-KANNIAPPAN, 2018).

A Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de *Schistosoma mansoni* (SmGAPDH) tem sido considerada uma boa candidata para o desenvolvimento de vacina contra a esquistossomose humana (ARGIRO et al., 2000; EL RIDI et al., 2001; PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2020; TALLIMA et al., 2017) e é identificada como alvo molecular terapêutico no Banco de Dados de Alvos da OMS/TDR (AGÜERO et al., 2008). De forma geral, as GAPDH's presentes em organismos patogênicos têm sido alvo de muitos estudos em química medicinal e, como resultado, inibidores de origem natural e sintética, com boa diversidade química, têm sido descobertos (DIAS; DESSOY, 2009).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo para obtenção dos clones contendo o gene da enzima SmGAPDH;
- Inserir a construção pET-28a/SmGAPDH em bactérias;
- Determinar as condições de expressão e purificação;
- Obter cristais da SmGAPDH com qualidade adequada para resolução da estrutura por difração de raios X;

- Refinar a estrutura proteica a partir de dados de difração de raios X;
- Realizar comparações estruturais com proteínas homólogas.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Procedimentos Experimentais

2.3.1.1 Obtenção dos clones contendo o gene da enzima *SmGAPDH*

Realizou-se um estudo para escolher o plasmídeo e os sítios de restrição para inserção do gene codificante de *SmGAPDH*. Para tanto, foi feita uma busca no PDB para verificar em quais plasmídeos foram clonadas enzimas homólogas. Decidido o plasmídeo, o estudo seguiu com a escolha de enzimas de restrição que não clivassem a sequência de nucleotídeos do gene da *SmGAPDH* e que fossem compatíveis com a região de múltipla clonagem do plasmídeo escolhido; esta etapa foi realizada com o auxílio do programa NEBcutter (versão 2.0) (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003). Outro fator levado em consideração foi a expressão de um “his-tag” no N-terminal suscetível a clivagem com a enzima Trombina. Definidos os parâmetros necessários para a compor o vetor de expressão da *SmGAPDH*, foi encomendada a construção, plasmídeo com inserto, junto à empresa Synbio Technologies (<https://www.synbio-tech.com/>).

2.3.1.2 Transformação de bactérias eletrocompetentes por eletroporação

Este procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante para a utilização do eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad Laboratories). Desta forma, o vetor de interesse, pET-28a(+) contendo o gene que codifica para *SmGAPDH*, e as bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* BL21(DE3) foram colocados numa cubeta para eletroporação com 0,1 cm de largura e submetidos a um pulso elétrico no eletroporador *MicroPulser*, ajustado em 2,5 kV de tensão elétrica. Após o pulso elétrico, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura líquido tipo SOC e deixadas sob agitação a 250 rpm a 37 °C por 1 h, em seguida, plaqueadas em meio sólido seletivo (LA) contendo o antibiótico canamicina (0,03 mg mL⁻¹) e incubadas por 12 h a 37 °C em estufa.

2.3.1.3 Expressão e extração da *SmGAPDH*

Os experimentos de expressão foram realizados para 3 colônias selecionadas aleatoriamente, provenientes da transformação bacteriana, utilizando-se IPTG como agente indutor. Para cada colônia, de forma independente, foram testadas as temperaturas de 37 °C e 20 °C por 6 h. A fim de otimizar os resultados obtidos na temperatura de 20 °C, foram realizados ensaios de expressão com 3, 6 e 16 h de indução nas concentrações de IPTG de 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 mmol L⁻¹.

As culturas de células obtidas em cada condição foram centrifugadas por 30 min a 15.000 × g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 10 mL de tampão de lise (20 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio anidro, 200 mmol L⁻¹ de NaCl e 10 mmol L⁻¹ de glicerol, pH 6,5). Posteriormente, este material foi submetido a cinco pulsos de sonicação em banho de gelo (1 min a 40% de potência e 1 min em gelo). Após o rompimento celular, a amostra, referente a 10 mL de cultura, foi submetida a centrifugação a 15.000 × g por 45 minutos a 4 °C.

A análise dos resultados foi realizada por SDS-PAGE (12 %) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

2.3.1.4 Purificação por cromatografia de afinidade

A fração contendo as proteínas solúveis (correspondentes a 2 L de cultura bacteriana) foi ressuscitada em 10 mL de tampão de lise (descrito no item 2.3.1.3) e utilizada na purificação por cromatografia de afinidade em resina com níquel (HisTrap™ FF crude, GE Life Sciences). A coluna contendo 1 mL da resina foi inicialmente equilibrada com 15 volumes de coluna com o tampão de lise. Alíquota de 10 mL da solução de proteínas foi injetada na coluna. A lavagem das proteínas com interação fraca ou inespecífica foi realizada através da aplicação de 20 mL de tampão de ligação. A eluição da enzima recombinante foi realizada por meio de um gradiente de imidazol presente no tampão eluição (20 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio anidro, 200 mmol L⁻¹ de NaCl e 10 mmol L⁻¹ de glicerol, 500 mmol L⁻¹ de imidazol, pH 6,5). No gradiente, a concentração de imidazol variou de 0,1 a 500 mmol L⁻¹, sendo a concentração máxima atingida após a passagem de 35 mL (fluxo de 1 mL min⁻¹, mantido em todas as etapas).

A análise dos resultados foi realizada por SDS-PAGE (12%) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

2.3.1.5 Cristalização da SmGAPDH

Para os ensaios de cristalização, a enzima foi concentrada por centrifugação a 3.000 g em dispositivo Vivaspin 6. As concentrações obtidas foram 5,0 e 10,0 mg mL⁻¹, conforme dosagem feita pelo método de Bradford (1976). O método de cristalização utilizado foi o da difusão de vapor por gota suspensa (MCPHERSON, 1999).

Os experimentos foram conduzidos manualmente na câmara de cristalização da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Foram testados os kits comerciais de cristalização Morpheus, JCSG, PGA Screen e MIDAS do fabricante Molecular Dimensions. Para cada ensaio, misturaram-se 2 µL de solução precipitante com 2 µL de solução da enzima, que foram deixados equilibrar com 500 µL da solução do poço. Os ensaios foram mantidos a 18 °C e as inspeções para identificação dos cristais foram realizados a cada 24 h. No total foram testadas 384 condições.

2.3.1.6 Coleta de dados

Os dados de difração de raios X foram coletados no comprimento de onda de 0,97856 Å a 100 K usando a fonte de radiação síncrotron (SOLEIL) na estação PROXIMA-1, localizada na França. O cristal foi coletado com um crioloop e resfriado diretamente em uma corrente de nitrogênio a 100 K uma vez que a condição de cristalização já era crioprotetora.

2.3.2 Procedimentos Computacionais

2.3.2.1 Determinação da estrutura por difração de raios X

2.3.2.1.1 *Processamento das imagens*

Indexação, integração e escalonamento foram realizados com os programas computacionais xds/xscale (KABSCH, 2010).

Após, a ferramenta xtriage do pacote PHENIX (ADAMS et al., 2011) foi utilizada para a identificação de patologias do cristal.

2.3.2.1.2 *Faseamento inicial por substituição molecular*

O processo de faseamento inicial foi realizado conforme citado no item 1.3.2.1.2 do capítulo 1.

2.3.2.1.3 *Modelagem e refinamento*

O ajuste das posições atômicas foi realizado através de um processo iterativo com os programas *Phenix.refine* (AFONINE et al., 2005) e COOT (EMSLEY; COWTAN, 2004). Todos os ciclos de refinamento foram realizados levando-se em consideração a operação de geminação. Os mapas utilizados para visualização foram Fourier diferença $mFo-DF$ e densidade eletrônica $2mFo-DFc$.

2.3.2.1.4 *Validação*

O processo de validação foi realizado conforme citado no item 1.3.2.1.4 do capítulo 1.

2.3.2.2 *Análises e comparações estruturais*

2.3.2.2.1 *Topologia*

O diagrama de topologia e os valores das áreas de contato entre os monômeros, foram obtidos conforme citado no item 1.3.2.2.1 do capítulo 1.

2.3.2.2.2 *Comparações entre os monômeros e domínios da SmGAPDH*

As comparações entre os monômeros da SmGAPDH foram realizadas conforme citado no item 1.3.2.2.2 do capítulo 1.

2.3.2.2.3 *Análises dos contatos com o cofator (NAD^+) e alinhamento das sequências*

Os contatos com o NAD^+ na estrutura homóloga (PDB: 4K9D) foram determinados

com o programa Ncont até 3,5 Å de distância e, através do alinhamento da sequência desta com a *SmGAPDH*, os aminoácidos de contato equivalentes foram presumidos.

O alinhamento entre sequências foi realizado com GAPDH's de organismos representativos cuja estrutura 3D é conhecida tendo-se privilegiado organismos patogênicos. Exceções foram a de *Oriza sativa* e as duas humanas. O programa utilizado foi o T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000) seguido por alguns poucos ajustes manuais. A visualização do alinhamento se deu por meio do programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009), sendo as estruturas secundárias estimadas pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). Para realçar conservação entre os resíduos, o fundo do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

2.3.2.2.4 Comparações estruturais com proteínas homólogas

As comparações estruturais com proteínas homólogas foram realizadas conforme citado no item 1.3.2.2.3 do capítulo 1.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Procedimentos Experimentais

2.4.1.1 Clonagem

O estudo direcionado à clonagem do gene *SmGAPDH* levou à encomenda da construção pET-28a/*SmGAPDH* com os sítios de restrição *NheI* e *XhoI*. Esta estratégia possibilitou que um pequeno número de aminoácidos fosse adicionado à sequência nativa mantendo a expressão de uma “his-tag” no N-terminal e contendo um sítio para eventual corte desta cauda mediante hidrólise pela enzima Trombina.

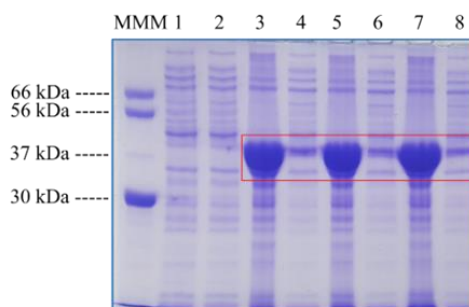
2.4.1.2 Expressão

A sequência de aminoácidos da enzima *SmGAPDH* foi submetida a análise pelo servidor ProtParam (EXPASY Proteomics Server) que calculou uma massa molecular de 36.377,64 Da (338 resíduos de aminoácidos), que com a inclusão de 6 resíduos de histidina e

seus conectores, provenientes do sistema de clonagem, leva a uma massa molecular de 38.540,96 Da (358 resíduos de aminoácidos).

Tendo em vista esta informação, a análise eletroforética do experimento da expressão realizada a 37 °C por 6 h e induzida com 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG indicou que a proteína foi expressa, entretanto, encontrava-se majoritariamente na fração insolúvel (Figura 22).

Figura 22 - SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 37 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para a enzima *SmGAPDH*.

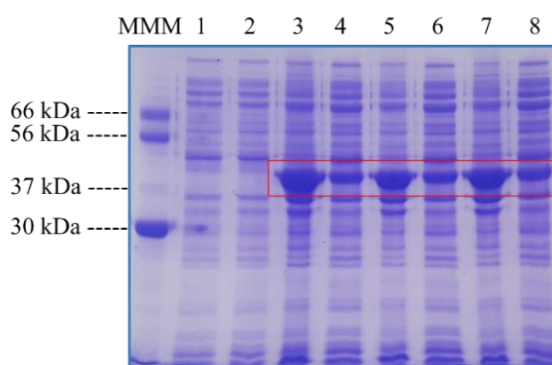


Legenda: MMM: Marcador de Massa Molecular. Raias identificadas como 1 e 2: amostras do extratos da bactérias BL21(DE3) não transformada e não induzida, respectivamente. Raias 3, 4, 5, 6, 7 e 8, frações insolúveis e solúveis das três colônias testadas. O retângulo vermelho indica as bandas de expressão. Foram aplicados 10 µL de solução proteica por raia.

Fonte: A autora.

Com a mudança na temperatura de indução para 20 °C, a proteína foi expressa na fração solúvel em quantidade maior do que quando nas mesmas condições a 37 °C (Figura 23).

Figura 23 - SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 20 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para a enzima *SmGAPDH*.



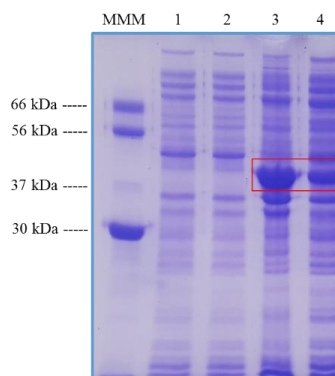
Legenda: MMM: Marcador de Massa Molecular. Raias identificadas como 1 e 2: amostras do extratos da bactérias BL21(DE3) não transformada e não induzida, respectivamente. Raias 3, 4, 5, 6, 7 e 8, frações insolúveis e solúveis das três colônias testadas. O retângulo vermelho indica as bandas de expressão. Foram aplicados 10 µL de solução proteica por raia.

Fonte: A autora.

A partir destes testes iniciais, foi possível concluir que as 3 colônias selecionadas expressavam igualmente a *SmGAPDH* e, a partir de umas delas, foram otimizadas as condições

de expressão na temperatura de 20 °C. Para isso, foram testadas as diferentes concentrações de IPTG com tempo de indução de 3, 6 e 16 h. Assim, após a otimização, definiu-se que a melhor condição para expressar a proteína foi em meio LB com 0,03 mg mL⁻¹ canamicina, 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG por 6 h de indução. O perfil eletroforético está apresentado na Figura 24.

Figura 24 - SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 20 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para a enzima *SmGAPDH*.



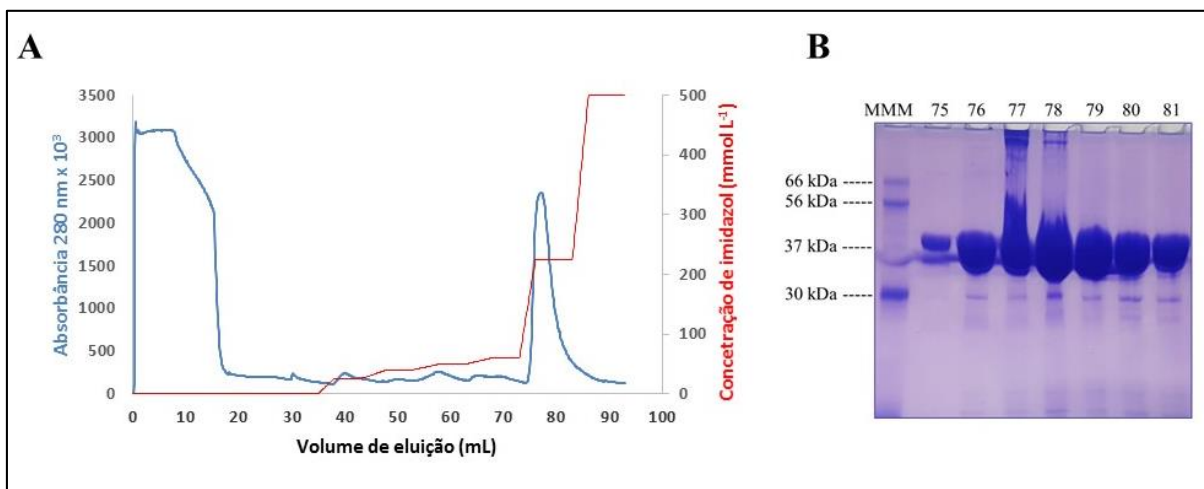
Legenda: MMM: Marcador de Massa Molecular; nas raias identificadas como 1 e 2 foram aplicadas amostras do extrato das bactérias BL21(DE3) não transformadas e não induzidas, respectivamente. Raias 3 e 4, fração insolúvel e solúvel, respectivamente. O retângulo vermelho indica as bandas de expressão.

Fonte: A autora.

2.4.1.3 Purificação por cromatografia de afinidade

No cromatograma da purificação por afinidade ao níquel, observaram-se 2 picos bem definidos e separados (Figura 25-A). Amostras referentes ao segundo pico (75 à 81) foram analisadas por SDS-PAGE (12%) (Figura 25-B), o qual revelou que a *SmGAPDH* foi eluída parcialmente pura com 194 à 225 mmol L⁻¹ de imidazol. Estas amostras foram reunidas e concentradas para os experimentos de cristalização. Estimou-se a pureza ao redor de 95% com o programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), a qual é considerada satisfatória para os experimentos de cristalização.

Figura 25 - (A) Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da *SmGAPDH* por cromatografia de afinidade. (B) Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.



Legenda: A) A linha azul representa a absorbância enquanto que a vermelha destaca a concentração de imidazol. B) MMM: Marcador de Massa Molecular; os números acima das amostras correspondem às frações obtidas na cromatografia. Foram aplicados 10 μL de solução proteica por raia.
Fonte: A autora.

2.4.1.4 Cristalização da *SmGAPDH*

Nos ensaios de cristalização com as soluções dos kits comerciais, observou-se a formação de cristais em 6 condições do kit Morpheus, 3 condições do kit JCSG e 2 condições do kit Midas. Estas condições estão descritas na tabela abaixo (Tabela 8).

Tabela 8 - Condições em que se obtiveram cristais da *SmGAPDH*.

Núm. da condição	Composição
	Kit Morpheus
8	0,06 mol L ⁻¹ Cátions divalentes, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 2 pH 7,5, 37,5 % V/V Precipitante Mix 4.
9	0,06 mol L ⁻¹ Cátions divalentes, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 3 pH 8,5, 20% V/V PEG 500MME e 10% m/V PEG 20000.
25	0,09 mol L ⁻¹ NPS, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 1 pH 6,5, 20% V/V PEG 500MME e 10% m/V PEG 20000.
29	0,09 mol L ⁻¹ NPS, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 2 pH 7,5, 20% V/V PEG 500MME e 10% m/V PEG 20000.
30	0,09 mol L ⁻¹ NPS, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 2 pH 7,5, 20% V/V Etilenoglicol e 10% m/V PEG 8000.
42	0,12 mol L ⁻¹ Álcoois, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 2 pH 7,5, 20% V/V Etilenoglicol e 10% m/V PEG 8000.
49	0,12 mol L ⁻¹ Etilenoglicóis, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 1 pH 6,5, 20% V/V PEG 500MME e 10% m/V PEG 20000.
51	0,12 mol L ⁻¹ Etilenoglicóis, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 1 pH 6,5, 20% V/V Glicerol e 10% m/V PEG 40000.
73	0,1 mol L ⁻¹ Ácidos carboxílicos, 0,1 M Solução tampão 1 pH 6,5, 20% V/V PEG 500MME e 10% m/V PEG 20000.
77	0,1 mol L ⁻¹ Ácidos carboxílicos, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 2 pH 7,5, 20% V/V PEG 500MME e 10% m/V PEG 20000.
85	0,1 mol L ⁻¹ Aminoácidos, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 1 pH 6,5, 10% V/V PEG 500MME e 20% m/V PEG 20000.
87	0,12 mol L ⁻¹ Aminoácidos, 0,1 mol L ⁻¹ Solução tampão 1 pH 6,5, 20% V/V Glicerol e 10% m/V PEG 4000.
	Kit JCSG
7	20 % w/V PEG 8000, 0,1 mol L ⁻¹ CHES pH 9,5.
10	20% w/V PEG 3350 e 0,2 mol L ⁻¹ Formato de potássio.
12	20% w/V PEG 3350 e 0,2 mol L ⁻¹ Nitrato de potássio.
	Kit MIDAS
34	30% V/V Etoxilato de pentaeritritol (15/4), 6% w/V Polivinilpirrolidona k15, 0,1 mol L ⁻¹ Hepes pH 7,5.
79	30% V/V Etoxilato de glicerol, 0,1 mol L ⁻¹ Mes pH 6,5, 0,2 mol L ⁻¹ Acetato de amônio.

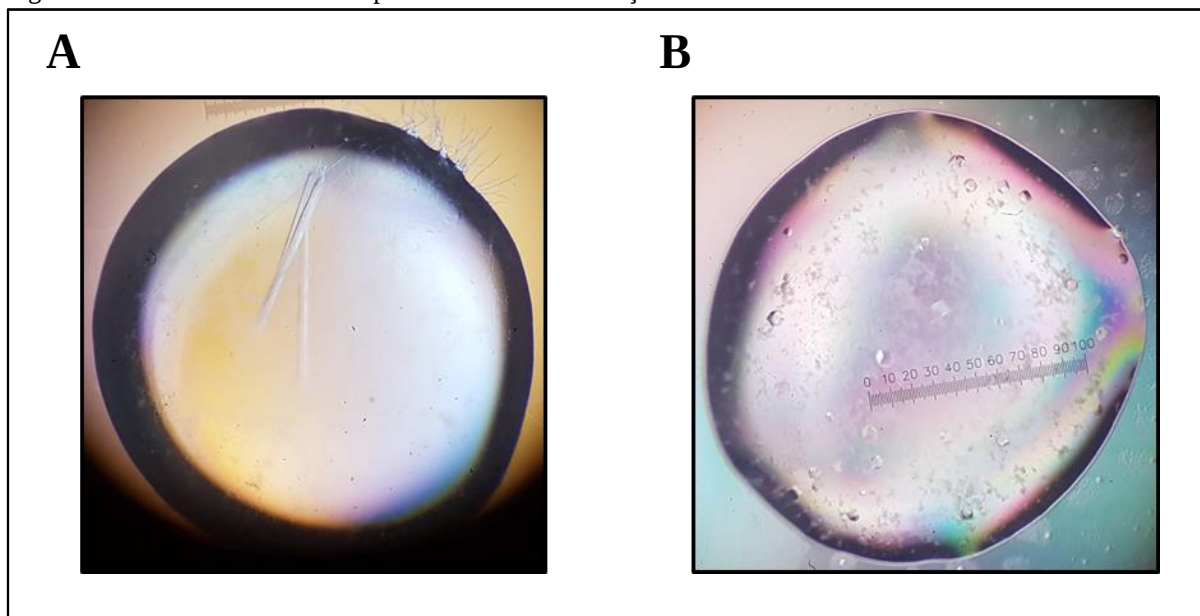
Legenda: A numeração em destaque (negrito) indica as condições que tiveram cristais selecionados para serem encaminhados à estação experimental PROXIMA-1, Síncrotron Soleil. NPS, solução contendo nitrato de sódio, hidrogenofosfato dissódico e sulfato de amônio, PEG MME, éter monometílico de polietileno glicol. Detalhes e composição de todas as soluções do kit Morpheus são encontradas em Gorrec (2009).

Fonte: A autora.

Foram selecionados 4 cristais representativos das condições 87 e 79 (Figura 26), armazenados em nitrogênio líquido e encaminhados à estação experimental PROXIMA-1 do síncrotron Soleil (devido à indisponibilidade de equipamento de síncrotron para coleta de dados

de difração de monocristais no Brasil neste período). Por motivos desconhecidos, estes cristais chegaram ao local da coleta ressecados.

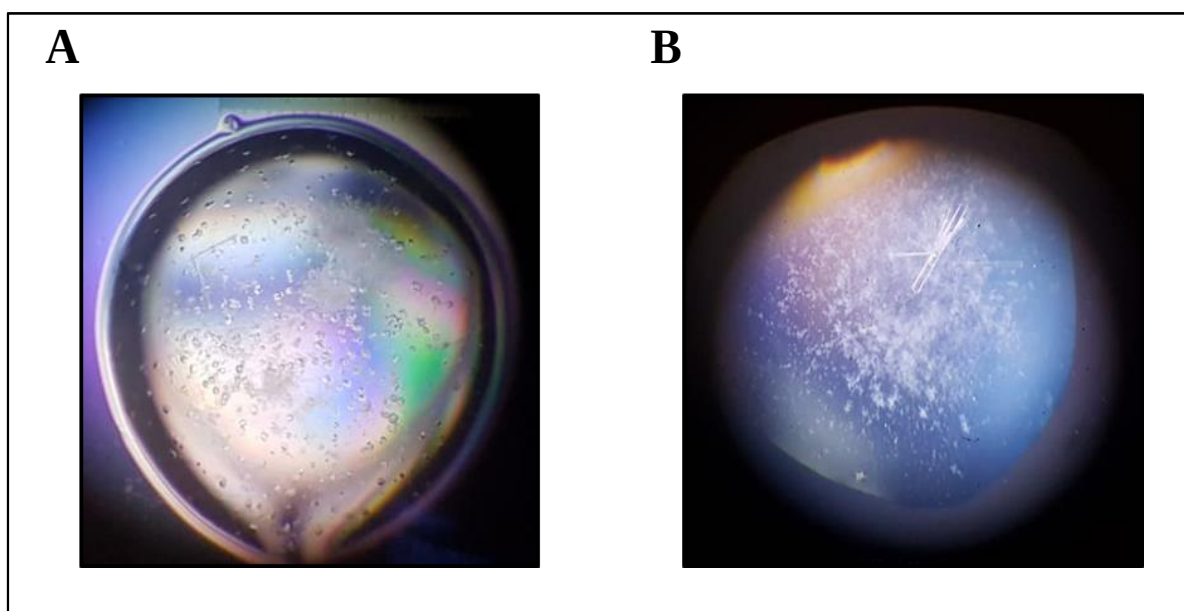
Figura 26 - Cristais obtidos nos experimentos de cristalização.



Legenda: A) Cristais obtidos com a utilização do kit Morpheus – condição 87, citada na Tabela 8. B) Cristais obtidos com a utilização do kit Midas – condição 79, citada na Tabela 8. Enzima *SmGAPDH* a 10 mg mL^{-1} .
Fonte: A autora.

Em uma segunda oportunidade, 5 cristais representativos das condições 42 (Figura 27-A), 51 (Figura 27-B) e 79 (Figura 26-B) foram novamente armazenados em nitrogênio líquido e encaminhados à estação experimental PROXIMA-1 do síncrotron Soleil.

Figura 27- Cristais obtidos nos experimentos de cristalização.



Legenda: A) Cristais obtidos com a utilização do kit Morpheus – condição 42, citada na Tabela 8. B) Cristais obtidos com a utilização do kit Morpheus – condição 51, citada na Tabela 8. Enzima *SmGAPDH* a 10 mg mL⁻¹. Fonte: A autora.

O cristal da Figura 27-B (condição 51) possibilitou a coleta de um conjunto completo de dados de difração de raios X.

2.4.2 Procedimentos computacionais

2.4.2.1 Determinação da estrutura por difração de raios X

2.4.2.1.1 Coleta de dados e processamento das imagens

Para o cristal da Figura 27-B foram obtidas 3600 de imagens de difração, que foram processadas a 2,51 Å de resolução. O cristal pertence ao grupo de espaço $P6_1$, com parâmetros de cela $a = 80,12$, $b = 80,12$, $c = 417,02$ Å. A unidade assimétrica contém um tetrâmero de massa molecular total 143548 Da, consequentemente, o coeficiente de Matthews (MATTHEWS, 1968) calculado foi 2,35 Å³/Da, com teor de solvente de 47,6%.

O corte de resolução em 2,51 Å foi realizado com base nos valores dos índices de completude, relação sinal/ruído $\langle I/\sigma(I) \rangle$, R_{merge} , R_{meas} e, principalmente, $CC_{1/2}$ (EVANS; MURSHUDOV, 2013). A Tabela 9 traz as estatísticas do processamento e refinamento dos dados de difração do cristal obtido.

Tabela 9 - Dados estatísticos do processamento e refinamento.

Dados do Processamento	
Parâmetros do cristal	
Grupo de espaço	$P6_1$
Dimensões da cela unitária	
a, b, c (Å)	80,12, 80,12, 417,02
Dados de coleta	
Faixa de resolução (Å)	420,0 - 2,51 (2,57-2,51)
Nº. total de reflexões	1108365 (72393)
Nº. de reflexões únicas	51375 (3513)
R_{merge}	16,8 (258,9)
Média [$I/\sigma(I)$]	14,35 (1,13)
Completeza (%)	100,0 (99,9)
$CC_{1/2}$	99,9 (50,1)
Multiplicidade	21,57 (20,59)
Dados do Refinamento	
R_{work}	0,2132
R_{free}	0,2726
Fração de geminação para h,-h-k,-l	0,080
Desvio Médio Quadrático	
Comprimentos de ligação (Å)	0,004
Ângulos de ligação (°)	0,799
Fator B médio (Å ²)	
Global	74,032
Macromoléculas	74,331
Solvente	57,369
Ligantes	63,100
Gráfico de Ramachandran (%)	
Favoráveis	84,7
Adicionalmente permitidas	14,4
Generosamente permitidas	0,5
Não permitidas	0,4

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

Fonte: A autora.

2.4.2.1.2 Faseamento inicial por substituição molecular

A proteína escolhida para produzir o modelo para substituição molecular foi a GAPDH de *Brugia malayi* (77,74 % de identidade de sequencial e 98% de similaridade), código PDB 4K9D (FAIRMAN et al., 2013). O alinhamento utilizado como entrada para o programa *Chainsaw* está apresentando na Figura 28.

Figura 28- Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima SmGAPDH com a da proteína mais similar disponível no PDB (BmGAPDH).

SmGAPDH	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45																																									
	M	S	R	A	K	V	G	I	N	G	F	G	R	I	G	R	L	V	L	R	A	A	F	L	K	N	T	V	D	V	V	S	V	N	D	P	F	I	D	L	E	Y	M	V	Y	M	I	K	R		49
4K9D	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45																																									
	M	S	K	P	K	V	G	I	N	G	F	G	R	I	G	R	L	V	L	R	A	A	V	E	K	D	T	V	D	V	V	A	V	N	D	P	F	I	N	I	D	Y	M	V	Y	M	F	K	Y		49
SmGAPDH	50	55	60	65	70	75	80	85	90																																										
	D	S	T	H	G	I	F	P	G	E	V	S	T	E	N	G	K	L	K	V	.	N	G	K	L	.	.	I	S	V	H	C	E	R	D	P	A	N	I	P	W	D	K	D	G	A	E	Y		94	
4K9D	50	55	60	65	70	75	80	85	90																																										
	D	S	T	H	G	R	F	K	G	S	V	S	A	E	G	G	K	L	I	V	T	N	G	K	T	T	H	I	S	V	H	N	S	K	D	P	A	E	I	P	W	G	V	D	G	A	E	Y		98	
SmGAPDH	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140																																									
	V	V	E	S	T	G	V	F	T	T	I	D	K	A	Q	A	H	I	K	N	N	R	A	K	K	V	I	S	A	P	S	A	D	A	P	M	F	V	V	G	V	N	E	N	S	Y	E	K		143	
4K9D	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145																																									
	V	V	E	S	T	G	V	F	T	T	I	D	K	A	S	A	H	L	K	G	G	.	A	K	K	V	I	S	A	P	S	A	D	A	P	M	F	V	M	G	V	N	D	T	Y	D	K		146		
SmGAPDH	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190																																									
	S	M	S	.	V	V	S	N	A	S	C	T	T	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I	H	D	K	F	E	I	V	E	G	L	M	T	T	V	H	S	F	T	A	T	Q	K	V	D	G		191	
4K9D	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195																																									
	A	N	N	H	I	I	S	N	A	S	C	T	T	N	C	L	A	P	L	A	K	V	I	H	D	K	F	G	I	I	E	G	L	M	T	T	V	H	A	T	A	T	Q	K	T	V	D	G		195	
SmGAPDH	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240																																									
	P	S	S	K	L	W	R	D	G	R	G	A	M	Q	N	I	I	P	A	S	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V	I	P	A	L	N	G	K	L	T	G	M	A	F	R	V	P	T	P	D		240
4K9D	200	205	210	215	220	225	230	235	240																																										
	P	S	G	K	L	W	R	D	G	R	G	A	G	Q	N	I	I	P	A	S	T	G	A	A	K	A	V	G	K	V	I	P	D	L	N	G	K	L	T	G	M	A	F	R	V	P	T	P	D		244
SmGAPDH	245	250	255	260	265	270	275	280	285																																										
	V	S	V	D	L	T	C	R	L	K	G	A	S	Y	E	E	I	K	A	A	V	K	A	A	A	S	G	P	L	K	G	I	L	E	Y	T	E	D	E	V	V	S	S	D	F	V	G		289		
4K9D	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290																																									
	V	S	V	D	L	T	C	R	L	K	G	A	T	M	D	E	I	K	A	A	V	K	E	A	A	A	G	P	M	K	G	I	L	E	Y	T	E	D	Q	V	V	S	T	D	F	T	G		293		
SmGAPDH	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335																																									
	S	T	S	S	I	F	D	A	K	A	G	I	S	L	N	N	N	F	V	K	L	V	S	W	Y	D	N	E	F	G	Y	S	C	R	V	D	L	I	T	H	M	H	K	V	D	H	A		338		
4K9D	295	300	305	310	315	320	325	330	335																																										
	D	T	H	S	I	F	D	A	L	A	C	I	S	L	N	P	N	F	V	K	L	I	A	W	Y	D	N	E	Y	G	Y	S	N	R	V	D	L	I	S	Y	I	A	S	R	.	.	.		339		

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

2.4.2.1.3 Modelagem e refinamento

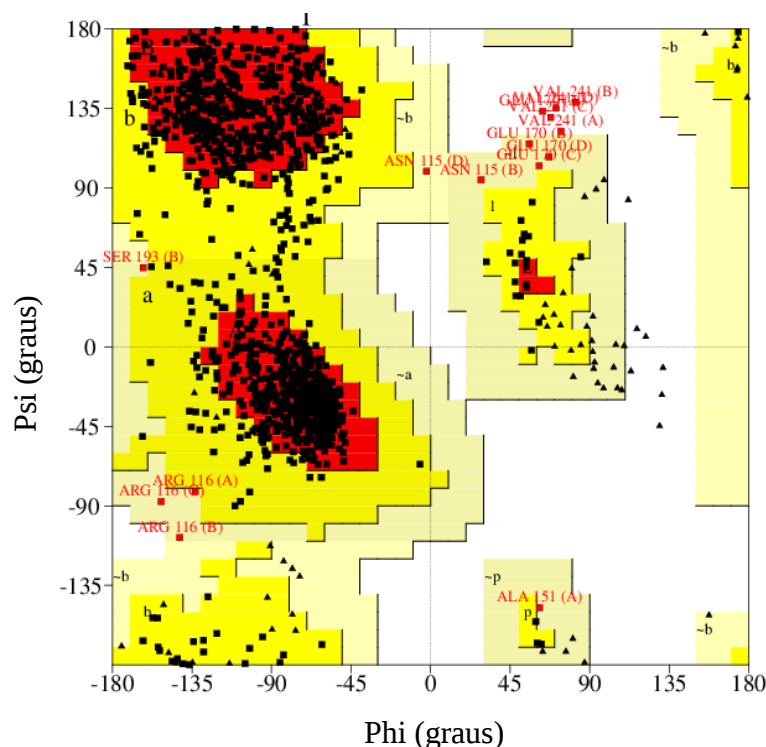
Após a substituição molecular, realizou-se um refinamento de corpo rígido, seguido de um *annealing* e vários ciclos de construção manual. Todos os ciclos de refinamento foram realizados levando-se em consideração a operação de geminação (h,-h-k,-l).

Durante a modelagem/refinamento, verificou-se que a qualidade da densidade eletrônica em várias porções das cadeias A e B é superior à das cadeias C e D (ver abaixo). No modelo final, 123 resíduos tiveram suas cadeias laterais não completamente modeladas devido à ausência de densidade eletrônica convincente.

2.4.2.1.4 Validação do modelo final

O resultado do programa Procheck no tocante aos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) está representado no gráfico de Ramachandran (Figura 29). Dos 1344 aminoácidos analisados, 83,6% estão em regiões mais favoráveis, 15,2% nas regiões adicionalmente permitidas, 0,8% nas regiões generosamente permitidas e 0,4% em regiões não permitidas.

Figura 29 - Gráfico de Ramachandran da estrutura da SmGAPDH.



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

Fonte: A autora.

Val241 e Glu170 estão nas regiões não permitidas ou generosamente permitidas do gráfico Ramachandran, mas observa-se que, em todos os monômeros, a densidade eletrônica corrobora suas conformações. Val241 é um resíduo conservado nas GAPDH's e comumente encontrado nessa conformação. Glu170 é um resíduo pouco conservado e encontrado em apenas 5 estruturas de GAPDH disponíveis no PDB, que são de apenas 2 organismos: *Homarus americanus* - ID do PDB: 4GPD e 1GPD (MORAS et al., 1975; MURTHY et al., 1980) e *Panulirus versicolor* - ID do PDB: 1CRW, 1IHX e 1DSS (SHEN et al., 2000; SHEN; SONG; LIN, 2002; SONG et al., 1999). Sugere-se que, quando há a mutação da glicina em um glutamato, os valores dos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) sejam mantidos, apesar da tensão extra para o último. Em outras estruturas com um glutamato nessa posição, os resíduos estão na região não permitidas ou próximos desta no gráfico de Ramachandran. Uma exceção à conservação da glicina nessa posição é a estrutura de *Atopobium vaginae* - PDB ID: 5LD5 (QUEROL-GARCÍA et al., 2017), que apresenta um Prolina nessa posição.

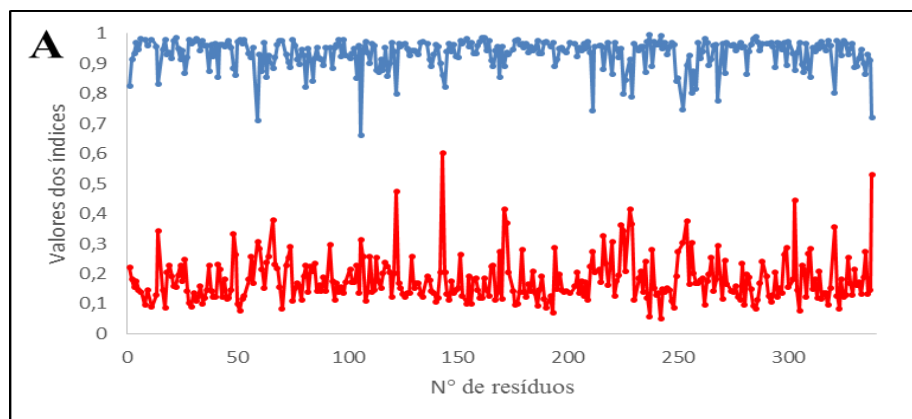
Para se estimar o ajuste da estrutura à densidade eletrônica, realizaram-se cálculos dos índices RSCC e RSR para cada monômero e resíduo, mostrados na Tabela 10 (por cadeia e global) e nos gráficos (por resíduo), mostrados na Figura 30 (A-D).

Tabela 10 - Valores de RSCC e RSR por cadeia e global.

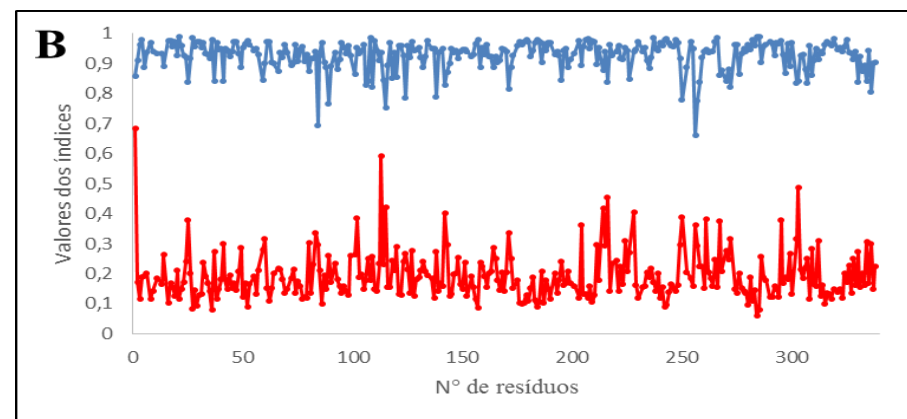
Cadeia	RSCC	RSR
A	0,9335	0,1400
B	0,9214	0,1445
C	0,9220	0,1480
D	0,9237	0,1429
Todas as cadeias	0,9271	0,1448

Fonte: A autora.

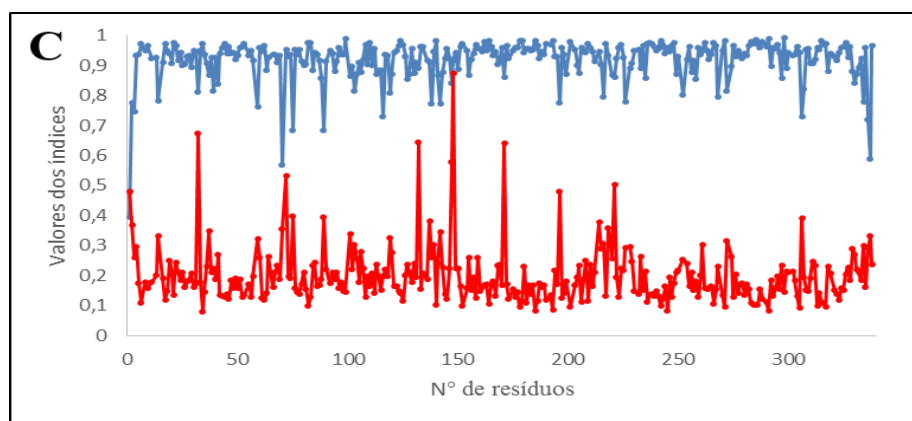
Figura 30 - Qualidade do ajuste na densidade eletrônica representada em gráficos por cadeia e por resíduo.



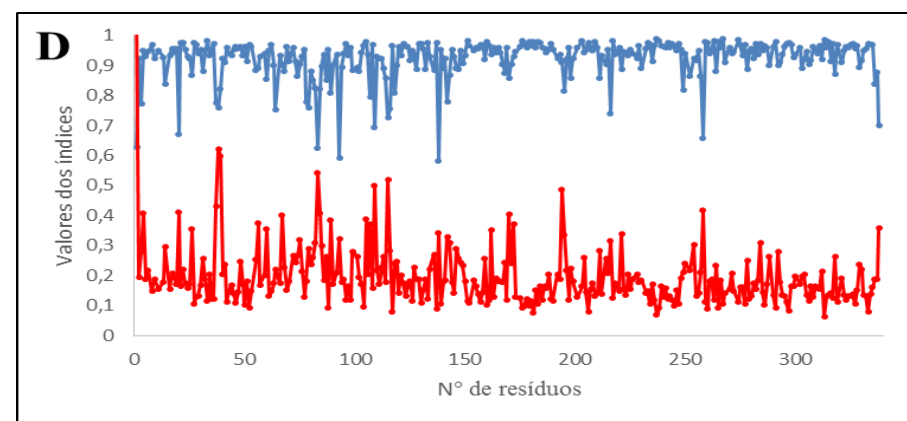
(A) monômero A



(B) monômero B



(C) monômero C



(D) monômero D

Fonte: A autora.

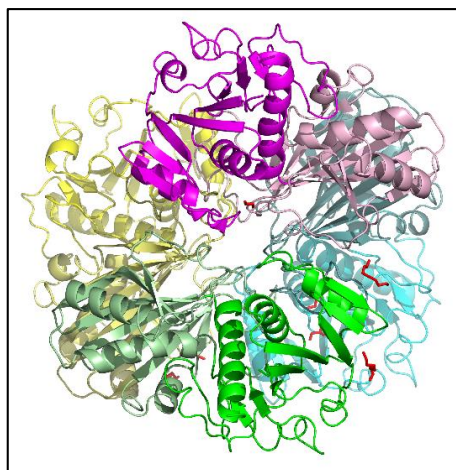
A validação realizada pelo programa Molprobit (CHEN et al., 2010) foi específica para verificação da normalidade dos rotâmeros. Vários deles (42 no total) não estão apontados entre os mais comuns. Ressalta-se que em vários dos casos optou-se por retirar as restrições geométricas de ângulos diédricos para que pudessem se ajustar adequadamente à densidade eletrônica.

2.4.2.2 Análises e comparações estruturais

2.4.2.2.1 Estrutura da *Sm*GAPDH e topologia

*Sm*GAPDH cristalizou como homotetrâmero na unidade assimétrica (Figura 31) e cada monômero pode ser dividido em domínios que envolvem os seguintes resíduos: 1–152 e 316–338 para domínio de interação com o NAD^+ e 153–315 para o domínio catalítico, de acordo com o resultado do alinhamento sequencial com a estrutura da GAPDH de *Homo sapiens* PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006).

Figura 31 – Estrutura tridimensional da *Sm*GAPDH.



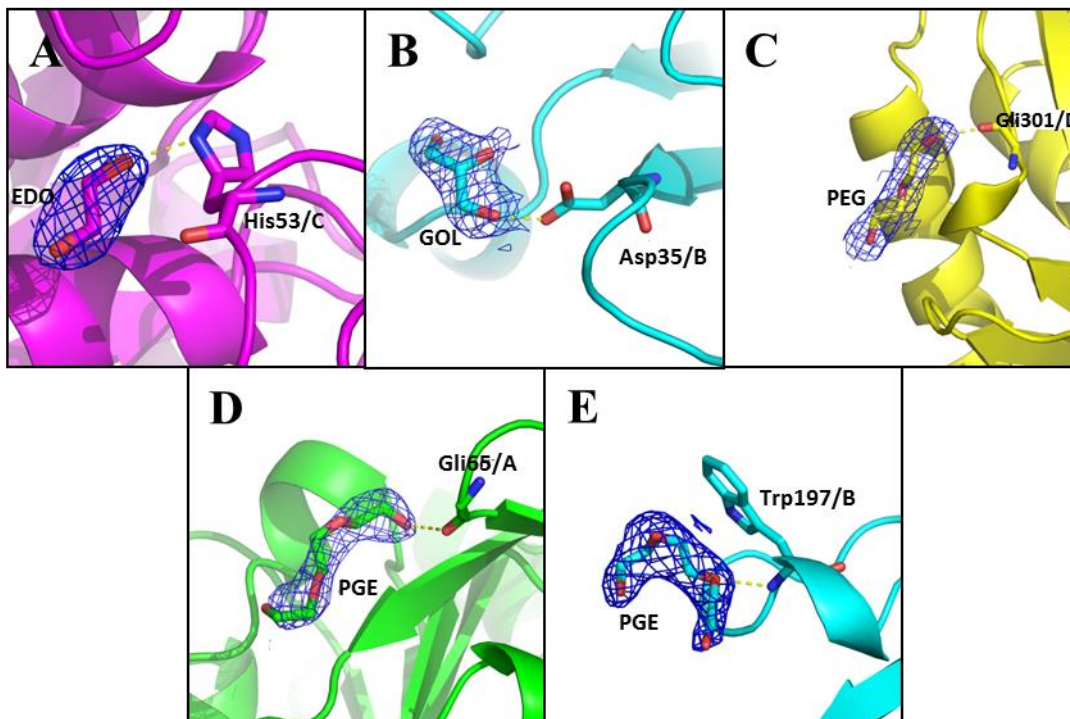
Legenda: Monômero A em verde, monômero B em ciano, monômero C em magenta e monômero D em amarelo; o domínio de ligação do NAD^+ está em um tom mais claro; moléculas ligantes (especificadas logo abaixo) estão representadas como bastões vermelhos.

Fonte: A autora.

O modelo final apresenta uma molécula de etileno glicol (EDO) fazendo ligação de hidrogênio com a His53 do monômero C (Figura 32-A), duas moléculas de glicerol (GOL), uma fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo Asp35 no monômero B (Figura 32-B), duas moléculas de dietileno glicol (PEG), uma delas fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo

Gly301 no monômero D (Figura 32-C) e duas moléculas de trietileno glicol (PEG), fazendo ligações de hidrogênio com os resíduos Gly56 e Trp197 nos monômeros A e B, respectivamente (Figura 32-C e D).

Figura 32 - Densidade eletrônica para os ligantes modelados na estrutura da *SmGAPDH*.

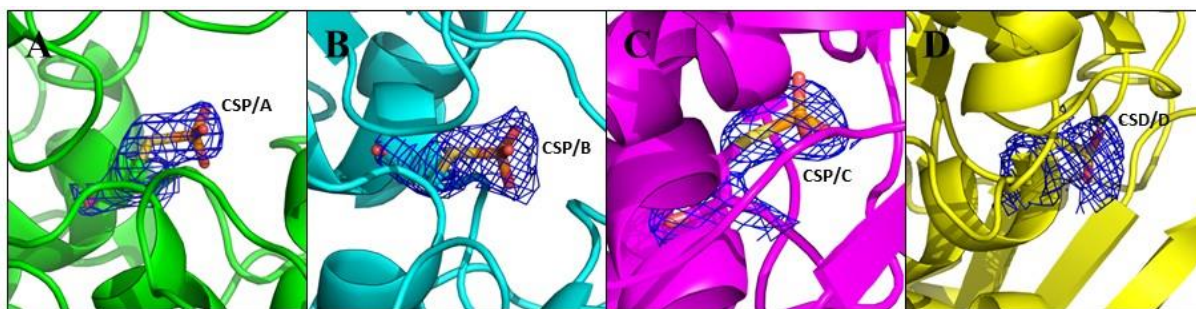


Legenda: (A) EDO fazendo ligação de hidrogênio com a His53 do monômero C. (B) GOL fazendo ligação de hidrogênio com a Asp35 do monômero B. (C) PEG fazendo ligação de hidrogênio com a Gly301 do monômero D. (D) PEG fazendo ligação de hidrogênio com a Gly55 do monômero A. (E) PEG fazendo ligação de hidrogênio com a Trp197 do monômero B. Os mapas são contornados: 2mFo-DFc, azul em 1 σ ; mFo-DFc, verde e vermelho, em +3 σ e -3 σ , respectivamente.

Fonte: A autora.

A densidade eletrônica indicou que os resíduos Cys153 (resíduos catalíticos) são oxidados em diferentes graus e modificações. Vários estudos foram realizados para obter um melhor ajuste na densidade de eletrônica e o modelo final contém S-fosfocisteína (CSP) nos monômeros A, B e C e 3-sulfinoalanina (CSD) no monômero D (Figura 33-A-D).

Figura 33 - Densidade eletrônica para cisteínas modificadas nos 4 monômeros da SmGAPDH.

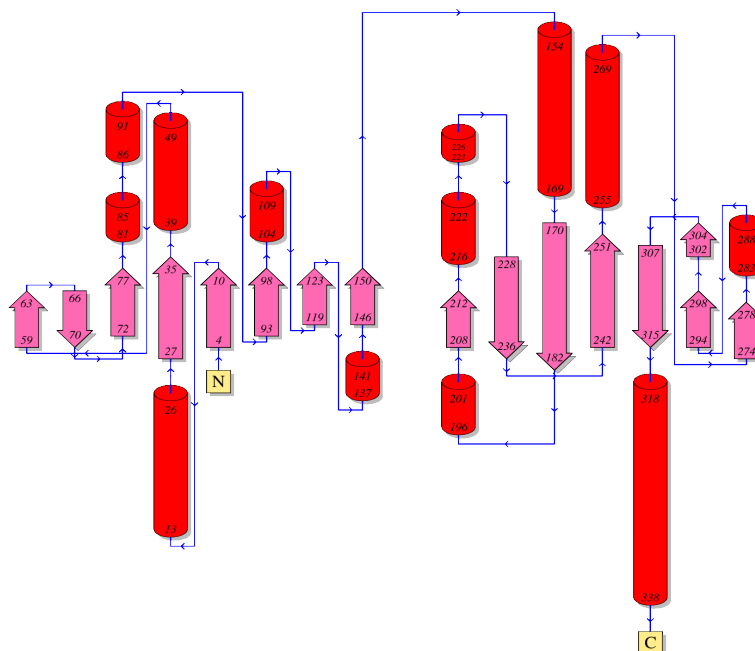


Legenda: (A) Monômero A. (B) Monômero B. (C) Monômero C. (D) Monômero D. Os mapas são contornados: 2mFo-DFc, azul em 1 σ ; mFo-DFc, verde e vermelho, em +3 σ e -3 σ , respectivamente.
Fonte: A autora.

Vários estudos relataram modificações na cisteína catalítica em GAPDH, em particular: i) cisteína carboximetilada (CCS) foi observada na estrutura de *Panulirus versicolor* - código PDB: 1DSS (SONG et al., 1999) e *Trypanosoma cruzi* - código PDB: 3DMT (GUIDO et al., 2009); ii) 3-sulfinoalanina (CSD) foi observada em estruturas de *Achromobacter xylosoxidans* - código PDB: 1OBF (ANTONYUK et al., 2003), *Rattus norvegicus* - código PDB: 2VYV (FRAYNE et al., 2009), *Mus musculus* - código PDB: 5C7I (DANSHINA et al., 2016), *Arabidopsis thaliana* - código PDB: 6QUN (ZAFFAGNINI et al., 2019), *Escherichia coli* - código PDB: 6UTN (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ; ROMO-ARÉVALO; RODRÍGUEZ-ROMERO, 2019), *Naegleria gruberi* - código PDB: 5UR0 (MACHADO; SILVA; IULEK, 2018) e *Thermus aquaticus* - código PDB: 2G82 (JENKINS; TANNER, 2006); iii) S-oxicisteína (CSX) foi observada nas estruturas *Oryctolagus cuniculus* - código PDB: 1J0X (COWAN-JACOB et al., 2003), iv) Ácido cisteinosulfônico (OCS, Figura) foi observado na estrutura de *Homo sapiens* - código PDB: 5C7L (DANSHINA et al., 2016) e *Naegleria gruberi* - código PDB: 5UR0 (MACHADO; SILVA; IULEK, 2018) e v) S-acetil-cisteína (SCY) foi observada na estrutura de *Escherichia coli* - código PDB: 4MVJ (KUHN et al., 2014).

A Figura 34 mostra o diagrama de topologia que explicita os elementos de estrutura secundária, produzido pela ferramenta PDBsum (LASKWOSKI, 2001). Os demais resultados obtidos (Tabela 11) indicaram que entre os monômeros A:B, C:D, A:C e B:D há maior área interfacial e maior número de ligações de hidrogênio, portanto, estes monômeros apresentam maior interação entre si do que com os demais monômeros.

Figura 34 - Diagrama de topologia para a estrutura da SmGAPDH.



Legenda: Os cilindros vermelhos representam as hélices- α , as setas rosas as fitas- β e as linhas azuis os loops. Figura gerada por meio da ferramenta PDBsum.

Fonte: A autora.

Tabela 11 - Áreas de interface entre os monômeros (A, B, C e D) correspondentes aos tetrâmero.

Monômeros	Nº de resíduos na interface	Área da Interface ($\text{\AA}^2$)	Nº de pontes salinas	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de contatos sem ligações
A : B	31 : 28	1377 : 1429	-	13	208
C : D	30 : 29	1390 : 1439	-	12	220
A : C	7: 8	429 : 402	3	5	36
B : D	7: 8	466 : 468	3	5	31
A : D	41 : 43	1954 : 1978	5	21	244
B : C	41 : 42	2002 : 1964	7	18	241

O símbolo ":" representa as inter-relações entre os monômeros, entre os resíduos e áreas de interface. Dados obtidos pela ferramenta PDBsum.

Fonte: A autora.

2.4.2.2.2 Análises e comparações entre monômeros e domínios da SmGAPDH

A superposição aos pares dos quatro monômeros de SmGAPDH não revelou diferenças estruturais significativas em suas conformações, como pode ser observado pelos valores de RMSD entre 0,446-0,586 $\text{\AA}$ para os átomos da cadeia principal (Tabela 12).

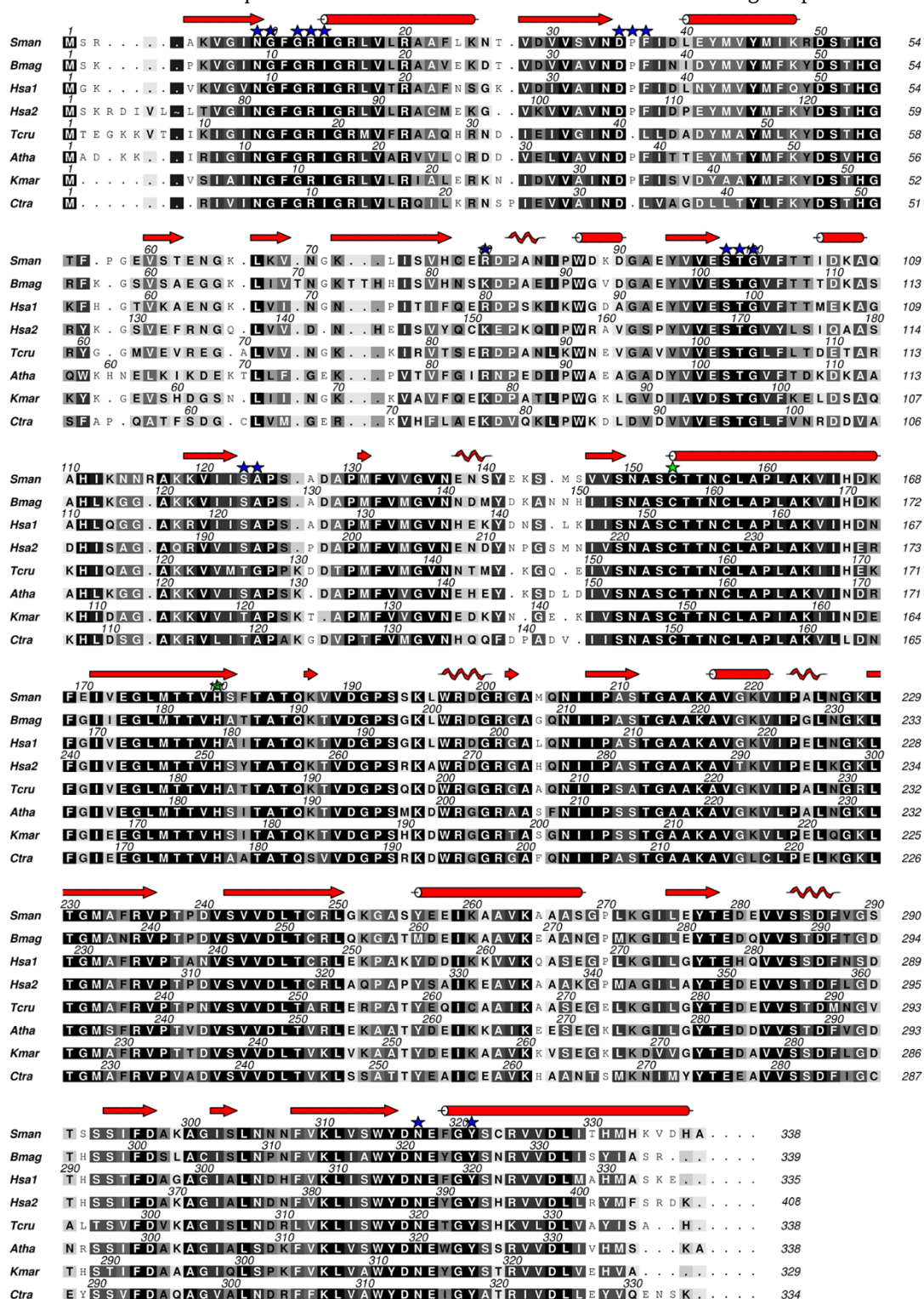
Tabela 12 - Valores de RMSD (Å) entre Ca²⁺s para os quatro monômeros da *Sm*GAPDH.

Monômero	D	C	B
A	0,478	0,517	0,459
B	0,567	0,599	-
C	0,536	-	-

Fonte: A autora.

2.4.2.2.3 Alinhamento das sequências e comparação com proteínas homólogas

As estruturas de GAPDH's selecionadas para o alinhamento sequencial foram as dos seguintes organismos: *Brugia malayi*, *Bmal* - PDB ID: 4K9D (FAIRMAN et al., 2013), *Homo sapiens*, somática, *Hsa1* - PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006), *Homo sapiens*, espermática, *Hsa2* - PDB ID: 3H9E (CHAIKUAD et al., 2011), *Trypanosoma cruzi*, *Tcru* - PDB ID: 4LSM (EDWARDS; ABENDROTH, 2013), *Arabidopsis thaliana*, *Atha* - PDB ID: 4Z0H (ZAFFAGNINI et al., 2016), *Kluyveromyces marxianus*, *Kmar* - PDB ID: 2I5P (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2006) e *Chlamydia trachomatis*, *Ctra* - PDB ID: 6OK4 (BARRETT et al., 2020). 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, a sequência desta foi truncada entre os resíduos 9-75. A Figura 35 mostra o alinhamento e a Tabela 13 os valores de RMSD da sobreposição entre Cas e a porcentagem de identidade sequencial.

Figura 35 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da *SmGAPDH* com as homólogas representativas.

Legenda: Estrelas azuis indicam os resíduos equivalentes a *Bmag* 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 *SmGAPDH*. Os resíduos 9 a 75 de *Hsa2* são representados por uma marca de til (~).

Fonte: A autora.

Tabela 13 - Valores de RMSD entre C α 's referentes à sobreposição de SmGAPDH com as estruturas de *Brugia malayi* (código PDB 4K9D), *Homo sapiens* 1 (código PDB 1U8F) e *Homo sapiens* 2 (código PDB 3H9E), *Trypanosoma cruzi* (código PDB 4LSM), *Arabidopsis thaliana* (código PDB 4Z0H), *Kluyveromyces marxianus* (código PDB 2I5P) e *Chlamydia trachomatis* (código PDB 6OK4).

Organismo / Código PDB	RMSD(Å) / N. de resíduos envolvidos
<i>Brugia malayi</i> / 4K9D	0,598 / 331
<i>Homo sapiens</i> 1 / 1U8F	0,615 / 331
<i>Homo sapiens</i> 2 / 3H9E	0,802 / 328
<i>Trypanosoma cruzi</i> / 4LSM	0,764 / 324
<i>Arabidopsis thaliana</i> / 4Z0H	0,797 / 327
<i>Kluyveromyces marxianus</i> / 2I5P	1,170 / 298
<i>Chlamydia trachomatis</i> / 6OK4	1,047 / 326

Fonte: A autora.

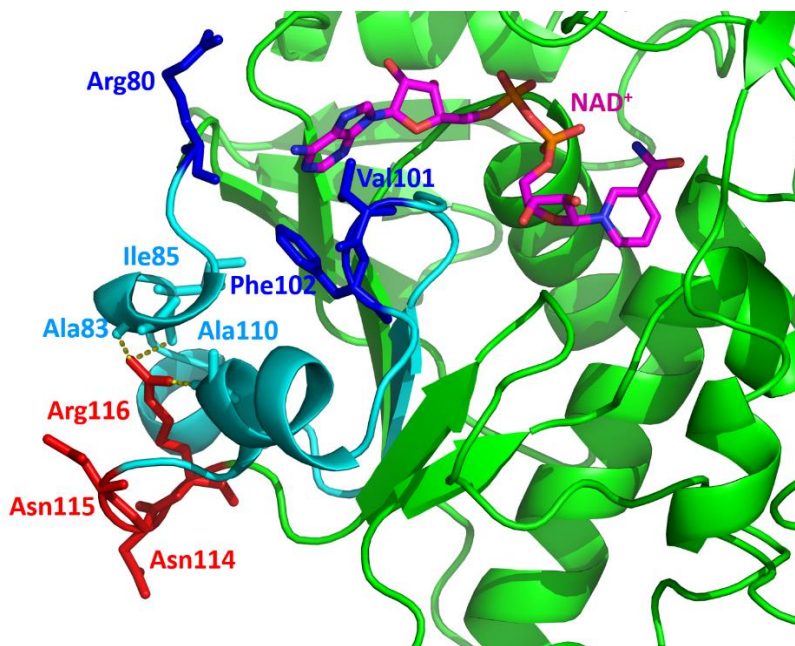
Em geral, todas as estruturas GAPDH são semelhantes, com algumas diferenças nos elementos secundários da estrutura; o RMSD entre seus C α vsi de 0,615 (*B. malayi*) a 1,170 Å (*K. marxianus*), para um mínimo de 298 resíduos sobrepostos.

Como pode ser observado no alinhamento (Figura 35), apenas a GAPDH de *Schistosoma mansoni* (Sman) apresenta a sequência NNR em sua região 114-116. Como essa sequência substitui pelo menos uma Glicina conservada em todas as estruturas, decidiu-se estudar mais esta característica única. Após a pesquisa e alinhamento sequencial com todas as estruturas de GAPDH atualmente disponíveis (total 122) no Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000), notamos que a sequência NNR de SmGAPDH se alinha sistematicamente contra GG-, AG-, TG- ou NG- (alinhamento não mostrado); portanto, confirmamos a presença constante de Glicina nas outras estruturas/seqüências e observamos que Arg116 é praticamente única para SmGAPDH, sendo encontrado apenas em duas GAPDH's de baixa similaridade (GAPDH de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus pyogenes*) e mesmo nesses dois casos com uma lacuna, a falta de uma Asparagina.

As densidades eletrônicas para esses resíduos (114-116) na estrutura de SmGAPDH apresentam diferentes graus de desordem (provavelmente esperado uma vez que nessa região normalmente são encontradas Glicinas), mas a maioria dos átomos da cadeia principal pôde ser modelada, especialmente para os monômeros A e B, em que a densidade eletrônica é melhor. Além disso, para esses monômeros, as Arg116's parecem se ajustar razoavelmente bem na densidade eletrônica, embora sejam identificadas como *outliers* de rotâmeros, provavelmente explicados pelas interações das ligações de hidrogênio que elas fazem. Apesar disso, dos melhores esforços de modelagem, alguns desses resíduos estão fora das regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran ou até se apresentam como *outliers* de rotâmeros. Optou-se por não

impor restrições extras durante o refinamento, considerando a presença geral de glicinas nessa região nas homólogas; no entanto, em geral, os monômeros A e B foram usados como base para modelar essa região nos outros monômeros. A Figura 36 ilustra essa característica estrutural exclusiva da *Sm*GAPDH e mostra as ligações de hidrogênio da Arg116 no monômero A.

Figura 36 - Conformação dos resíduos 114-116 e ligações de hidrogênio entre Arg116 com Ala83, Ile85 e Ala110 no monômero A.



Legenda: A molécula NAD^+ é apresentada na posição correspondente à da estrutura de GAPDH de *Homo sapiens*, PDB ID: 1U8F (JENKINS; TANNER, 2006). Resíduos em azul foram anteriormente indicados como importantes para planejamento de inibidores diferenciais. Resíduos em ciano incluem os envolvidos nas ligações de hidrogênio com R116 e compreendem duas hélices cujos terminais levam à resíduos que fazem contato com a porção adenina, especulados como de importância para o desenho de inibidores diferenciais.

Fonte: A autora.

Curiosamente, Arg116 estabelece, através de sua cadeia lateral, ligações de hidrogênio com as carbonilas dos resíduos Ala83, Ile85 e Ala110, que pertencem ou adjazem a duas hélices curtas, 82-84 e 105-112, esta última levando à hélice que compreende os resíduos 114-116, representados na Figura 36 (para o monômero A). Nas extremidades (N-terminal) dessas hélices conectadas por essas ligações de hidrogênio, há os resíduos 80 e 101-102, apontados anteriormente por Suresh et al. (2001) como a serem explorados para o desenho diferencial de drogas contra GAPDH's de parasitas. No alinhamento (Figura 36), esses resíduos são conservados entre a *Sm*GAPDH e as GAPDHs humanas, no entanto, deve-se observar um possível efeito que a mutação dos resíduos de glicina na região 114-116 para resíduos não tão flexíveis (NNR), acrescido a esta ligação extra (através de ligações de hidrogênio da cadeia lateral da Arg116) entre essas hélices, pode impor à capacidade das interações dos resíduos

citados à porção adenina do NAD^+ e como isso pode ser explorado, no que diz respeito à mobilidade das cadeias laterais, para a interação diferencial com inibidores a serem planejados. Estudos por dinâmica molecular poderiam trazer mais informações quanto à exploração desta característica no desenho diferencial de inibidores.

2.5 CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada nas etapas de expressão e purificação permitiu obter a enzima *SmGAPDH* de maneira satisfatória, provendo quantidade suficiente da enzima solúvel para realizar os ensaios de cristalização;
- Um dos cristais forneceu um conjunto de imagens de difração de raios X que permitiu o refinamento da estrutura à resolução de 2,51 Å;
- A comparação da *SmGAPDH* com proteínas homólogas revelou que os resíduos NNR (114-116) são únicos na GAPDH de *Schistosoma mansoni* e o resíduo Arg116 faz algumas ligações de hidrogênio que une hélices em cujas extremidades estão resíduos que podem ser explorados para o desenho diferencial de inibidores;
- A estrutura da *SmGAPDH* foi depositada no PDB (código: 7JH0), a qual eventualmente poderá ser utilizada para o desenho de inibidores numa primeira etapa para divisar tratamentos para a esquistossomose;
- Este trabalho foi submetido a uma revista especializada e esta sob revisão.

CAPÍTULO 3 - GLICOSE-6-FOSFATO-1-EPIMERASE DE *Naegleria gruberi* (NgG6P-1E)

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 *Naegleria fowleri* e *Naegleria gruberi*: Aspectos Gerais

Os protozoários *Naegleria fowleri* e *Naegleria gruberi* são amebas onipresentes de vida livre, que podem ser encontradas no solo e em fontes de água doce; eles prosperam em temperaturas quentes (FURTON, 1970; MARCIANO-CABRAL, 1988).

A *Naegleria fowleri*, patogênica a seres humanos, é responsável pelo desenvolvimento da Meningoencefalite Amebiana Primária (PAM) (JOHN, 1982), infecção que ocorre quando as amebas presentes na água são aspiradas, normalmente durante natação, e migram para o cérebro através do neuroepitélio olfativo ganhando entrada no sistema nervoso central (SHAKOOR et al., 2011). Mais recentemente, a infecção foi associada a práticas religiosas e culturais (SIDDIQUI; KHAN, 2014) e, em alguns casos, com procedimentos de irrigação nasal com água contaminada (YODER et al., 2012). Dentre os sinais e sintomas estão: febre, dor de cabeça, anorexia, náuseas, vômito e irritação meníngea. Dependendo do estado fisiológico do hospedeiro, essa doença pode levar à morte em aproximadamente 72h após o início dos sintomas (JOHN, 1982).

Desde sua descoberta em 1965 por Malcolm Fowler e Rodney F. Carter na Austrália, essa doença foi relatada em mais de 16 países, sendo os Estados Unidos o país com o maior número de casos documentados da PAM (YODER et al., 2010), onde entre 1962 e 2018 foram reportados 145 casos com apenas 4 sobreviventes, o que significa que a infecção tem uma taxa de mortalidade de quase 98% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). O medicamento de escolha para o tratamento da PAM é o antibiótico Anfotericina B (AmB), eficaz desde que o tratamento seja iniciado cedo (KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017), entretanto, nos últimos 5 anos, a terapia baseia-se na combinação de AmB com Miltefosina, embora não esteja realmente clara a eficiência desta combinação (BAIG; KHAN, 2015). As aplicações clínicas da AmB, no entanto, são limitadas por sua nefrotoxicidade e por seus vários outros efeitos colaterais agudos (BAGINSKI; CZUB, 2009).

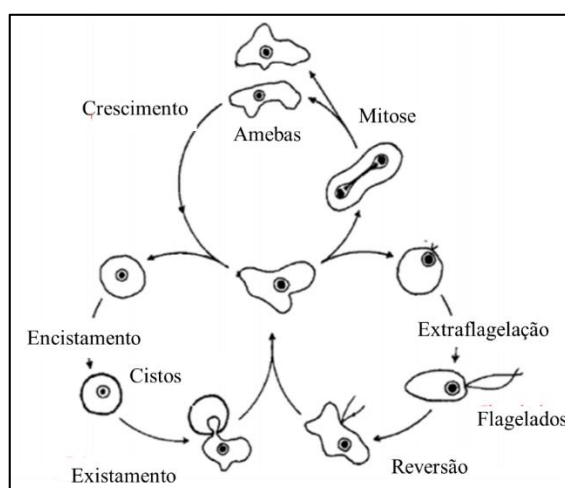
Diante do exposto, fica clara a necessidade da descoberta de novos medicamentos para a cura da PAM. Segundo Bellini et al., (2018), a abordagem destes estudos e pesquisas pode

partir de testes com medicamentos com mecanismos de ação já conhecidos e que possuem a atividade amebicida.

A *Naegleria gruberi* é um protozoário não patogênico que teve seu genoma sequenciado por Fritz-Laylin em 2010 (FRITZ-LAYLIN et al., 2010). Foi estudada inicialmente como modelo de transformação de fases, pois transforma-se facilmente em flagelados (BEXKENS et al., 2018). Devido ao fato de atualmente a *N. gruberi* continuar sendo uma das poucas Excavatas de vida livre com genoma completo sequenciado, esta espécie é utilizada como ponto de amostragem chave para o estudo da evolução eucariótica e é potencialmente um sistema modelo útil para o estudo da biologia celular eucariótica fora dos animais, levedura e plantas (HERMAN et al., 2018).

No ciclo de vida dos gêneros de *Naegleria spp.* (Figura 37) há primazia da forma ameboide, com tamanho aproximado de 15 µm, capaz de se alimentar de bactérias e se reproduzir a cada 1,6h (FRITZ-LAYLIN et al., 2010). Quando as amebas são transferidas de um ambiente de crescimento para o solo ou a um líquido sem nutrientes, elas se transformam rapidamente na forma flagelada, a qual auxilia na locomoção para um local mais favorável. Os flagelados são temporários, incapazes de se alimentar e, eventualmente, reverterem-se para a forma de amebas (FULTON, 1977).

Figura 37 - Ciclo de vida de *Naegleria spp.*



Fonte: FURTON (1970).

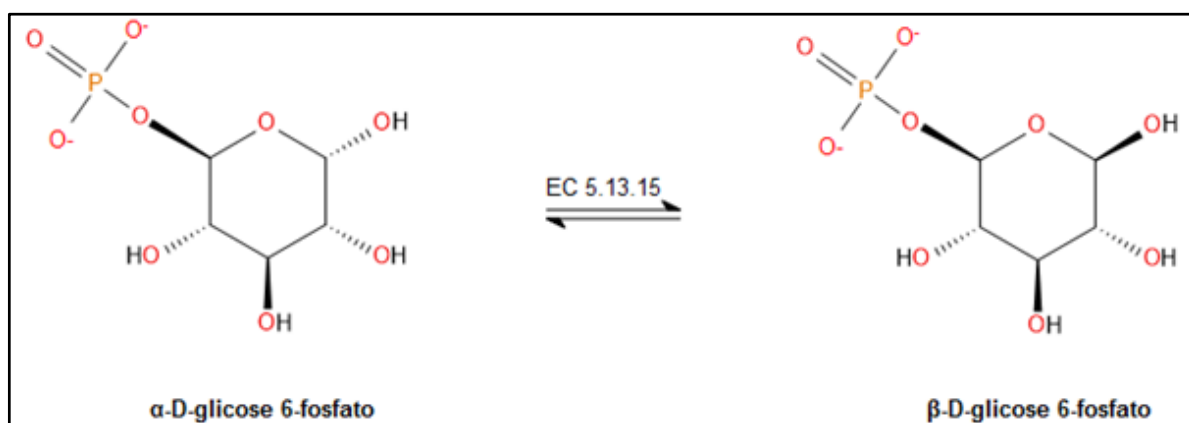
Estudos que demandam a manipulação do patógeno *N. fowleri* exigem alto grau de biossegurança e custo financeiro elevado, em consequência da grande letalidade da PAM. Nesse contexto, a utilização do protozoário *Naegleria gruberi* pode ser um sistema de modelo alternativo viável para conhecer características moleculares e bioquímicas da *N. fowleri*.

As enzimas da via glicolítica podem ser um alvo para o planejamento de medicamentos, por isso vem sendo abundantemente estudadas. No caso particular deste trabalho, o interesse está na enzima Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase de *Naegleria gruberi* (NgG6P-1E).

3.1.2 Enzima Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase (G6P-1E)

A enzima G6P-1E (EC 5.1.3.15) faz parte da via glicolítica, onde catalisa a interconversão entre α -D-glicose 6-fosfato e β -D-glicose 6-fosfato (Figura 38) (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2002).

Figura 38 - Interconversão entre α -D-glicose 6-fosfato e β -D-glicose 6-fosfato, catalisada pela Glicose-6-Fosfato-1-Epimerase.

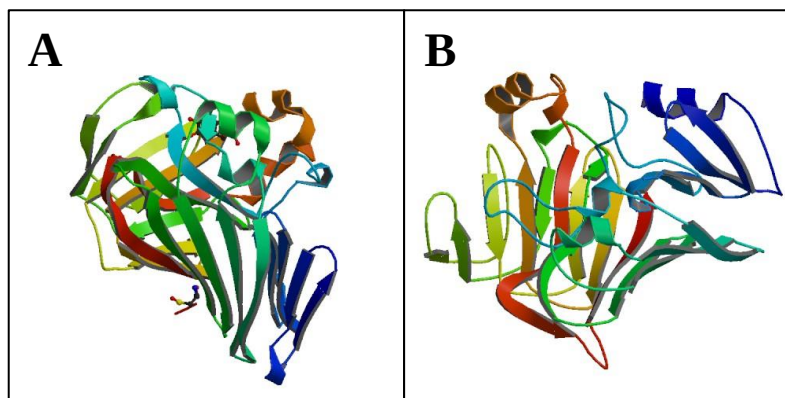


Fonte: SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG (2002).

Esta enzima é encontrada em diferentes organismos e já foi isolada a partir de bactérias, fungos, plantas (SCHOMBURG; CHANG; SCHOMBURG, 2002) e protozoários (FRITZ-LAYLIN et al., 2010).

Ainda que a G6P-1E esteja presente em muitos organismos distintos, estudos estruturais em nível molecular dessa enzima são escassos, pois no “*Protein Data Bank*” (PDB) existem apenas três estruturas de G6P-1E: G6P-1E de *Saccharomyces cerevisiae* (ScG6P-1E - código PDB: 2CIR e 2CIQ) (GRAILLE et al., 2006) e G6P-1E de *Salmonella typhimurium* (StG6P-1E - código PDB: 2HTB) (CHITTORI et al., 2007) (Figura 39). Essas enzimas possuem, respectivamente, 26,59 e 26,53% de identidade com a NgG6P-1E.

Figura 39 - Estrutura tridimensional das proteínas homólogas à G6P-1E depositadas no PDB. A) ScG6P-1E. B) SeG6P-1E.



Fonte: CHITTORI et al. (2007); GRAILLE et al. (2006).

Os resíduos catalíticos em SeG6P-1E são His164 e Glu267 (CHITTORI et al., 2007), os quais, com base no alinhamento de sequências, correspondem a His166 e Glu282 na NgG6P-1E.

A importância da estrutura tridimensional, bem como da conformação e dos resíduos do sítio ativo, é um aspecto com aplicação prática do estudo de enzimas para a busca inibidores. No caso da G6P-1E, a busca por inibidores torna-se bastante relevante uma vez que até o momento não foram relatados para essa enzima. Assim, o desenvolvimento do protocolo de expressão, purificação e cristalização, bem como a determinação da estrutura da NgG6P-1E, poderiam guiar novos estudos bioquímicos, estruturais, para a busca de inibidores tanto para NgG6P-1E quanto para a proteína homóloga NfG6P-1E, cuja estrutura primária ainda está indisponível.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo para obtenção dos clones contendo o gene da enzima NgG6P-1E;
- Inserir a construção pET-28a/NgG6P-1E em bactérias;
- Determinar as condições de expressão e purificação;
- Encontrar as condições de cristalização;
- Em caso de insucesso na obtenção de cristais de qualidade, resolver a estrutura por meio de modelagem por homologia.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Procedimentos Experimentais

3.3.1.1 Obtenção de clones contendo o gene da enzima NgG6P-1E

O procedimento para obtenção dos clones foi o citado no item 2.3.1.1 do capítulo 2, considerando-se as particularidades do gene da NgG6P-1E. Após a escolha sítios de restrição, encomendou-se a preparação do plasmídeo com o inserto junto à empresa GenScript USA Inc. (<https://www.genscript.com/>).

3.3.1.2 Transformação de bactérias eletrocompetentes por eletroporação

O procedimento para transformação das bactérias eletrocompetentes foi o citado no item 2.3.1.2 do capítulo 2.

3.3.1.3 Expressão

Os experimentos de expressão foram os citados no item 2.3.1.3 do capítulo 2, com a mudança do tampão de lise (20 mmol L⁻¹ de tris-HCl, 200 mmol L⁻¹ de NaCl e 10 mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol, pH 8,5). Os testes foram realizados para uma única colônia selecionada aleatoriamente.

3.3.1.4 Purificação por cromatografia de afinidade

O procedimento e o protocolo utilizados estão descritos no item 2.3.1.4 do capítulo 2, com a mudança dos tampões de lise (descrito no item 3.3.3) e de eluição (20 mmol L⁻¹ de Tris-HCl, 200 mmol L⁻¹ de NaCl, 500 mmol L⁻¹ de imidazol e 10 mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol, pH 8,5).

O acompanhamento da purificação foi realizado por meio de eletroforese de proteínas SDS-PAGE (12 %) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.3.1.5 Cristalização da NgG6P-1E

3.3.1.5.1 *Triagem inicial*

Para os ensaios de cristalização, a enzima foi concentrada por centrifugação a $3.000 \times g$, a 4°C , em dispositivo Vivaspin 6. As concentrações obtidas foram 5,0, 7,5 e $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$, conforme dosagem feita pelo método de Bradford (1976). O método de cristalização utilizado foi a difusão de vapor por gota suspensa (MCPHERSON, 1999).

Os experimentos foram realizados de duas formas diferentes: manual e automatizada.

- Os experimentos manuais foram conduzidos na câmara de cristalização da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Foram testadas todas as condições dos seguintes kits comerciais de cristalização: Morpheus, JCSG, PGA Screen e MIDAS, do fabricante Molecular Dimensions. Para cada ensaio distinto, misturaram-se $2 \mu\text{L}$ de solução de cristalização com $2 \mu\text{L}$ de solução da enzima. As soluções assim compostas foram deixadas equilibrar com $500 \mu\text{L}$ da solução do poço através da difusão de vapor por gota suspensa. Os ensaios foram mantidos a 18°C e as inspeções para identificação dos cristais foram realizadas a cada 24h. No total foram testadas 384 condições.

- Os experimentos automatizados foram realizados utilizando-se o robô (HoneyBee 963, Digilab Global) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Foram utilizados os seguintes kits comerciais de cristalização: "Crystal Screen HT", "JCSG+ Suite", "PACT Suite", "Precipitant Synergy", "SaltRx HT" e "Wizard Screens I e II" dos fabricantes Hampton Research, Nextal/Qiagen, Nextal/Qiagen, Emerald BioSystems, Hampton Research e Emerald BioSystems, respectivamente. Para estes ensaios, misturaram-se $0,5 \mu\text{L}$ de solução precipitante com $0,5 \mu\text{L}$ de solução da enzima, que foram deixados equilibrar com $200 \mu\text{L}$ da solução do poço. Os ensaios de cristalização foram mantidos a 4 e 18°C e as inspeções para identificação dos cristais foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo LNBio. No total foram testadas 552 condições em cada uma das temperaturas.

3.3.1.5.2 *Refinamento das condições de cristalização*

No total, foram realizados cinco refinamentos das condições de cristalização. O método utilizado foi a difusão de vapor por gota suspensa (MCPHERSON, 1999). Os ensaios foram realizados variando-se a concentração de proteína ($4,0$, $6,0$ e $8,0 \text{ mg mL}^{-1}$), a

concentração do agente precipitante (18 a 32% - de 1 em 1%), a concentração do sal (0,1, 0,15, 0,18 e 0,20 mmol L⁻¹), o pH da solução tampão (5,0 à 9,0 - de 0,5 em 0,5) e o volume/proporção das gotas em relação a solução de proteína/solução do poço (1:1, 1:2 e 1:3). Todos os ensaios foram programados seguindo as orientações apresentadas em McPherson e Cudney (2014). No total foram testadas 768 condições em cada uma das temperaturas (4 e 18 °C).

3.3.1.6 Coleta de dados

Os cristais com melhores características (de maiores tamanhos e faces bem formadas) considerando análises visuais com utilização de microscópio estereoscópico foram coletados com um crioloop, mergulhados em uma solução com 20% de PEG200 (8 µL do poço com 2 µL de PEG200) e resfriados em nitrogênio líquido. Estes cristais foram levados à fonte de radiação síncrotron (Diamond), localizada em Harwell, Inglaterra.

3.3.2 Procedimentos Computacionais

3.3.2.1 Modelagem por homologia

A busca por sequências similares à da enzima alvo foi realizada com a ferramenta BLAST do NCBI. Os critérios de seleção foram estruturas com porcentagem de identidade > 25 % e melhor resolução.

As estruturas selecionadas foram sobrepostas com a utilização do programa MultiProt (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2004) e o alinhamento entre as sequências realizado a partir das estruturas que estivessem sobrepostas com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). O alinhamento e os PDB's selecionados foram utilizados como arquivos de entrada para o programa Modeller (ESWAR et al., 2006).

Foram gerados 150 modelos que foram avaliados em relação à pontuação *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) (SHEN; SALI, 2006) e ao gráfico de Ramachandran com uso do programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993). O modelo escolhido foi o que apresentou menor valor do DOPE normalizado e que não apresentava os resíduos do sítio ativo nas regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran.

3.3.2.2 Análise do modelo gerado por homologia

O modelo obtido foi analisado pela ferramenta PDBsum (LASKOWSKI, 2009) a fim de analisar a estrutura secundária e a topologia. A sequência de aminoácidos das estruturas tridimensionais utilizadas foram alinhadas com o programa T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). A visualização do alinhamento se deu por meio do programa ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009), sendo as estruturas secundárias estimadas pelo programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983). O fundo do alinhamento foi colorido de acordo com a convenção de Alscript Calcons (BARTON, 1993).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Procedimentos Experimentais

3.4.1.1 Clonagem

O estudo direcionado a sintetizar o gene da *NgG6P-1E* levou à encomenda da construção pET28-a/*NgG6P-1E* com os sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III com inserção do gene alvo no plasmídeo pET-28a. A escolha destas enzimas foi feita de forma que o menor número de aminoácidos possível fosse adicionado à sequência nativa.

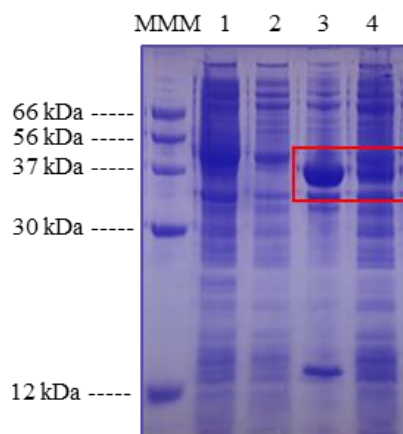
3.4.1.2 Expressão

A sequência de aminoácidos da enzima *NgG6P-1E* foi submetida à análise pelo servidor ProtParam (EXPASY Proteomics Server), que calculou uma massa molecular de 35236,91 Da (314 resíduos de aminoácidos), que com a inclusão de 6 resíduos de histidina e seus conectores, provenientes do sistema de clonagem, leva a uma massa molecular calculada de 38867,89 Da (349 resíduos de aminoácidos).

Tendo em vista esta informação, a análise eletroforética do experimento de expressão realizado a 37 °C com 6 h e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG indicou que a proteína foi expressa, entretanto, encontrava-se majoritariamente na fração insolúvel (dados não mostrados). Com a mudança na temperatura de indução para 20 °C, a proteína foi expressa na fração solúvel em quantidade maior do que quando nas mesmas condições a 37 °C.

Uma vez definida a temperatura de expressão, foram ajustados os parâmetros concentração de IPTG e tempo de indução. Encontrou-se que a melhor condição para expressar a proteína é o meio LB com 0,03 mg mL⁻¹ de canamicina e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG por 6 h de indução. A Figura 40 ilustra a expressão da *NgG6P-1E* em um gel de eletroforese.

Figura 40 - SDS-PAGE (12 %) referente ao teste de expressão a 20 °C com 6 h de indução e 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para a enzima *NgG6P-1E*



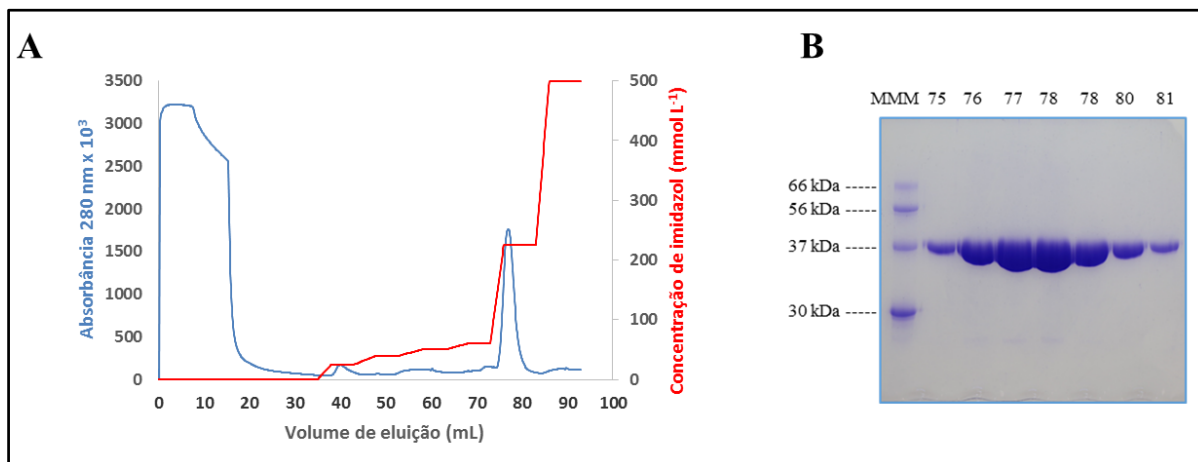
Legenda: MMM: Marcador de Massa Molecular, nas raias identificadas como 1 e 2 foram aplicadas amostras dos extratos da bactéria BL21(DE3) não transformada e da bactéria não induzida, respectivamente. Nas raias 3 e 4 foram aplicadas a fração insolúvel e solúvel, respectivamente. O retângulo vermelho indica as bandas de expressão da enzima *NgG6P-1E*.

Fonte: A autora.

3.4.1.3 Purificação por cromatografia de afinidade

No cromatograma da purificação por afinidade ao níquel, observaram-se 2 picos bem definidos e separados (Figura 41-A). Amostras referentes ao segundo pico (frações 75 a 81, cada uma de 1 mL) foram analisadas por SDS-PAGE (12%) (Figura 41-B), o qual revelou que a *NgG6P-1E* foi eluída parcialmente pura com 225 mmol L⁻¹ de imidazol. Estas amostras foram reunidas e concentradas para os experimentos de cristalização.

Figura 41 - (A) Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da NgG6P-1E por cromatografia de afinidade. (B) Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.



Lengenda: A) A linha azul representa a absorbância enquanto que a vermelha destaca o gradiente de imidazol feito com o tampão eluição. B) MMM: Marcador de Massa Molecular, números das amostras correspondentes às frações obtidas na cromatografia. Foram aplicados 10 μL de solução proteica por raia.

Fonte: A autora.

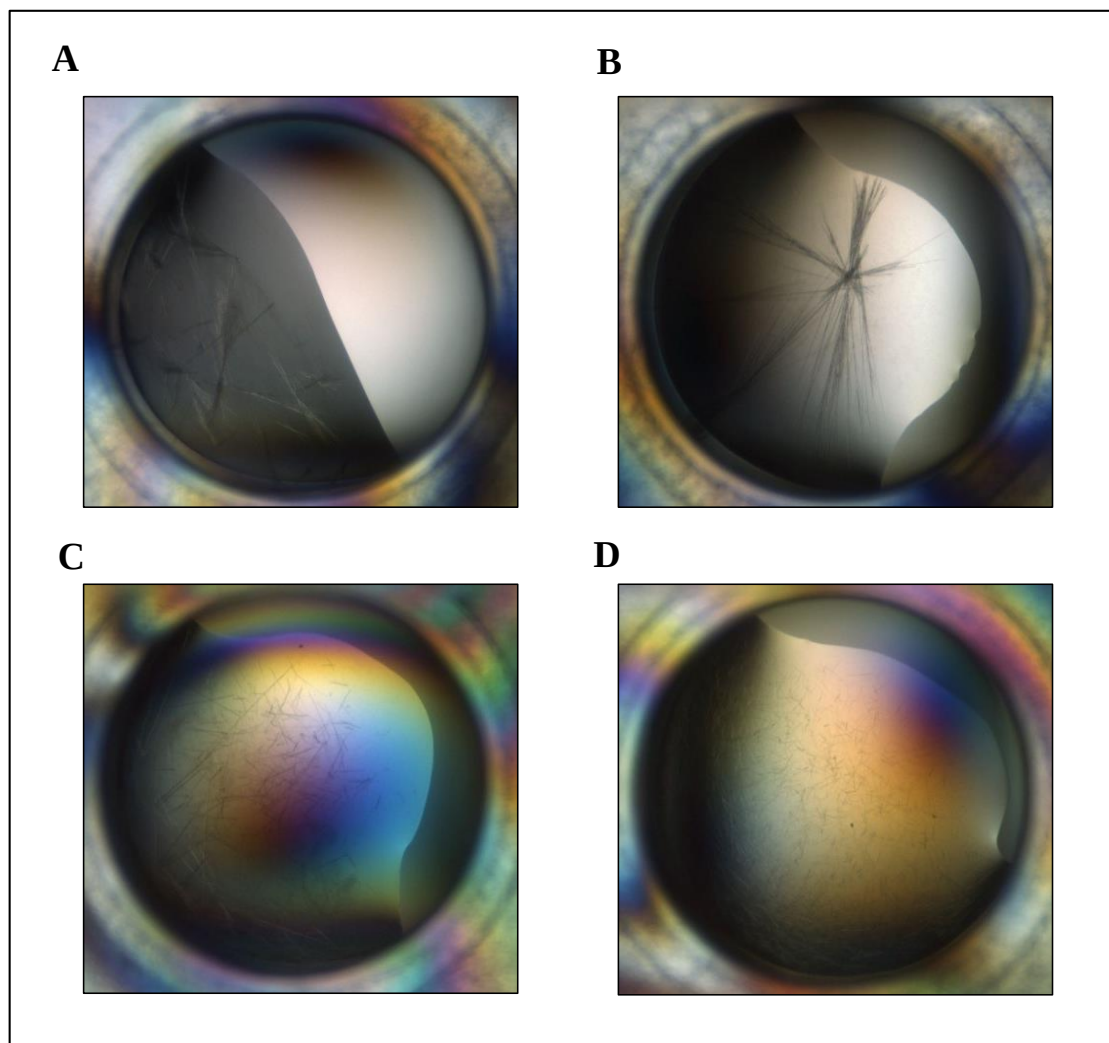
3.4.1.4 Cristalização da NgG6P-1E

3.4.1.4.1 *Triagem inicial*

Nos experimentos manuais não houve a formação dos cristais, portanto, amostras foram enviadas ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) a fim de testar outros kits comerciais.

Nos experimentos automatizados, constatou-se a formação de cristais em formato de “agulhas” em duas condições do kit JCSG a 4 e 18 °C (Figura 42). Tais condições foram: **(I)** 0,18 mmol L^{-1} de citrato de amônio tribásico e 20% (m/V) de PEG 3350 e **(II)** 0,2 mmol L^{-1} de sulfato de amônio, 0,1 mmol L^{-1} de Bis tris pH 5,5 e 20% (m/V) PEG 3350. A partir destes resultados preliminares, foi possível determinar quais as condições mais favoráveis para a cristalização da NgG6P-1E, e, a partir disso, otimizações nas condições de cristalização para os cristais obtidos nas condições **(I)** e **(II)** foram realizadas.

Figura 42 - Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNLS com a utilização do kit JCSG.



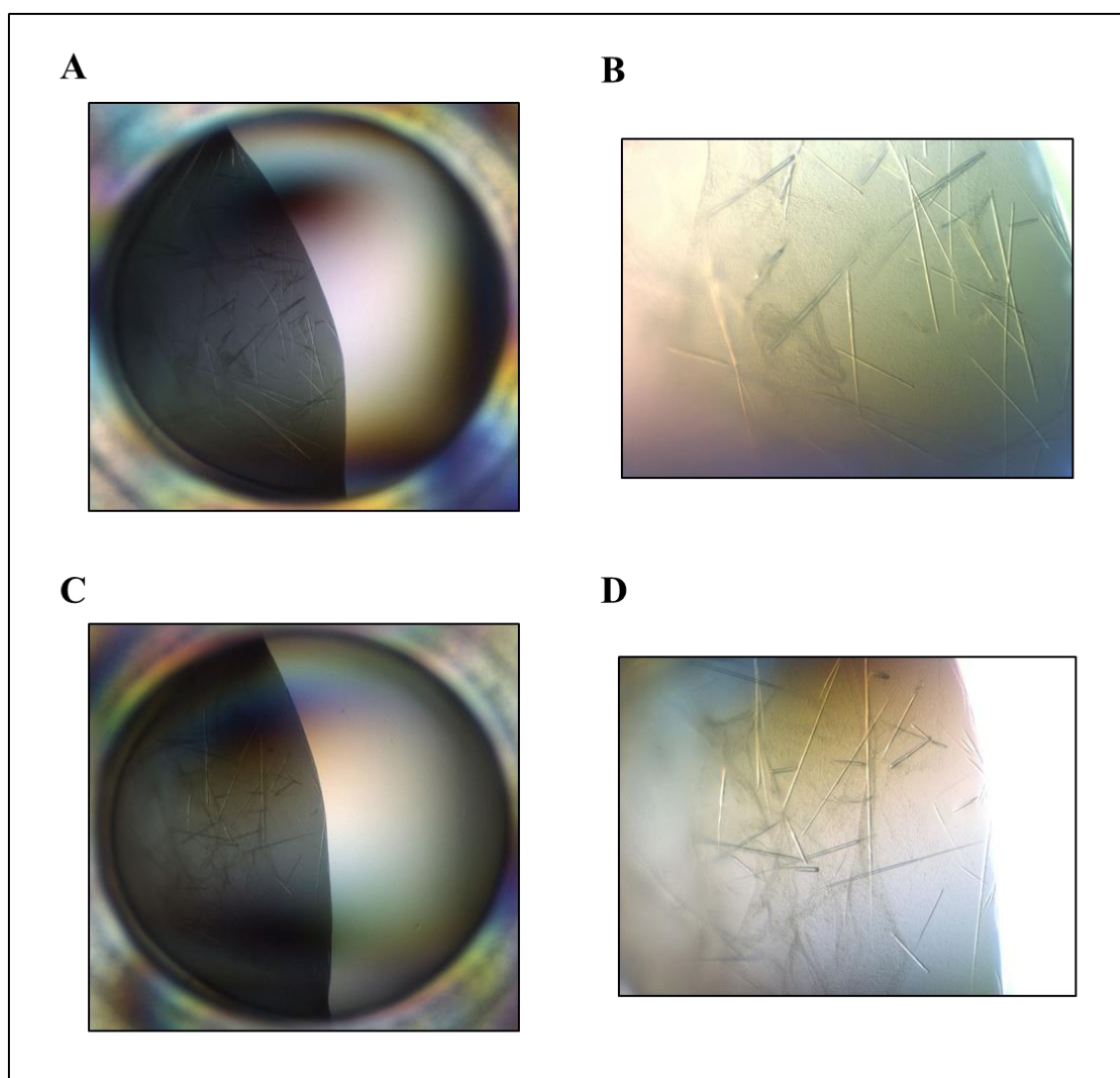
Legenda: A) Cristais obtidos na condição (I) com a enzima a 7,5 e 10 mg mL⁻¹. B) Cristais obtidos na condição (II) com a enzima a 7,5 e 10 mg mL⁻¹.

Fonte: A autora.

3.4.1.4.2 Refinamento das condições de cristalização

De forma geral, não se obteve melhora significativa na qualidade dos cristais, entretanto, dezesseis cristais julgados visualmente como melhores (Figura 43) foram submetidos a radiação síncrotron. Tais condições foram: **(III)** 0,15 mmol L⁻¹ de citrato de amônio tribásico e 21% (m/V) de PEG 3350 **(IV)** 0,15 mmol L⁻¹ de citrato de amônio tribásico (m/V) e 22% (m/V) de PEG 3350.

Figura 43 - Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNBio por meio do refinamento.



Legenda: A) Cristais obtidos na condição (III) com a enzima a 7,5 mg mL⁻¹ B) Cristais obtidos na condição (III), aproximados em uma determinada região e submetidos à luz polarizada. C) Cristais obtidos na condição (IV) com a enzima a 7,5 mg mL⁻¹ D) Cristais obtidos na condição (IV) aproximados em uma determinada região e submetidos à luz polarizada.

Fonte: A autora.

3.4.1.5 Coleta de dados

Nos experimentos de difração não se observaram reflexões nas imagens, o que é um forte indício de que se tratam de cristais de proteína, porém, desordenados. Cristais de sal, em sua maioria, mesmo que pequenos ou com átomos não totalmente organizados, apresentam padrão de difração de raios X. A incidência de luz polarizada nas gotas de cristalização também indicou a presença de cristais, já que técnica permitiu verificar a presença de birrefringência (ECHALIER et al., 2004).

3.4.2 Procedimentos Computacionais

3.4.2.1 Modelagem por homologia

Na ausência de dados experimentais para resolver a estrutura 3D da NgG6P-1E, foi dada sequência ao trabalho de modelagem molecular por restrições espaciais.

Por meio da ferramenta BLAST foram identificadas 5 proteínas homólogas, de 4 organismos diferentes, porém, somente 2 identificadas como G6P-1E. A Tabela 14 mostra os dados das estruturas selecionadas para construção dos modelos.

Tabela 14 - Dados das proteínas homólogas à enzima NgG6P-1E, obtidos a partir de alinhamentos feitos com as estruturas depositadas no PDB.

Código	Resolução (Å)	Proteína/Organismo	Similaridade (%)	Identidade (%)
2CIR	1,60	G6P-1E / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38,72	26,59
2HTA	1,90	G6P-1E / <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	36,05	26,53

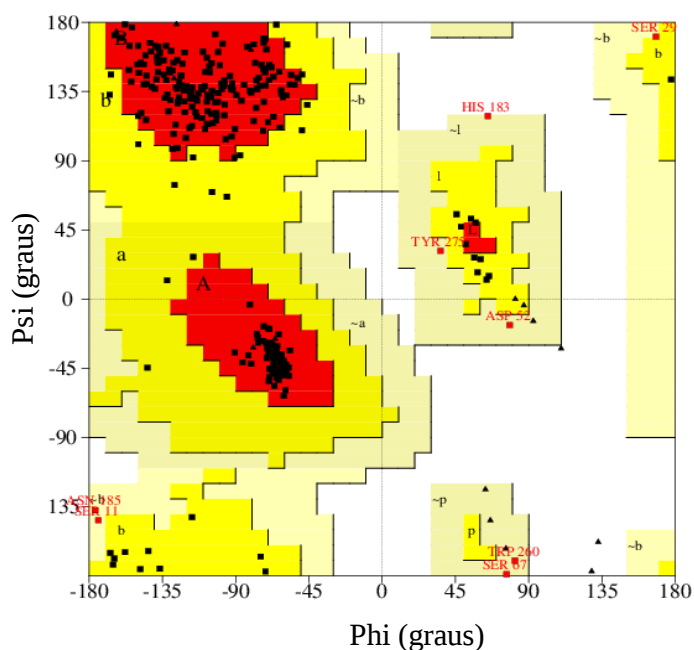
Fonte: A autora.

O grau de identidade entre as proteínas homólogas usadas para modelagem e a alvo foi sempre superior a 25%. Segundo (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003) proteínas com cerca de 25% de identidade ou superior podem ser utilizadas para construir um modelo para a proteína alvo.

3.4.2.2 Análise do modelo gerado por homologia

O modelo gerado por homologia selecionado foi aquele que apresentou valor mais negativo para a função de energia DOPE (-0,408) representando menor energia e maior estabilidade. Também foi verificado que resíduos importantes para catálise e interação com o substrato não estivessem nas regiões não permitidas no gráfico de Ramachandram. O gráfico de Ramachandran (Figura 44) indica que 84,9% dos aminoácidos estão em regiões mais favoráveis, 12,3% nas regiões adicionalmente permitidas, 2,8% nas regiões generosamente permitidas e 0,0% nas regiões não permitidas.

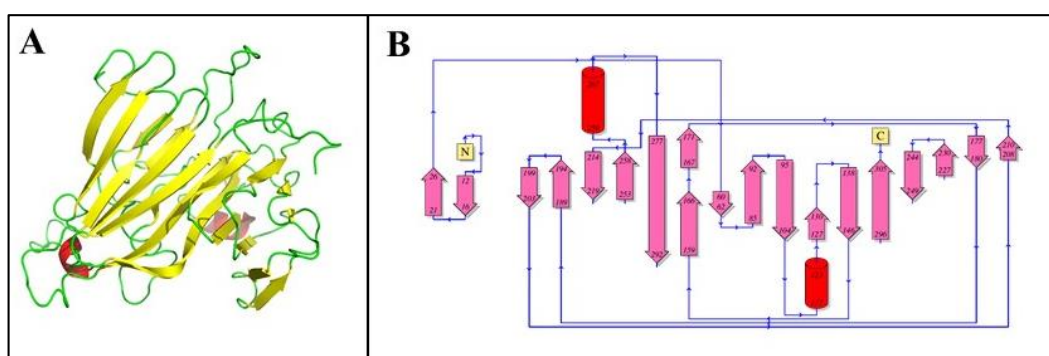
Figura 44 - Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima *NgG6P-1E*.



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

O modelo final da *NgG6P-1E* (Figura 45-A) apresenta organização estrutural contendo 5 % dos resíduos em hélices- α , 30 % em fitas- β e 65 % em “loops” ou alças (Figura 45-B).

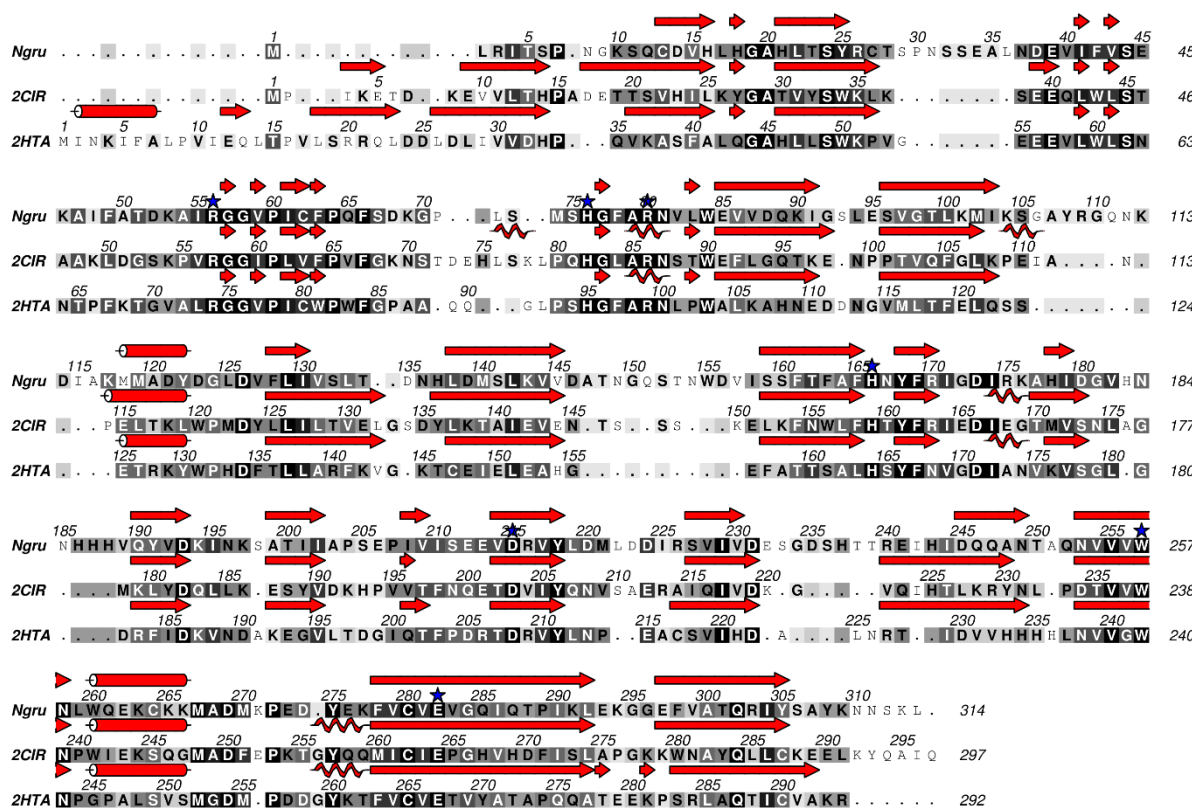
Figura 45 - A) Estrutura da enzima *NgG6P-1E* obtida por modelagem por homologia. B) Topologia de *NgG6P-1E* gerada pelo PDBSum.



Fonte: A autora.

O alinhamento entre as sequências moldes está apresentado na Figura 46 e, por meio da comparação sequencial, pode-se verificar os resíduos do sítio ativo da *NgG6P-1E*: Arg56, His159, Trp238, Glu264, Asp243, His82 e Arg86.

Figura 46 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas ScG6P-1E (código PDB: 2CIR) e StG6P-1E1E (código PDB: 2HTB).



Legenda: Estrelas verdes indicam resíduos que fazem parte da interação com o substrato. Em vermelho estão as fitas- β e as hélices- α .

Fonte: A autora.

3.5 CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada nas etapas de expressão e purificação permitiu produzir a enzima NgG6P-1E de maneira satisfatória, provendo quantidade suficiente da enzima solúvel para realizar os ensaios de cristalização;
- Os resultados dos experimentos de difração de raios X permitiram, por exclusão de possibilidade, afirmar que foram obtidos cristais da proteína em estudo, porém, não adequados para coleta de um conjunto de dados de difração de raios X. A triagem de cristalização de proteínas ajuda a determinar fatores que são favoráveis para a formação de um grande cristal de proteína adequado para cristalografia de raios X. Embora os kits comerciais existentes possam não gerar resultados imediatos completos para algumas proteínas, seus resultados parciais podem ser usados para uma otimização das condições (JUTTU; PUSEY; AYGUN, 2019).

- A enzima *NgG6P-1E* teve sua estrutura modelada computacionalmente, entretanto ressalta-se a importância da estrutura 3D a ser obtida por cristalografia, já que as proteínas homólogas apresentam identidade bastante baixa.
- Por fim, este trabalho contribuiu em vários aspectos para o entendimento da expressão e purificação da *NgG6P-1E* de maneira heteróloga, colocando os resultados ora apresentados como ponto de partida para trabalhos posteriores.

PERSPECTIVAS

- Realizar estudos por dinâmica molecular para a enzima *TcUH* para verificar como se comportariam os monômeros A (aberto) e C (fechado) na presença do substrato (urocanato) e como de uma conformação se dirigiria à outra;
- Realizar novos ensaios de cristalização para a enzima *NgG6P-1E* visando a resolução da estrutura por difração de raios X;
- Utilizar as estruturas obtidas experimentalmente na busca de inibidores diferenciais *in silico* com vista à identificação de inibidores de enzimas dos patógenos causadores de doença de Chagas e Esquistossomose.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R. A.; LOUTFY, N.; HASSAN, A. Experimentally promising antischistosomal drugs : a review of some drug candidates not reaching the clinical use. **Parasitology Research**, v. 105, p. 899–906, 2009.
- ADAMS, P. D. et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, p. 94–106, 2011.
- AFONINE, P. V. et al. The Phenix refinement framework. **CCP4 Newsletter**, v. 42, n. Contribution 8, p. 1–7, 2005.
- AGÜERO, F. et al. Genomic-scale prioritization of drug targets : the TDR Targets database. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 900–907, 2008.
- AITIPAMULA, S.; VANGALA, V. R. X-Ray Crystallography and its Role in Understanding the Physicochemical Properties of Pharmaceutical Cocrystals. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 97, n. 2, p. 227–243, 2017.
- ANTONYUK, S. V. et al. The structure of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Alcaligenes xylosoxidans* at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. D59, p. 835–842, 2003.
- ARGIRO, L. et al. Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum. **Vaccine**, v. 18, p. 2033–2038, 2000.
- BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 5, p. 459–469, 2009.
- BAIG, A. M.; KHAN, N. A. Tackling infection owing to brain-eating amoeba. **Acta Tropica**, v. 142, p. 86–88, 2015.
- BARISÓN, M. J. et al. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 48, p. 437–449, 2016.
- BARISÓN, M. J. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964–8977, 2017.
- BARRETT, K. F. et al. Structures of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. **Protein Science**, v. 29, p. 768–778, 2020.
- BARTON, G. J. ALSCRIPT - A tool for multiple sequence alignments. **Protein Engineering**, v. 6, n. 1, p. 37–40, 1993.
- BELLINI, N. K. et al. The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 1–11, 2018.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BEXKENS, M. L. et al. Lipids Are the Preferred Substrate of the Protist *Naegleria gruberi*, Relative of a Human Brain Pathogen. **Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 537- 543.e3, 2018.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: A WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D65, p. 510–512, 2009.

BOREIKO, S.; SILVA, M.; IULEK, J. Crystallization and X ray diffraction data analyses of the enzyme urocanate hydratase from *trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 678–686, 2016.

BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6, p. 1373–1384, 2010.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose mansoni - Diretrizes Técnicas**, v. Brasília, n. DF, p. 2014, 2014.

BRASIL. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 50, p. 1–10, 2019a.

BRASIL. Casos agudos confirmados no SINAN por UF de residência (2008 a 2017). p. 2019, 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**, v. Brasília, n. DF, 2019c.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347–382, 1973.

CAZZULO, J. J. Intermediate Metabolism in *Trypanosoma cruzi* Juan. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 157–165, 1994.

CDC. **Parasites - Schistosomiasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>>. Acesso em: 8 fev. 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHAI, J. Y. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: An update. **Infection and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 32–43, 2013.

CHAIKUAD, A. et al. Structure and kinetic characterization of human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDS. **Biochemical Journal**, v. 435, p. 401–409, 2011.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D66, p. 12–21, 2010.

CHITTORI, S. et al. Structure of the putative mutarotase YeaD from *Salmonella typhimurium*: Structural comparison with galactose mutarotases. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D63, p. 197–205, 2007.

CIOLI, D. et al. Will new antischistosomal drugs finally emerge? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 9, p. 379–382, 2008.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 (Suppl, p. 113–122, 2007.

COWAN-JACOB, S. W. et al. Structure of rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. D59, p. 2218–2227, 2003.

CRISPIM, M. et al. The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is required for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006170, 2018.

DANSHINA, P. V. et al. Structural analyses to identify selective inhibitors of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, p. 410–426, 2016.

DIAS, J. C. P. et al. Consensus 2 nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. supl. 1, p. 3–61, 2016.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

DOENHOFF, M. J. et al. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: Is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 465–469, 2002.

DUSCHAK, V.; COUTO, A. 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, 1 jan. 2007.

ECHALIER, A. et al. Assessing crystallization droplets using birefringence. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 4, p. 696–702, 2004.

EDWARDS, T. E.; ABENDROTH, J. **Crystal structure of a glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/4LSM>>. Acesso em: 27 jun. 2020.

EL RIDI, R. et al. Human T- and B-cell responses to Schistosoma mansoni recombinant glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase correlate with resistance to reinfection with S. mansoni or Schistosoma haematobium after chemotherapy. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 237–244, 2001.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D60, p. 2126–2132, 2004.

ESPINÓS, C. et al. Mutations in the urocanase gene UROC1 are associated with urocanic aciduria. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, p. 407–411, 2015.

ESWAR, N. et al. Current Protocols Bioinformatics. **Current Protocols Bioinformatics**, v. 5, p. 291–2931, 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.

FAIRMAN, J. W. et al. **X-ray crystal structure of a Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from Brugia malayi bound to the co-factor NAD**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/4K9D>>. Acesso em: 8 fev. 2020.

FERREIRA-DA-SILVA, F. et al. 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.

FIELD, M. C. et al. Antitrypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217–231, 2017.

FÖRSTER, A.; SCHULZE-BRIESE, C. A shared vision for macromolecular crystallography over the next five years. **Structural Dynamics**, v. 6, p. 064302, 2019.

FRAYNE, J. et al. Structure of insoluble rat sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) via heterotetramer formation with escherichia coli GAPDH reveals target for contraceptive design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 22703–22712, 2009.

FRITZ-LAYLIN, L. K. et al. The Genome of Naegleria gruberi Illuminates Early Eukaryotic Versatility. **Cell**, v. 140, p. 631–642, 2010.

FULTON, C. Cell differentiation in Naegleria gruberi. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 597–629, 1977.

FURTON, C. Amebo-flagellates as Research partners: the laboratory biology of Naegleria and Tetramitus. **Methods in Cell Biology**, v. 4, p. 341–476, 1970.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S. **Advances in GAPDH Protein Analysis: A Functional and Biochemical Approach**. 1st. ed. Singapore: Springer, 2018.

GAZZINELLI, A. et al. Sociocultural aspects of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 14, n. 4, p. 841–849, 1998.

GEORGE, D. J.; PHILLIPS, A. T. Identification of α -Ketobutyrate as the prosthetic group of Urocanase from *Pseudomonas putida*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 3, p. 528–537, 1970.

GORREC, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. **Journal of Applied Crystallography**, v. 42, n. 6, p. 1035–1042, 2009.

GRAILLE, M. et al. Structure-based Functional Annotation YEAST ymr099c CODES FOR A D -HEXOSE-6-PHOSPHATE MUTAROTASE *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30175–30185, 2006.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 2006.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 383–397, 2012.

GUIDO, R. et al. Kinetic and Crystallographic Studies on Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* in Complex with Iodoacetate. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 6, p. 210–214, 2009.

HAYWARD, S.; KITAO, A.; BERENDSEN, H. J. C. Model-Free Methods of Analyzing Domain Motions in Proteins From Simulation: A Comparison of Normal Mode Analysis and Molecular Dynamics Simulation of Lysozyme. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 27, p. 425–437, 1997.

HEMMIGE, V.; TANOWITZ, H.; SETHI, A. *Trypanosoma cruzi* infection: A review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 5, p. 501–508, 2012.

HERMAN, E. K. et al. Identification and characterisation of a cryptic Golgi complex in *Naegleria gruberi*. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 7, p. jcs213306, 2018.

HOOFT, R. W. W. et al. **Errors in protein structures** *Nature*, 1996.

HUG, D. H.; O'DONNELL, P. S.; HUNTER, J. K. Thioglycolate, competitive inhibitor of urocanase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 81, n. 4, p. 1435–1442, 1978.

HUG, D. H.; ROTH, D. Inhibition of urocanase by cupric ion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 293, p. 497–505, 1973.

INOBAYA, M. T. et al. Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 5, p. 65–75, 2014.

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.

JOHN, D. T. Primary Amebic Meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. **Annual Reviews Microbiology**, v. 36, p. 101–123, 1982.

JUTTU, M. K.; PUSEY, M. L.; AYGUN, R. S. Protein crystallization screening using enhanced associative experimental design. **Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics**, v. 8, n. 17, p. 1–10, 2019.

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. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D66, p. 133–144, 2010.

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.

KENDREW, J. C. et al. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**, v. 181, p. 662–666, 1958.

KESSLER, D.; RÉTEY, J.; SCHULZ, G. E. Structure and action of urocanase. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 1, p. 183–194, 2004.

KIM, S. et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 2019.

KLEE, C. B. et al. 2-Fluorourocanic acid, a potent reversible inhibitor of urocanase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 75, n. 3, p. 674–681, 1977.

KLEPP, J. et al. Mechanism of action of urocanase of the structure of its adduct with imidazolylpropionate. **European Journal of Biochemistry**, v. 676, p. 669–676, 1990.

KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A. xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - Programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. D52, p. 826–828, 1996.

KRATZ, J. M. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 2018.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774–797, 2007.

KRÓL-TURMIŃSKA, K.; OLENDER, A. Human infections caused by free-living amoebae. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** 2017, v. 24, n. 2, p. 254–260, 2017.

KUHN, M. L. et al. Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94816, 2014.

LANE, R. S. et al. Irreversible inactivation of urocanase by 4-bromocrotonate. **Biochemical**

and Biophysical Research Communications, v. 71, n. 1, p. 400–407, 1976.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LASKOWSKI, R. A. PDBsum new things. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D355–D359, 2009.

LEITE, L. A. C. et al. Splenectomy improves hemostatic and liver functions in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–10, 2015.

LENZ, M.; RÉTEY, J. Cloning, expression and mutational analysis of the urocanase gene (hutU) from *Pseudomonas putida*. **European Journal of Biochemistry**, v. 217, n. 1, p. 429–434, 1993.

LI, S. et al. α -Helical, but not β -sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 6676–6681, 1996.

LIEBSCHNER, D. et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, v. D75, p. 861–877, 2019.

MACHADO, A. T. P.; SILVA, M.; IULEK, J. Structural studies of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Naegleria gruberi*, the first one from phylum Percolozoa. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 5–6, p. 581–588, 2018.

MARCIANO-CABRAL, F. Biology of *Naegleria* spp. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 114–133, 1988.

MARTINS, D. S. et al. Schistosomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochthonous case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 354–357, 2015.

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

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

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

MCPHERSON, A.; CUDNEY, B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 70, p. 1445–1467, 2014.

MO, A. X. et al. Schistosomiasis elimination strategies and potential role of a vaccine in achieving global health goals. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 1, p. 54–60, 2014.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American

trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 6, p. 1–15, 2006.
 NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 91, p. 5–9, 2019.

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.

PAES, L. S. et al. The Uniqueness of the Trypanosoma cruzi Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 2074–2099, 2011.

PAES, L. S. et al. Proline Dehydrogenase Regulates Redox State and Respiratory Metabolism in Trypanosoma cruzi. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69419, 2013.

PIROVICH, D. B.; DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. Schistosoma mansoni glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances formation of the blood-clot lysis protein plasmin. **Biology Open**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2020.

RÉTEY, J. The urocanase story: A novel role of NAD⁺ as electrophile. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, n. 1, p. 1–16, 1994.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; ROMO-ARÉVALO, E.; RODRÍGUEZ-ROMERO, A. A novel substrate-binding site in the X-ray structure of an oxidized E. Coli glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase elucidated by single-wavelength anomalous dispersion. **Crystals**, v. 9, n. 622, p. 1–14, 2019.

ROSS, A. G. P. et al. SCHISTOSOMIASIS. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1212–1220, 2002.

RUEDA, K. et al. Transmisión oral de Trypanosoma cruzi: Una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. **Biomedica**, v. 34, p. 631–641, 2014.

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

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. **Quimica Nova**, v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

SCARIM, C. B. et al. Response to different benznidazole doses in animal models of chronic phase Chagas disease : a critical review. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 133–140, 2018.

SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 47–49, 2002.

SHAKOOR, S. et al. Primary amebic meningoencephalitis caused by Naegleria fowleri, Karachi, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 258–261, 2011.

SHATSKY, M.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. A Method for Simultaneous Alignment of Multiple Protein Structures. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 56, p. 143–156, 2004.

SHEN, M.-T.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, p. 2507–2524, 2006.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: An Old Enemy Presenting New Challenges. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3017, 2014.

SILVA JUNIOR, G. B. et al. Schistosomiasis-associated kidney disease: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 1, p. 79–84, 2013.

SIROVER, M. A. New insights into an old protein: The functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1432, p. 159–184, 1999.

SIROVER, M. A. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Biochemical mechanisms and regulatory control. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, p. 741–751, 2011.

SIROVER, M. A. Structural Analysis of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Functional Diversity. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 57, p. 20–26, 2014.

SONG, S. Y. et al. Structure of active site carboxymethylated D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor*. **Journal of Molecular Biology**, v. 287, p. 719–725, 1999.

SOUZA, F. P. C. DE et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.

STEIN, N. CHAINSAW: A program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 41, n. 3, p. 641–643, 2008.

STELMA, F. F. et al. Oxamniquine Cures *Schistosoma mansoni* Infection in a Focus in Which Cure Rates with Praziquantel Are Unusually Low. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 304–307, 1997.

STRELKOV, S. V.; BURKHARD, P. Analysis of α -Helical Coiled Coils with the Program TWISTER Reveals a Structural Mechanism for Stutter Compensation. **Journal of Structural Biology**, v. 137, p. 54–64, 2002.

SURESH, S. et al. Conformational changes in *leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 423–435, 2001.

TALLIMA, H. et al. Protective immune responses against *Schistosoma mansoni* infection by

immunization with functionally active gut-derived cysteine peptidases alone and in combination with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. **PLOS Neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3:e0005443, p. 1–21, 2017.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749, 2012.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, p. 317–323, 2011.

TUINSTRA, R. et al. Interconversion between two unrelated protein folds in the lymphotactin native state. **Chemtracts**, v. 21, n. 3, p. 94–95, 2008.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease : controversies and advances. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

VERLINDE, C. L. M. J. et al. Protein structure-based design of anti-protozoal drugs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 843–848, 2002.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R. J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3688–3691, 2003.

WAINE, G. J. et al. Cloning, molecular characterization, and functional activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against schistosomiasis japonica. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4716–4723, 1993.

WAINE, G. J.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis vaccine development — the current picture. **BioEssays**, v. 19, n. 5, p. 435–443, 2005.

WELCH, J. E. et al. 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. et al. Validation of protein structures for protein data bank. **Methods Enzymology**, v. 374, p. 370–385, jan. 2003.

WHO. **Different type of schistosome.** Disponível em: <<https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/table3/en/>>. Acesso em: 12 fev. 2020a.

WHO. **Schistosomiasis.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acesso em: 12 jun. 2020b.

WLODAWER, A. et al. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. **FEBS Journal**, v. 280, n. 22, p. 5705–5736, 2014.

XAVIER, S. C. DAS C. et al. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2878, 2014.

YODER, J. S. et al. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. **Epidemiology and Infection**, v. 138, p. 968–975, 2010.

YODER, J. S. et al. Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. e79–e85, 2012.

ZAFFAGNINI, M. et al. Tuning cysteine reactivity and sulfenic acid stability by protein microenvironment in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 24, n. 9, p. 502–517, 2016.

ZAFFAGNINI, M. et al. Glutathionylation primes soluble glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for late collapse into insoluble aggregates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 51, p. 26057–26065, 2019.

APÊNDICE A – Etapas envolvidas em catabolismo da histidina em *T. cruzi*

APÊNDICE A

Etapas envolvidas no catabolismo da histidina em *T. cruzi*. A enzima Urocanato Hidratase (UH) está destacada em verde.

