

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

SHEILA BOREIKO

ESTUDOS ESTRUTURAIS DA UROCANATO HIDRATASE DE *Trypanosoma cruzi* POR
MÉTODOS EXPERIMENTAIS E COMPUTACIONAIS

PONTA GROSSA
2014

SHEILA BOREIKO

ESTUDOS ESTRUTURAIS DA UROCANATO HIDRATASE DE *Trypanosoma cruzi* POR
MÉTODOS EXPERIMENTAIS E COMPUTACIONAIS

Dissertação apresentada para obtenção do
título de mestre em Química Aplicada no
Programa de Pós-Graduação em Química
Aplicada na Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

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

PONTA GROSSA
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B731 Boreiko, Sheila
 Estudos estruturais da urocanato
 hidratase de Trypanosoma cruzi por métodos
 experimentais e computacionais/ Sheila
 Boreiko. Ponta Grossa, 2014.
 68f.

 Dissertação (Mestrado em Química
 Aplicada - Área de Concentração: Química),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek.
 Coorientador: Prof. Dr. Márcio Silva.

 1.Estruturas de proteínas. 2.Urocanato
 Hidratase. 3.Trypanosoma cruzi.
 4.Modelagem estrutural. I.Iulek, Jorge.
 II. Silva, Márcio. III. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
 Química Aplicada. IV. T.

CDD: 572.67

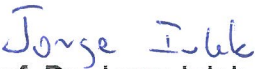
TERMO DE APROVAÇÃO

SHEILA BOREIKO

**"ESTUDOS ESTRUTURAIS DA UROCANATO HIDRATASE DE
Trypanosoma cruzi POR MÉTODOS EXPERIMENTAIS E
COMPUTACIONAIS."**

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

Orientador:


Prof. Dr. Jorge Iulek
UEPG/PR



Prof. Dr. Ariel Mariano Silber
ICB-USP/SP


Prof.^a Dr.^a Mariza Boscacci Marques
UEPG/PR

Ponta Grossa, 26 de março de 2014.

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

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por ter iluminado o meu caminho durante esta caminhada, por todas as alegrias, pela saúde e pela força que me concedeu para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais, pelas orações e por estarem ao meu lado ao longo da minha vida me ajudando e apoiando.

Ao meu esposo Alfonso, por todo apoio e compreensão.

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 co-orientador Prof. Dr. Márcio Silva, por ter acreditado no meu potencial e pelos inúmeros ensinamentos, incentivo e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques, imensamente pela disciplina Química de Proteínas, que foi fundamental para a execução deste projeto. Também, pelos conselhos, discussões e observações.

À Prof^a. Dr^a. Viviane Paula Martini, pela amizade e disposição para esclarecer as dúvidas. Sem dúvida, é uma das pessoas mais prestativas que já conheci.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber e à mestranda Raíssa Melo, pelo fornecimento das bactérias contendo o gene codificante da enzima em estudo.

Aos meus amigos de laboratório Agnes, Renato e Robson, pela ajuda durante o projeto.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao programa de Pós Graduação em Química Aplicada, 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).

É preciso estudar para ganhar o mundo e conquistá-lo para Deus.
Então, elevaremos o plano do nosso esforço,
procurando que a atividade realizada se converta em encontro com o Senhor,
e sirva de base aos outros, aos que hão-de seguir o nosso caminho...
(São Josemaría Escrivã – Sulco 526)

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das dezessete doenças negligenciadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Nas últimas duas décadas, vias metabólicas específicas deste parasita têm sido avaliadas como alvos terapêuticos, o que abre perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e menos tóxicos. Para alcançar este objetivo, há a necessidade de estudos para conhecimento da estrutura tridimensional de proteínas que fazem parte destas vias. As estruturas das proteínas podem ser estudadas experimentalmente pela técnica de difração de raios X e computacionalmente pela modelagem por homologia, porém, outras informações estruturais também podem ser obtidas por técnicas espectroscópicas. Sendo assim, realizaram-se, neste trabalho, estudos estruturais com a enzima Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi* (TcUH), que participa da via metabólica da histina. A enzima foi expressa em *E. coli* de forma funcional e, por meio de cromatografia de afinidade, purificada efetivamente e cristalizada, porém, não apresentou qualidade mínima para análise por difração de raios X. Assim, realizou-se o estudo estrutural por meio de dicroísmo circular (CD), espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e modelagem por homologia. A TcUH é constituída majoritariamente por hélices- α e seu processo de desnaturação térmica inicia-se próximo a 50 °C, sendo irreversível após completa. O estudo de SAXS indicou que em solução a enzima não se apresenta monomérica. Com o modelo produzido por homologia, que apresentou razoáveis índices de qualidade, os estudos de docagem indicaram algumas moléculas promissoras que deverão ser estudadas criteriosamente para possíveis testes de inibição.

Palavras-chave: Estruturas de proteínas. Urocanato Hidratase. *Trypanosoma cruzi*. Modelagem estrutural.

ABSTRACT

Chagas' disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is one of the seventeen neglected diseases according to World Health Organization. In the last two decades, this parasite specific metabolic pathways have been evaluated as therapeutic targets, making the prospect for the development of more specific and less toxic drugs. To achieve this goal, there is the need for studies to get knowledge on the pathway protein three dimensional structures. Protein structures can be studied experimentally by the X ray diffraction technique and computationally by homology modeling, however, other structural information can also be obtained by spectroscopic techniques. Thus, in this work, structural studies of the enzyme Urocanate Hydratase from *Trypanosoma cruzi* (TcUH), which participates in the histidine metabolic pathway, were carried out. The enzyme was expressed functionally in *E. coli* and, by affinity chromatography, effectively purified and crystallized, however, no minimum quality for X-ray diffraction was observed. Thus, we carried out the structural study by circular dichroism (CD), small angle X-ray scattering (SAXS) and homology modeling. The TcUH is mainly composed of α -helices and its denaturation process by temperature starts near 50 ° C, being irreversible after completed. The SAXS study indicated that the protein in solution was not monomeric. With the homology produced model, docking studies indicated that some promising molecules to be carefully studied for possible inhibition tests.

Keywords: Protein structures. Urocanate Hydratase. *Trypanosoma cruzi*. Structural modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2.	Representação das estruturas químicas das drogas usadas atualmente para o tratamento da doença de Chagas.	18
Figura 3.	Etapas envolvidas no catabolismo da histidina em <i>T. cruzi</i>	20
Figura 4.	Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da <i>TcUH</i> por cromatografia de afinidade.....	37
Figura 5.	Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade.	39
Figura 6.	Teste de atividade enzimática da <i>TcUH</i>	39
Figura 7.	Cristal obtido no experimento realizado na UEPG com a utilização do kit Crystal Screen.	40
Figura 8.	Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNLS com a utilização do kit JCSG..	41
Figura 9.	Imagem de difração obtida para o cristal maior da Figura 7a.....	42
Figura 10.	Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNLS a partir do refinamento dos testes preliminares da cristalização da enzima <i>TCUH</i> a 5 mg mL ⁻¹	44
Figura 11.	Espectro de dicroísmo circular da enzima <i>TcUH</i>	45
Figura 12.	Espectro de desnaturação térmica da enzima <i>TcUH</i> obtido pela técnica de dicroísmo circular.....	46
Figura 13.	(a) Curva de intensidade de espalhamento obtida da <i>TcUH</i> a 5 mg mL ⁻¹ e (b) gráfico de Guinier.....	47
Figura 14.	(a) Curva de espalhamento em escala logarítmica na ordenada; (b) Função de distribuição de distâncias para a <i>TcUH</i>	48
Figura 15.	Sobreposição do modelo por homologia com o modelo de esferas para a partícula em solução.....	48
Figura 16.	Alinhamento da sequência de aminoácidos da enzima <i>TcUH</i> com proteínas de maior homologia disponíveis no PDB.....	50
Figura 17.	Gráfico de pontuação por resíduo do modelo construído com melhor valor DOPE em comparação à estrutura de maior homologia.	51
Figura 18.	Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima <i>TcUH</i>	52
Figura 19.	Estrutura da enzima <i>TcUH</i> obtida por modelagem por homologia.....	53

Figura 20.	Diagrama de topologia do modelo obtido da enzima TcUH.....	54
Figura 21.	Sobreposição da estrutura da <i>TcUH</i> com as estruturas homólogas utilizadas para construção do modelo por homologia.	54
Figura 22.	Imagem destacando os ligantes inseridos durante a modelagem por homologia.....	55
Figura 23.	Sobreposição das estruturas das enzimas <i>TcUH</i> e 1UWK para visualização da constituição do sítio catalítico.	56
Figura 24.	Forma prevista do modo de ligação do composto Dom1, no sitio ativo da enzima <i>TcUH</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Representação das estruturas químicas das moléculas utilizadas para o estudo de Docagem.	333
Tabela 2.	Estimativas de estrutura secundária da enzima <i>TcUH</i> . Valores, média e desvio padrão em porcentagens obtidos a partir da desconvolução pelos programas utilizados (CONTINLL, SELCON3 e CDSSTR).	455
Tabela 3.	Dados das proteínas homólogas à enzima <i>TcUH</i> , obtidos a partir de alinhamentos feito com as estruturas depositadas no PDB.	49
Tabela 4.	Aminoácidos que interagem com o substrato urocanato na estrutura tridimensional obtida por modelagem por homologia da <i>TcUH</i>	57
Tabela 5.	Resultado da docagem da <i>TcUH</i>	58

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2xYT	<i>Yeast Extract Tryptone</i> - Extrato de levedura com triptona
3D	Tridimensional
AMBER	<i>Assisted model building and energy refinement</i> – Construção assistida de modelos com refinamento de energia
BATS	<i>(Blast Automatic Targeting for Structures)</i> - Busca automática de estruturas do BLAST
BLAST	<i>Basic Local Alignment search Tool</i> – Ferramenta de pesquisa para alinhamento local básica
BSA	Bovine serum albumin - Albumina sérica bovina
CASTp	<i>Computed Atlas of Surface Topography of proteins</i> - Atlas Computadorizado de Topografia Superficial de proteínas
C-C	Ligação entre carbonos
CCP4	Pacote de programas (<i>Collaborative Computational Project No.4</i>)
CD	<i>Circular dichroism</i> - Dicroísmo circular
DO	Densidade óptica
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i> – Energia discreta e otimizada de proteínas
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic - 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
JCSG	<i>Joint Center for Structural Genomics</i> - Centro conjunto de genômica estrutural
LB	Luria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
mAU	miliunidades de absorbância
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic / 2-(N-morfolino)etanosulfônico
mme	monomethyl ether – monometil éter
MMM	Marcador de Massa Molecular
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic / 3-(N-morfolino)propanosulfônico
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i> - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i> – Banco de dados de proteínas
PEG	Polietileno Glicol
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> - Espalhamento de raios X a baixo ângulo
SDS	Sodium dodecyl sulfate - Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TcUH	Urocanato Hidratase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 JUSTIFICATIVA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1.1 Doença de Chagas e a necessidade de novos medicamentos	15
1.1.2 Enzima Urocanato Hidratase (UH).....	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 PARTE EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL.....	23
3.1 PRINCIPAIS MATERIAIS.....	23
3.2 EQUIPAMENTOS	23
3.3 PRINCIPAIS REAGENTES	23
3.4 MEIOS DE CULTIVO E ADITIVOS	24
3.5 BASE DE DADOS.....	24
3.6 PROGRAMAS E SITES ACESSADOS.....	24
3.7 SOLUÇÕES	25
3.8 MÉTODOS.....	26
3.8.1 Parte experimental	26
3.8.1.1 Clonagem da enzima <i>TcUH</i>	26
3.8.1.2 Produção da enzima recombinante <i>TcUH</i>	26
3.8.1.3 Extração da <i>TcUH</i>	27
3.8.1.4 Purificação por Cromatografia de Afinidade.....	27
3.8.1.5 Dosagem da concentração da <i>TcUH</i>	28
3.8.1.6 Avaliação da atividade enzimática da <i>TcUH</i>	28
3.8.1.7 Cristalização da enzima <i>TcUH</i>	29
3.8.1.8 Coleta de dados de difração de raios X	29
3.8.1.9 Dicroísmo circular (CD).....	29
3.8.1.10 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	30
3.9 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS.....	31
3.9.1 Construção do Modelo por Homologia	31
3.9.1.1 Busca por homólogas	31
3.9.1.2 Sobreposição das cadeias principais e alinhamento das sequências de aminoácidos...	31
3.9.1.3 Modelagem por homologia.....	31

3.9.1.4 Validação	31
3.9.2 Análise das cavidades sítios de ligação	32
3.9.3 Análise dos contatos com os ligantes	32
3.9.4 Docagem.....	32
3.9.4.1 Preparo da proteína.....	32
3.9.4.2 Preparo dos ligantes.....	32
3.9.4.3 Docagem Molecular	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1 PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1.1 Obtenção da enzima <i>TcUH</i>	37
4.1.1.1 Expressão e purificação por cromatografia de afinidade.....	37
4.1.1.2 Atividade enzimática.....	39
4.1.2 Testes de cristalização	40
4.1.2.1 Testes de cristalização da enzima <i>TcUH</i> realizados na UEPG e coleta dos dados de difração	40
4.1.2.2 Testes de cristalização da enzima <i>TcUH</i> realizados no LNLS e coleta dos dados de difração	41
4.1.3 Dicroísmo circular (CD) da <i>TcUH</i>	44
4.1.3.1 Cálculo da composição de estruturas secundárias e estabilidade térmica da <i>TcUH</i>	44
4.1.4 Espalhamento de raios X a baixo ângulo.....	46
4.2 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS	49
4.2.1 Construção do modelo	49
4.2.1.1 Busca por proteínas homólogas e alinhamento das sequências.....	49
4.2.1.2 Construção propriamente dita e avaliação dos modelos gerados	51
4.2.2 Análise dos contatos com os ligantes	56
4.2.3 Docagem.....	57
5 CONCLUSÕES.....	60
6 TRABALHOS FUTUROS.....	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

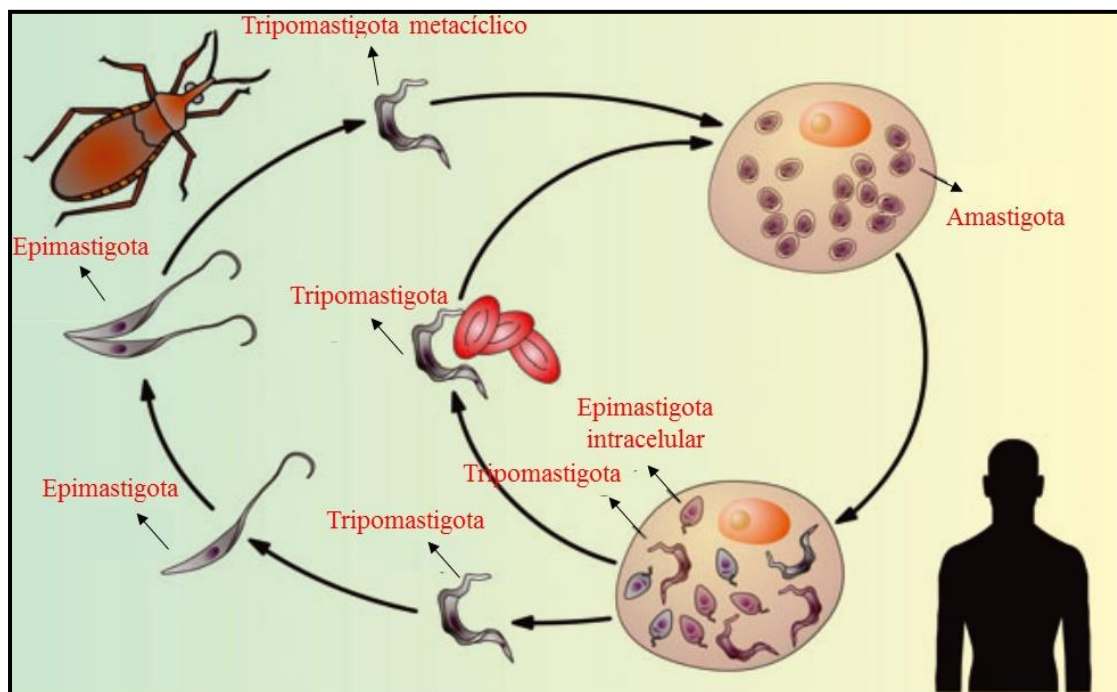
1.1.1 Doença de Chagas e a necessidade de novos medicamentos

A Tripanossomíase americana, também chamada doença de Chagas, mal de Chagas ou chaguismo é causada pelo protozoário cinetoplastídeo *Trypanosoma cruzi*. Essa zoonose é transmitida ao ser humano e outros animais principalmente através das espécies de percevejos hematófagos *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, conhecidos popularmente no Brasil como barbeiro, chupança, fincão, bicudo, chupão ou procotó (CHAGAS, 1909). Outras formas de infecção epidemiologicamente relevantes foram também identificadas: transmissão por meio de transfusão sanguínea e transplante de órgãos sólidos de doadores infectados para receptores saudáveis, transmissão durante a gravidez ou nascimento, através de acidentes laboratoriais e via oral por ingestão de alimentos ou líquidos contaminados (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010; PAES *et al.*, 2011). Esta parasitemia é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das dezessete doenças tropicais negligenciadas (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A doença é tecnicamente uma antroponose espalhada quase exclusivamente pelo continente americano desde os Estados Unidos da América (EUA) até a República da Argentina (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010), afetando de 7 a 8 milhões de indivíduos em 21 países, e expondo ao risco de infecção aproximadamente 40 milhões de pessoas (OMS, 2013), especialmente em regiões com condições econômicas adversas (DIAS, 2006). Porém, casos foram também identificados na Europa (80.000), Japão e Austrália (COURA; VINAS, 2010).

Durante o ciclo biológico do *T. cruzi*, estágios de desenvolvimento distintos são encontrados, tanto em insetos vetores quanto em mamíferos infectados. No inseto vetor, após a maioria dos tripomastigotas morrerem, na parte anterior do intestino, um pequeno número de parasitas chegam ao intestino médio e se transformam em epimastigotas (forma não infecciosa divisível). Ao multiplicarem-se, os epimastigotas colonizam o tubo digestivo do inseto desde a região média até a distal, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Neste estágio do desenvolvimento os parasitas não se dividem e adquirem a capacidade de infectar hospedeiro mamífero (TYLER; ENGMAN, 2001). Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor defeca, e se estiver infectado, libera formas tripomastigotas junto com as fezes. A infecção do hospedeiro mamífero se dá pelo contato do parasita com lesões microscópicas da pele ou com mucosas. Ao atingir a corrente sanguínea, os tripomastigotas invadem as células

do hospedeiro por meio de um vacúolo parasitóforo temporário. Após a degradação da membrana do vacúolo, no citoplasma celular, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas (forma replicativa e infecciosa) (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Após aproximadamente 35 horas, os amastigotas iniciam sua replicação por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas, passando temporariamente por um estágio parecido ao epimastigota intracelular. A população de parasitas intracelulares não se diferencia de forma síncrona. Assim, num determinado momento, todas as fases transitórias entre amastigotas e tripomastigotas podem ser encontrados em uma célula, onde a predominância de uma das formas dependerá da estirpe de *T. cruzi*, assim como da temperatura e do tempo de infecção. (TYLER; ENGMAN, 2001; ALVES; COLLI, 2007). Uma vez completado o ciclo intracelular, os tripomastigotas lisam as células e são liberados para o espaço intercelular podendo invadir outras células próximas ao tecido infectado ou órgãos distantes levados pela corrente sanguínea. Na corrente sanguínea os tripomastigotas podem ser absorvidos pelo vetor durante a alimentação, reiniciando o ciclo biológico (RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010) (Figura 1).

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptada de (BOSCARDIN et. al., 2009).

A fase aguda da doença ativa-se após o contato inicial com o patógeno é caracterizada por uma parasitemia conspícua e ausência de resposta humoral. Os parasitas podem ser encontrados em praticamente todos os tecidos e órgãos como amastigotas intracelulares acompanhados por infiltração de linfócitos, células plasmáticas e monócitos (SILBER *et al.*, 2005). Este estágio pode durar de várias semanas a vários meses e ser, quase sempre, assintomático (PAES *et al.*, 2011). No caso dos sintomas existirem, eles se apresentam inespecíficos, na forma de febre e cefaleias, mas podem também ser observados outros sintomas como conjuntivite unilateral (sinal de Romana), dentre outros. Porém, sintomas mais graves podem também existir, tais como insuficiência cardíaca devido à miocardite ou derrame pericárdico, ou meningoencefalite, o que pode levar à morte em 10 % dos casos (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). Contrariamente à fase aguda, na fase crônica os parasitos são raramente encontrados, porém, os pacientes apresentam uma robusta resposta imune humoral, evidentemente incapaz de eliminar o parasita (COURA; VINAS, 2010).

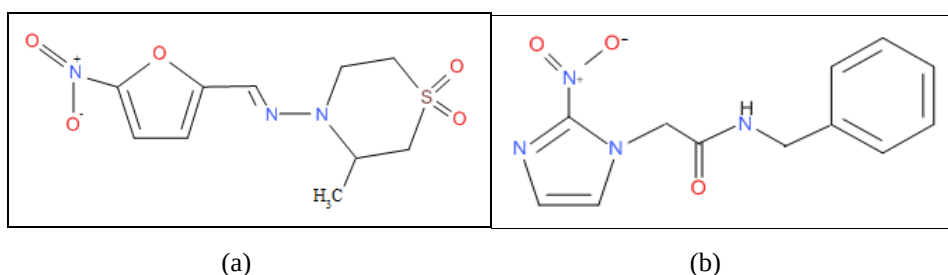
Na fase crônica, a manifestação mais comum diz respeito a cardiopatias que ocorrem em 20 a 30 % dos casos. Outra complicação observada na fase crônica acomete o sistema digestório e também são relatados casos em que as formas cardíaca e digestiva ocorrem simultaneamente. Em pacientes imunodeficientes, o sistema nervoso central também pode ser comprometido. A fase crônica aparece subsequente a este período de latência, o que pode durar vários anos, razão pela qual esta fase indeterminada ou subclínica pode ser considerada inclusive como uma fase crônica assintomática (PAES *et al.*, 2011).

O *T. cruzi* passa por vários tipos de ambientes durante o seu ciclo de vida (Figura 1). Cada ambiente tem suas próprias características físicas, físico-químicas e químicas específicas (PAES *et al.*, 2011). Neste ponto, radica não apenas sua importância patológica, senão seu fundamento terapêutico, assim as drogas utilizadas devem ser capazes de atravessar as membranas plasmáticas em busca do parasita e manterem-se ativas em diferentes ambientes (CLAYTON, 2010). Porém, por se tratar de uma doença negligenciada que acomete quase que exclusivamente países em desenvolvimento, a Tripanossomíase americana não possuiu um adequado investimento para pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (COURA; VINAS, 2010; KAPPAGODA; IOANNIDIS, 2012).

As drogas mais frequentemente utilizadas são os componentes nitroheterocíclicos Nifurtimox (Lampit®Bayer; <http://healthcare.bayer.com/scripts/pages/en/search.php?q=nifurtimox&WT.oss=&filter=0>). (Figura 2a) e Benzonidazol, este último um derivado do nitroimidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche;

(http://www.roche.com/fr/responsibility/access_to_healthcare/making_innovation_accessible/ath_who.htm), (Figura 2b). As propriedades destes fármacos foram descobertas de maneira empírica há mais de quatro décadas (URBINA; DOCAMPO, 2003). Apesar da controvérsia sobre o mecanismo de ação do Nifurtimox (BOIANI; GONZALEZ, 2005), acredita-se que o mesmo atua em presença de oxigênio por meio da redução do grupo nitro para radicais nitroânions instáveis, levando ao surgimento de moléculas tóxicas ao parasita. O Benzonidazol 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 (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988). Também tem mostrado efeitos positivos melhorando a fagocitose, estimulando a resposta imune do hospedeiro por meio da produção de γ -interferon (ROMANHA *et al.*, 2002), inibindo a fumarato redutase e interferindo com a resistência ao estresse oxidativo (TURRENS *et al.*, 1996). Embora existam diferenças na susceptibilidade entre parasitas de diversas áreas geográficas, ambas as drogas podem ser consideradas efetivas na fase aguda com índice de cura parasitológica definitiva em cerca de 80 % (URBINA; DOCAMPO, 2003). Na fase crônica a efetividade desses fármacos é baixa e controversa (SILBER *et al.*, 2005; PAES *et al.*, 2011). Ambas as drogas, após a utilização prolongada por 30-90 dias, (tempo estimado de tratamento) apresentam efeitos colaterais, tais como anorexia, vômito, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica, derivados provavelmente de seus próprios mecanismos (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Figura 2. Representação das estruturas químicas das drogas usadas atualmente para o tratamento da doença de Chagas. a) Nifurtimox; b) Benzonidazol



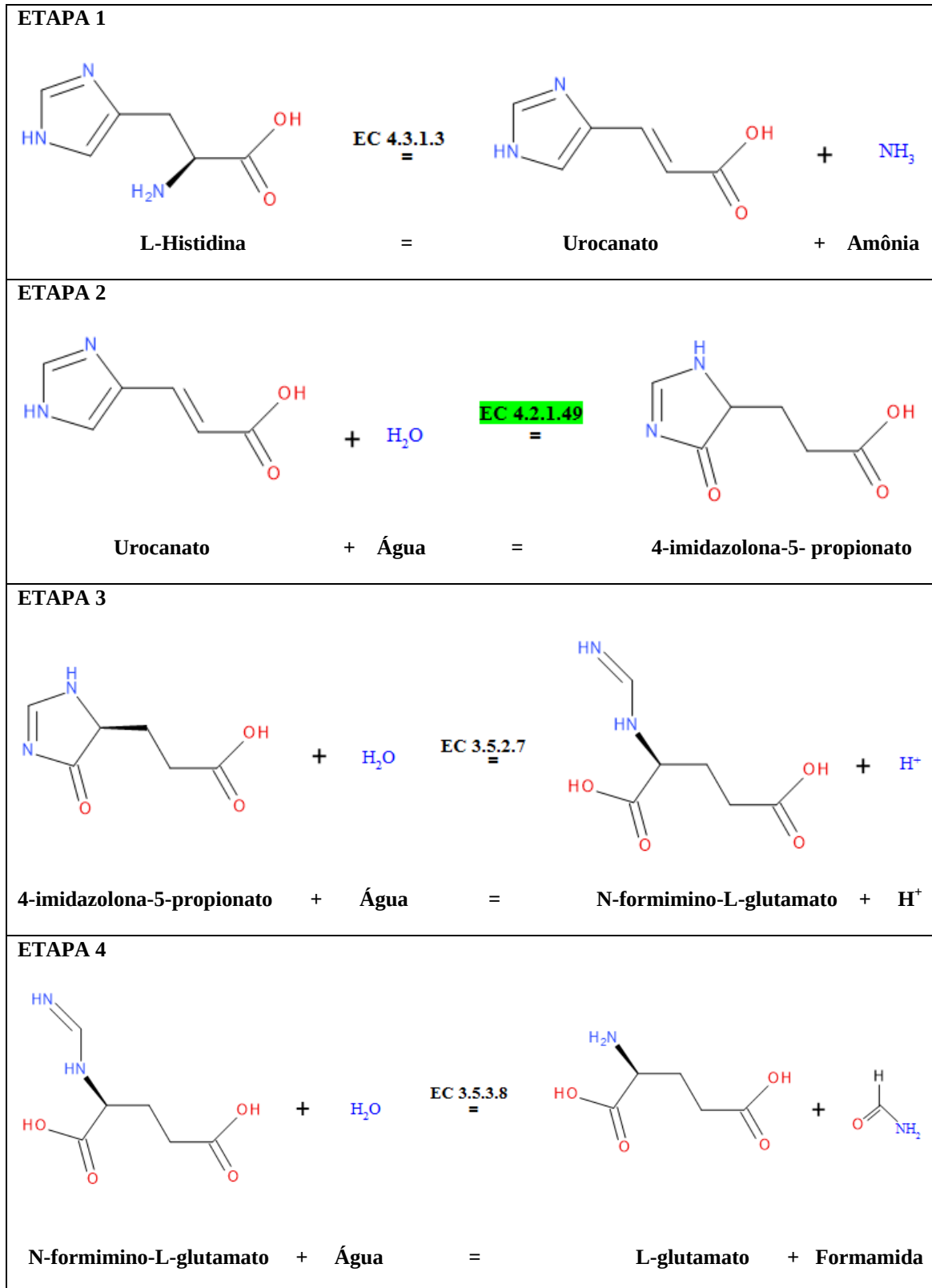
Fonte: (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Nas últimas duas décadas, como resultado do sequenciamento genômico do parasita, vias metabólicas específicas do *Trypanosoma cruzi* tem sido avaliadas como alvos terapêuticos, abrindo a perspectiva para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e menos tóxicos para o tratamento da doença de Chagas. Nessas perspectivas, alguns dos

principais alvos terapêuticos considerados até o momento são: cisteína proteases (Cruzipaína), via de biossíntese de esteróis, biossíntese de poli-isoprenóides, enzimas das vias glicolíticas, via das pentoses fosfato, arginina quinase, metabolismo das poliaminas, biossíntese de lipídios, topoisomerases, proteínas editoras de RNA e estresse oxidativo (DUSCHAK; COUTO, 2007; PAES *et al.*, 2011).

Outras possibilidades que vem sendo estudadas na procura de alvos terapêuticos são as enzimas do metabolismo de aminoácidos que contribuem como fonte de energia ao *T. cruzi*. Dentre esses aminoácidos, a L-histidina tem sua degradação que leva ao glutamato e a outros produtos. Por meio de banco de dados de genomas e do proteoma do *T. cruzi*, foi possível identificar as enzimas que fazem parte desta via: 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) (Figura 3). No caso particular deste trabalho, o interesse está na segunda enzima da via, Urocanato Hidratase (UH). Essa enzima tem sido considerada alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos e, portanto, estudos aprofundados permitirão o entendimento ao nível molecular e contribuirão para esclarecer sua participação no metabolismo do *T. cruzi*. A elucidação de sua estrutura tridimensional também contribuirá para testes de novos inibidores *in silico*. Inibidores selecionados virtualmente poderão ser utilizados em testes de inibição enzimática *in vitro* e, a longo prazo, poderão resultar em compostos de partida para o desenvolvimento de novas medicamentos antichagásicos.

Figura 3. Etapas envolvidas no catabolismo da histidina em *T. cruzi*. A enzima em destaque representa a Urocanato Hidratase (UH).



Fonte: Adaptada de (www.brenda-enzymes.org/).

1.1.2 Enzima Urocanato Hidratase (UH)

A enzima UH (EC 4.2.1.49), também conhecida como urocanase, participa na via catabólica da histidina, onde atua na conversão de urocanato a 4-imidazolona-5-propionato. Ela é encontrada em diferentes organismos e já foi isolada de alguns procariotos e eucariotos, inclusive de humanos. Em condições fisiológicas, a UH é um homodímero (KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004) onde cada monômero apresenta como cofator o eletrófilo NAD^+ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) (KLEPP *et al.*, 1990; KOBERSTAEDT; LENZ; RETEY, 1992; KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004), essencial para sua catálise e enovelamento correto (KLEPP *et al.*, 1990; KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004).

Estudos confirmam que a TcUH (Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi*) está presente nas formas epimastigota e trypomastigota metacíclico do *T. cruzi* (ATWOOD *et al.*, 2005) o que lhe outorga a capacidade inerente de ser alvo para o desenvolvimento de inibidores que causem deficiência da rota metabólica histidina-glutamato na fase aguda da infecção.

Alguns dos compostos caracterizados como inibidores ou com significativa ação de inibição da enzima UH são: boroidreto de potássio, imidazolpropionato, fumarato, fenilhidrazina, hidroxilamina, semicarbazida, cianeto de potássio, (GEORGE; PHILLIPS, 1970), 4-bromocrotonato (LANE *et al.*, 1976), ácido 2-fluorourocânico (KLEE *et al.*, 1977), tioglicolato (HUG; O'DONNELL; HUNTER, 1978), além do íon cúprico (HUG; ROTH, 1973).

Vale ressaltar que por estar presente em humanos, sabe-se da necessidade de testes de inibição comparativos entre a enzima do parasita e do humano, no processo de desenvolvimento de medicamentos que considerem essa enzima como alvo molecular.

Algumas das moléculas 4-bromocrotonato (LANE *et al.*, 1976), ácido 2-fluorourocânico (KLEE *et al.*, 1977), tioglicolato (HUG; O'DONNELL; HUNTER, 1978) e o íon cúprico (HUG; ROTH, 1973) foram caracterizados como inibidores para a enzima UH de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*. Por estar presente em humanos, sabe-se da necessidade de testes de inibição comparativos entre a enzima do parasita e do humano, no processo de desenvolvimento de medicamentos que considerem essa enzima como alvo molecular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos estruturais por modelagem computacional e por técnicas espectroscópicas diversas da Urocanato Hidratase de *Trypanosoma cruzi*, visando contribuir com a busca de novos inibidores para esse potencial alvo molecular para desenvolvimento de novas drogas contra doença de Chagas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter a TcUH recombinante pura enzimaticamente e ativa;
- b) Obter cristais da TcUH adequados para coleta de difração de raios X;
- c) Resolver estrutura 3D (tridimensional) por cristalografia ou, alternativamente, obtê-la por modelagem por homologia;
- d) Realizar estudos estruturais de moléculas ligantes por "docagem".
- e) Realizar estudos estruturais espectroscópicos por Dicroísmo Circular (CD) e Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS).

3 PARTE EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL

3.1 PRINCIPAIS MATERIAIS

- Coluna HisTrap™ FF crude de 1 mL (*GE Life Sciences*);
- Concentradores, modelo Vivaspín 6, 10 kDa (*GE Life Sciences*);
- Erlenmeyers;
- Filtro de seringa, modelo K18-230 (*Kasvi*);
- Seringas;
- Tubos de ensaios.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador orbital, modelo 430-RBP (*Nova Ética*);
- Agitador rotatório de tubos, modelo AT56 (*Phoenix*);
- Autoclave vertical, modelo AV-75 (*Phoenix*);
- Autoclave, modelo MK3000 12L III (*Odontobrás*);
- Balança analítica modelo, modelo AS 60/220/C/2 (*Radwag*);
- Câmara de biossegurança, modelo Bioseg 06 (*Veco*);
- Centrífuga refrigerada, modelo HIMAC (*Hitachi CR21GII*);
- Cromatógrafo Líquido, modelo ÄKTApurifier™ UPC 10 (*GE Healthcare*);
- Difrátômetro, modelo D8 VENTURE (*Bruker*);
- Espectrofotômetro, modelo Cary50 Conc (*Varian*);
- Espectropolarímetro Jasco J-810;
- Robô de cristalização, modelo HoneyBee 963 (*Digilab Global*);
- Sistema de eletroforese vertical, modelo PowerPac Basic (*Bio-Rad*);
- Sonicador, modelo VCX750 (*Sonics & Materials INC*);
- Ultrafreezer -86 °C, modelo NU-9668GC (*Nuare*).

3.3 PRINCIPAIS REAGENTES

- Canamicina (*Sigma-Aldrich*);
- IPTG (*Uniscience*);
- Lisozima (*Amresco*);

- Marcador de massa molecular (7-175 kDa) (*Biolabs*);
- Tetraciclina (*Inlab*).

3.4 MEIOS DE CULTIVO E ADITIVOS

Os meios de cultivo utilizados foram preparados segundo (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

- 2xYT : 16 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de NaCl;
- Canamicina: dissolvida em água ultrapura para a concentração estoque de 30 mg mL⁻¹;
- Isopropiltio-β-D-galactosídeo (IPTG) : 1 g de IPTG em 5 mL de água ultrapura, para concentração estoque de 0,8 mmol L⁻¹;
- LB: triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹;
- Tetraciclina: dissolvida em etanol 70 % (m/V) para a concentração estoque de 5 mg mL⁻¹.

3.5 BASE DE DADOS

- *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- *Protein Data Bank* (PDB) – (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

3.6 PROGRAMAS E SITES ACESSADOS

- Accelrys Draw 4.1 – (<http://accelrys.com/resource-center/downloads/>).
- Aline (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009).
- Alscript Calcons (BARTON, 1993).
- Ambertools (CASE *et al.*, 2012).
- Assisted Model Building and Energy Refinement (AMBER) (CASE *et al.*, 2012); (<http://ambermd.org/>).
- AutoDockTools (SANNER, 2005).
- AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010); (<http://vina.scripps.edu/>).
- AUTORG (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN, 2001).

- *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (PARK *et al.*, 2012); (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- *Computed Atlas of Surface Topography of proteins* (CASTp) (DUNDAS *et al.*, 2006); (<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>);
- CDPro (SREERAMA; WOODY, 2000); (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>).
- CRY SOL (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995).
- DAMMIN (SVERGUN, 1999).
- Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) (ESWAR *et al.*, 2006).
- DSSP (KABSCH; SANDER, 1983).
- GA341 (JOHN; SALI, 2003).
- MASSHA (KONAREV; PETOUKHOV; SVERGUN, 2001).
- OLIGOMER (KONAREV *et al.*, 2003).
- MODELLER (ESWAR *et al.*, 2006); (<http://salilab.org/modeller/>).
- Multiprot (SHATSKY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002); (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt/>).
- Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993).
- ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005); (<http://web.expasy.org/protparam/>)
- PyMOL (DELANO, 2002).
- T-Coffee (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000); (<http://tcoffee.crg.cat/>).
- VegaZZ (PEDRETTI; VILLA; VISTOLI, 2004).
- *Workflow for structural genomic projects* (MHOLline) (<http://www.mholline.lncc.br/>).

3.7 SOLUÇÕES

- Solução de azul de *Comassie*: 10 % (V/V) ácido acético glacial, 0,25 % (m/V) azul de *Comassie* R-250 e 45 % (V/V) etanol.
- Solução de Bradford: 100 mg de azul de *Coomassie* R-250, 50 mL de etanol a 95 % (V/V), 100 mL de ácido fosfórico 85 % (V/V), diluídos até 1 L com água destilada. Após dissolução, o corante foi filtrado através de papel de filtro qualitativo.
- Solução descorante: 57 % (V/V) metanol e 3 % (V/V) ácido acético.

- Tampão de ligação pH 7,9: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol L⁻¹ imidazol.
- Tampão de amostra 2X para gel SDS PAGE: 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 4 % (m/V) SDS, 0,2 % (m/V) azul de bromofenol e 20 % (V/V) glicerol, 0,2 % (m/V) β-mercaptoetanol.
- Tampão de diálise pH 7,9: 500 mmol L⁻¹ NaCl e 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl.
- Tampão de eluição pH 7,9: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl e 500 mmol L⁻¹ de imidazol.
- Tampão de lavagem pH 7,9: 500 mmol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl e 60 mmol L⁻¹ de imidazol.

3.8 MÉTODOS

3.8.1 Parte experimental

3.8.1.1 Clonagem da enzima TcUH

Através da colaboração estabelecida com a Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Parasitologia, na pessoa do professor Dr. Ariel Mariano Silber, foram obtidos clones da bactéria *Escherichia coli* cepa BL21-DE3 portadoras do plasmídeo recombinante pET-24(+) contendo o gene codificante da enzima TcUH (pET-24(+)/TcUH). Essa construção possibilita expressar a enzima de interesse com um acréscimo de seis resíduos de histidina na região C-terminal.

Os clones portadores da construção pET-24(+)/TcUH foram propagados em inóculos de 10 mL de meio LB contendo os antibióticos canamicina e tetraciclina nas concentrações finais de 0,03 mg mL⁻¹ e 0,005 mg mL⁻¹, respectivamente. O inóculo assim preparado foi mantido a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 16 horas.

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

3.8.1.2 Produção da enzima recombinante TcUH

Foi realizado um teste piloto, a partir de um inóculo de 5 mL de meio LB suplementado com canamicina (0,03 mg mL⁻¹) e tetraciclina (0,005 mg mL⁻¹), contendo 10 µL da solução estoque de células descrita no item anterior. O inóculo foi mantido a 37 °C sob

agitação de 240 rpm por 16 horas. Para a expressão da enzima foi preparado um novo inóculo com 1 L de meio 2xYT, contendo as células crescidas no inóculo anterior diluídas na proporção 1:100. O inóculo assim preparado foi mantido a 37 °C sob agitação de 140 rpm até atingir uma densidade óptica (DO) a 600 nm entre 0,5 e 0,6. Atingida esta condição, a cultura foi induzida com Isopropiltio- β -D-galactosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5 mmol L⁻¹ e incubada a 25 °C sob agitação de 150 rpm por 16 horas. Todas as etapas de expressão foram realizadas em ambiente estéril.

3.8.1.3 Extração da TcUH

As culturas de células BL21-DE3 em meio 2xYT, no volume total de 1 L, foram centrifugadas por 10 min a 15.000 *g* a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 40 μ L de tampão ligação (proporção de 10 mL de meio para 400 μ L de tampão). Para a lise das células, foi adicionada lisozima na concentração final de 1 mg mL⁻¹. Essa solução foi mantida no banho de gelo por 30 min sob agitação manual. Posteriormente, este material foi submetido à sonicação em banho de gelo, por 5 ciclos de 30 s, com intervalo de 30 s entre cada ciclo. Após o rompimento celular, a amostra, referente a 1 mL de cultura, foi submetida a centrifugação a 15.000 *g* por 10 minutos a 4 °C. As condições experimentais para expressão da TcUH estabelecidas no teste piloto foram utilizadas na produção da enzima em grande escala, mantendo-se as proporções para 10 L de cultura.

3.8.1.4 Purificação por Cromatografia de Afinidade

A fração contendo as proteínas solúveis, em tampão de ligação, correspondente a 10 L de cultura bacteriana, foi utilizada para purificação por cromatografia de afinidade em resina com níquel. Uma coluna contendo 1 mL da resina foi inicialmente equilibrada com 5 volumes de coluna com o tampão de ligação (fluxo de 1 mL min⁻¹, mantido em todas as etapas). Alíquotas de 10 mL da solução de proteínas foram injetadas na coluna. A lavagem das proteínas com interação fraca ou inespecífica foi realizada através da aplicação de 10 vezes o volume da coluna com o tampão de lavagem. A eluição da enzima recombinante foi realizada por meio de um gradiente composto pelos tampões de lavagem e de eluição. No gradiente, a concentração de imidazol variou de 60 a 500 mmol L⁻¹, sendo o máximo atingido após a passagem de 20 volumes de coluna.

O grau de pureza da enzima nas frações eluídas da coluna foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % na presença do detergente SDS e de β -mercaptoetanol. Foi utilizada a metodologia proposta por (LAEMLI, 1970), sob tensão de 160 V por 1 h. Alíquotas de 20 μ L das frações eluídas foram diluídas em tampão de amostra para gel SDS-PAGE na proporção 1:1 e desnaturadas por aquecimento a 98 °C durante 5 min. Após a eletroforese, o gel foi corado por 15 min e descorado por aproximadamente 30 min conforme soluções descritas no item 3.7.

3.8.1.5 Dosagem da concentração da *TcUH*

A concentração da enzima foi determinada por espectroscopia no UV a 595 nm através do método de Bradford (1976). O padrão utilizado para as curvas de calibração foi a soro albumina bovina (BSA, 0,2 mg mL⁻¹). As curvas de calibração foram feitas com concentrações de BSA entre 0,002 e 0,02 mg mL⁻¹. As amostras foram diluídas de forma a apresentarem absorbâncias próximas ao ponto médio da curva de calibração.

3.8.1.6 Avaliação da atividade enzimática da *TcUH*

A verificação da atividade da *TcUH* ocorreu por meio de ensaio espectrofotométrico, observando-se a conversão de urocanato a 4-imidazolona-5-propionato. Os ensaios foram realizados em comprimento de onda fixo de 277 nm, monitorando-se a catálise por 10 min à temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de 207,5 μ L da solução da enzima *TcUH* pura (para dar uma concentração final de 75 μ g mL⁻¹) no meio reacional, a uma solução contendo tampão fosfato de potássio pH 7,0 e urocanato, estes na concentração final de 100 mmol L⁻¹ e 35 μ mol L⁻¹, respectivamente, num volume final do meio reacional de 500 μ L. Os experimentos foram conduzidos em cubetas de quartzo com capacidade para 500 μ L. O controle da reação (branco) foi obtido pela substituição do volume correspondente à solução contendo a *TcUH* por volume equivalente de tampão fosfato de potássio, com as demais condições experimentais mantidas.

3.8.1.7 Cristalização da enzima TcUH

Para os ensaios de cristalização, a enzima foi concentrada por centrifugação à 3.000 *g* em dispositivo Vivaspin 6. As concentrações obtidas foram 5,0, 7,5 e 10,0 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 conduzidos de duas maneiras distintas: automatizado em robô (HoneyBee 963, Digilab Global) do LNLS e manual, na câmara de cristalização da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os testes de cristalização automatizado e manual foram realizados em placas de 96 poços e de 24 poços, respectivamente. Nos experimentos realizados pelo robô, cada gota de cristalização foi preparada com volume de 0,7 µL de solução precipitante, 0,7 µL da solução da proteína e equilibrada com 100 µL da solução do poço. Nos experimentos manuais utilizaram-se 2 µL de solução precipitante e 2 µL da solução da enzima, submetidos então ao equilíbrio com 500 µL da solução do poço.

Nos experimentos realizados com o robô foram utilizados os kits comerciais de cristalização: "JCSG", "PACT Suite", "Wizard Screens I e II" e "Precipitant Synergy", dos fabricantes Nextal/Qiagen, Nextal/Qiagem, Esmerald BioSystems, Emerald BioSystems, respectivamente. Já nos experimentos manuais foram utilizados os kits Crystal Screen e Morpheus, dos fabricantes Hampton Research e Molecular Dimensions.

3.8.1.8 Coleta de dados de difração de raios X

Um cristal obtido na câmara de cristalização da UEPG foi resfriado em nitrogênio a 100 K após banho em solução crioprotetora e submetido a experimento no difratômetro (BRUKER, D8 VENTURE) do Laboratório de Química Inorgânica da UFPR.

Posteriormente, alguns cristais obtidos a partir do robô de cristalização do LNLS foram selecionados com base no tamanho, congelados em nitrogênio a 100 K e submetidos a coleta de dados de difração de raios X na estação D03B-MX1 do LNLS e no difratômetro (BRUKER, D8 VENTURE) do Instituto de Física de São Carlos - USP.

3.8.1.9 Dicroísmo circular (CD)

As medições foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-810 no LNLS, com aproximadamente 500 µL de enzima pura a 0,1 mg mL⁻¹ em tampão tris-HCl 10 mmol L⁻¹ pH 7,9, NaCl 250 mmol L⁻¹ e comprimentos de onda de 197 a 240 nm, intervalo de 1 nm, a

20 °C. O caminho óptico foi de 1 mm em cubeta de quartzo retangular. Além deste ensaio, foi avaliada a estabilidade da enzima por meio do experimento de desnaturação térmica, para temperaturas entre 20 e 100 °C com medições em 220 nm, em aquecimento e resfriamento subsequente.

As análises dos dados de CD foram realizadas com o pacote *CDPro*, *software package*, que inclui os programas SELCON3, CONTINLL e CDSSTR que permitem estimar a percentagem de estrutura secundária ao comparar os dados experimentais com espectros de um grupo de 43 proteínas de referência (SREERAMA; WOODY, 2000). Para isso, converteram-se os dados de CD para $\Delta\epsilon$ por resíduo.

Com o propósito de possibilitar uma melhor visualização do fenômeno, uma curva de predição foi realizada por meio do modelo Boltzmann sigmóide (análise de regressão não linear), $Y = \text{bottom} [\theta] + [(\text{top} [\theta] - \text{bottom} [\theta]) / (1 + \exp(X_{50}-X)/b)]$, onde bottom e top $[\theta]$ correspondem aos valores máximo e mínimo, respectivamente, de elipticidade molar, X_{50} é a temperatura na qual a elipticidade molar é a média entre top e bottom e b representa a inclinação da curva ou a dispersão da distribuição dos valores de elipticidade molar correspondentes a cada temperatura.

3.8.1.10 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

O experimento de SAXS foi realizado no LNLS, à temperatura ambiente, no comprimento de onda de 1,55 Å, linha SAXS1. Foram utilizadas soluções de enzimas nas concentrações de 1,0, 5,0 e 10 mg mL⁻¹ em tampão 500 mmol L⁻¹ NaCl e 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,9. Estas foram postas em celas de mica de 1 mm de espessura. As soluções de enzima, como do próprio tampão sem enzima, foram submetidas ao feixe por 30 s em 10 repetições. A faixa do vetor q foi de 0,0157 Å⁻¹ a 0,327 Å⁻¹. Procurou-se usar as curvas mais estáveis, que foram promediadas para os cálculos, que neste caso revelaram-se ser da enzima na concentração de 5 mg mL⁻¹.

3.9 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

3.9.1 Construção do Modelo por Homologia

3.9.1.1 Busca por homólogas

A busca por sequências similares à da enzima alvo foi realizada com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do banco de dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). A fim de priorizar as estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) escolhidas para a construção do modelo, foi também verificado o que o programa *Workflow for structural genomic projects* (MHOLline) sugeria com o índice *Blast Automatic Targeting for Structures* (BATS). Ainda, outros critérios utilizados foram selecionar estruturas com porcentagem de identidade $< 25\%$, melhor resolução e resolvidas com a presença de ligantes.

3.9.1.2 Sobreposição das cadeias principais e alinhamento das sequências de aminoácidos

As estruturas tridimensionais selecionadas do PDB foram sobrepostas com a utilização do programa MultiProt. O alinhamento entre as sequências foi obtido utilizando-se o programa T-Coffee a partir das estruturas sobrepostas. A visualização se deu por meio do programa Aline. As estruturas secundárias foram estimadas pelo programa DSSP. O fundo da figura foi colorido de acordo com a convenção de Alsript Calcons.

3.9.1.3 Modelagem por homologia

A predição dos modelos tridimensionais da sequência alvo baseada nas estruturas moldes foi feita através do programa MODELLER, o qual permite a obtenção dos modelos com base em estruturas tridimensionais conhecidas a partir de restrições espaciais (ESWAR *et. al.*, 2006), tendo sido gerados 300 modelos. As estruturas selecionadas foram visualizadas pelo programa PyMOL.

3.9.1.4 Validação

Os 300 modelos gerados foram avaliados em relação à pontuação *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) que avalia a energia dos modelos da proteína gerados, GA341 para avaliação do enovelamento da proteína e pela análise do gráfico de Ramachandran o qual

avalia a torção dos ângulos ϕ (fi) e ψ (psi), com uso do programa Procheck. Aquele com menor valor do DOPE normalizado foi escolhido para os procedimentos subsequentes, desde que estivesse de acordo com os outros critérios de avaliação estabelecidos pelo gráfico de Ramachandran e GA341 (JOHN; SALI, 2003).

3.9.2 Análise das cavidades sítios de ligação

O arquivo gerado a partir do Modeller foi submetido ao *software Computed Atlas of Surface Topography of proteins* (CASTp) para identificar possíveis bolsões de ligação do modelo, bem como os aminoácidos presentes neste. Também, com este, obteve-se o volume e a área das cavidades.

3.9.3 Análise dos contatos com os ligantes

A partir do programa ncont do pacote *Collaborative Computational Project No.4* (CCP4), foram analisados os contatos dos ligantes inseridos durante o procedimento de modelagem até 4 Å.

3.9.4 Docagem

3.9.4.1 Preparo da proteína

A estrutura da TcUH obtida por meio da modelagem por homologia foi preparada para os estudos de docagem de acordo com a seguinte ordem: (1) os átomos de hidrogênio foram adicionados sob a condição de pH 7,0; (2) foi realizada a atribuição das cargas de cada átomo de acordo com Gasteiger a partir do programa AutoDockTools.

A caixa onde os cálculos de afinidade e interação foram realizados foi delimitada enquadrando-se o sítio ativo na mesma, numa medida total de 2480 Å. O espaçamento do grid foi de 0,375 Å (aproximadamente $\frac{1}{4}$ da distância de uma ligação covalente C-C) e as funções embutidas no próprio programa foram utilizados para o cálculo dos mapas de energia.

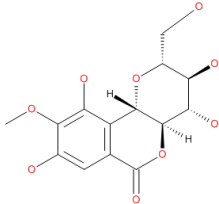
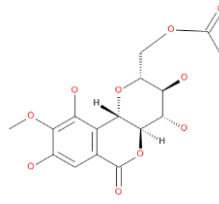
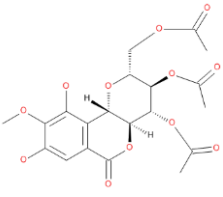
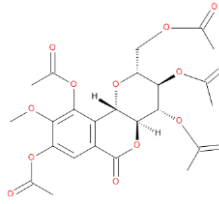
3.9.4.2 Preparo dos ligantes

Através de colaboração com os pesquisadores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Ponta Grossa, Prof. Dr. Luciano Fernandes e Prof. Dr. Julio César

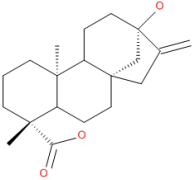
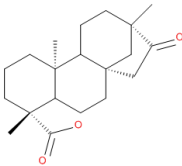
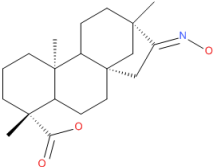
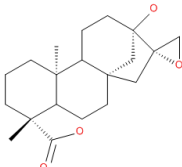
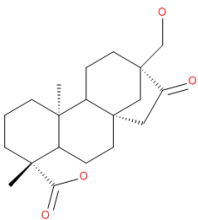
Stiirmer, e da UEPG, Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, foram disponibilizadas moléculas (Tabela 1) para serem testadas computacionalmente, dentro de perspectiva futura de serem utilizadas experimentalmente, como ligantes à enzima *TcUH*.

Tabela 1. Representação das estruturas químicas das moléculas utilizadas para o estudo de Docagem.

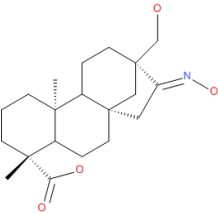
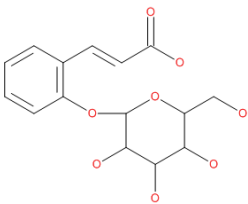
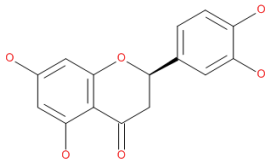
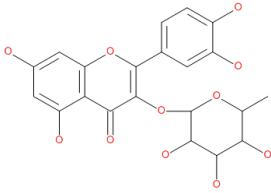
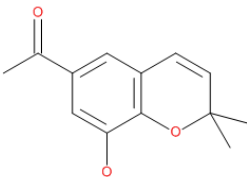
(continua)

Formula Estrutural Plana	Nome de referência	Nome IUPAC
	Luc1	(2R,3S,4S,4aR,10bS)-3,4,8,10-tetrahidroxi-2-(hidroximetil)-9-metoxi-2,3,4,4a-tetrahidropirano[3,2-c]isocromen-6(10bH)-ona
	Luc2	(2R,3S,4S,4aR,10bS)-3,4,8,10-tetrahidroxi-9-metoxi-6-oxo-2,3,4,4a,6,10b-hexahidropirano[3,2-c]isocromeno-2yl)metil acetato
	Luc3	(2R,3R,4R,4aS,10bS)-2-(acetoximetil)-8,10-dihidroxi-9-metoxi-6-oxo-2,3,4,4a,6,10b-hexahidropirano[3,2-c]isocromeno-3,4-diil diacetato
	Luc4	(2R,3R,4R,4aS,10bS)-2-(acetoximetil)-9-metoxi-6-oxo-2,3,4,4a,6,10b-hexahidropirano[3,2-c]isocromeno-3,4,8,10-tetrail tetracetato

(continuação)

Formula Estrutural Plana	Nome de referência	Nome IUPAC
	Jul1	Ácido ent-13-hidroxicaur-16-en-19-óico
	Jul2	Ácido ent-16-cetobaieran-19-óico
	Jul3	Ácido ent-16-hidroximinoibaieran-19-óico
	Jul4	Ácido ent-13-hidroxi-16,17- α -epoxicaur-19-óico
	Jul5	Ácido ent-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico

(conclusão)

Formula Estrutural Plana	Nome de referência	Nome IUPAC
	Jul6	Ácido ent-17-hidroxi-16-hidroximino-baieran-19-óico
	Dom1	Trans-B-D-glucosyl-hydroxycinnamate
	Dom2	Eriodictyol
	Dom3	Quercetina-3-O-L-ramanosídeo
	Dom4	6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno

O programa escolhido para o desenho da forma estrutural plana destas moléculas foi o Accelrys Draw 4.1, gravada inclusive no formato *.mol*. Este foi utilizado como entrada para o software VegaZZ, através do qual foi estimada a estrutura tridimensional da molécula com suas cargas iniciais atribuídas. Após, os ligantes tiveram sua energia minimizada com o campo de força *Assisted Model Building and Energy Refinement* (AMBER), e suas as cargas atômicas calculadas através do método AM1BCC como implementado no módulo antechamber, do pacote Ambertools.

3.9.4.3 Docagem Molecular

Para este trabalho, optou-se por usar docagem semi-flexível, no qual a proteína fica rígida enquanto os ligantes são flexíveis. O software AutoDockVina foi utilizado para a predição da interação ligante-receptor.

Após a realização das simulações de docagem molecular, as interações entre a enzima TcUH e as moléculas testadas para este trabalho foram avaliadas a partir da função pontuação, embutida no mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

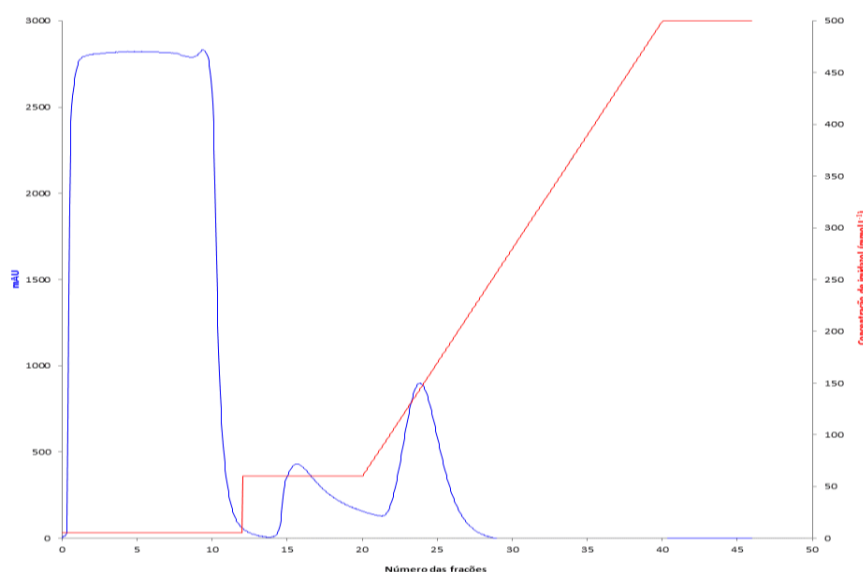
4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Obtenção da enzima TcUH

4.1.1.1 Expressão e purificação por cromatografia de afinidade

A produção da enzima recombinante foi satisfatória, possibilitando produzir quantidade suficiente para a purificação e demais estudos. A purificação da TcUH em coluna de níquel-agarose possibilitou obter enzima com o grau de pureza necessário para os estudos posteriores, porém, contrariando o perfil cromatográfico padrão esperado para cromatografia de afinidade, com apenas um pico referente a eluição da enzima alvo (GE, 2013), observaram-se dois picos (Figura 4). A lavagem da resina com 5 mmol L⁻¹ de imidazol contribuiu para retirar a maioria dos contaminantes e a enzima de interesse começou a eluir a partir de 60 mmol L⁻¹ de imidazol (fração 15). No eletroforegrama (Figura 5) desta fração e adjacentes, observaram-se algumas bandas de proteínas contaminantes, portanto, optou-se por descartá-las. As frações 19 a 21 apresentaram um grau de pureza maior, assim como, as frações referentes ao terceiro pico do cromatograma, evidenciando a eficiência do protocolo de purificação utilizado.

Figura 4. Cromatograma das frações eluídas durante a purificação da TcUH por cromatografia de afinidade. A linha azul representa a absorbância enquanto que a vermelha destaca o gradiente de imidazol feito com o tampão eluição.



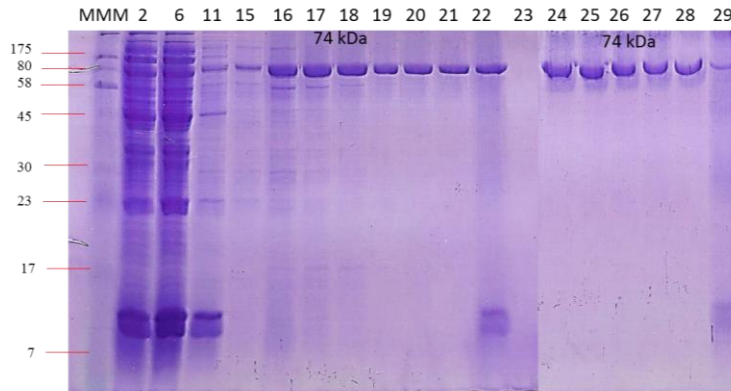
Fonte: A Autora.

O perfil cromatográfico obtido deveu-se provavelmente à saturação da capacidade de ligação da coluna ou interação fraca da enzima com a coluna devido à utilização de imidazol, ainda que em baixa concentração no tampão de lavagem. De acordo com o cromatograma representado na Figura 4, pode-se propor uma alteração no protocolo de eluição de forma que a enzima alvo seja obtida em fração única do eluato. Com esse propósito, os experimentos posteriores serão realizados visando otimizar o protocolo de purificação, no qual o gradiente deverá ser substituído por uma concentração fixa de imidazol capaz de eluir toda enzima alvo em uma única ou em poucas frações.

A eficiência da purificação foi acompanhada pela técnica de eletroforese (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O padrão eletroforético, apresentado na Figura 5, foi utilizado como referência para junção das frações purificadas; dessa forma, as frações 19 a 21 e 24 a 28 foram reunidas, dialisadas e concentradas para vários ensaios de cristalização. Ressalta-se que nas amostras aplicadas nas raias 22 e 29 observaram-se bandas referentes a proteínas contaminantes. Tal contaminação deve-se provavelmente a mistura involuntária de frações que deveriam ter sido descartadas. A raia 23 não apresentou proteína, provavelmente devido a algum erro na aplicação da amostra. Com base no eletroforegrama (Figura 5), as frações representadas nas raias 22, 23 e 29 foram descartadas.

A eficiência na purificação é crucial para a cristalização de proteínas, pois alto grau de pureza da amostra proteica é extremamente importante para a cristalização (DRENTH, 1999). Em geral, considera-se um grau de pureza entre 95-99% como satisfatório para iniciar os ensaios de cristalização (<http://www.structbio.missouri.edu/crystallography-tips.php>). Cabe ressaltar que, em alguns poucos casos, a cristalização pode ser usada como uma etapa final para purificação de proteínas, eliminando contaminantes minoritários (VOET; VOET, 1990).

Figura 5. Eletroforegrama SDS-PAGE 12% das frações da cromatografia por afinidade. A figura apresenta a junção de dois eletroforegramas (gel 1: raia MMM-23; gel 2: raia 24-29). MMM: Marcador de Massa Molecular; os números das amostras correspondem às frações obtidas na cromatografia. Foram aplicados 10 μ l de solução proteica por raia.

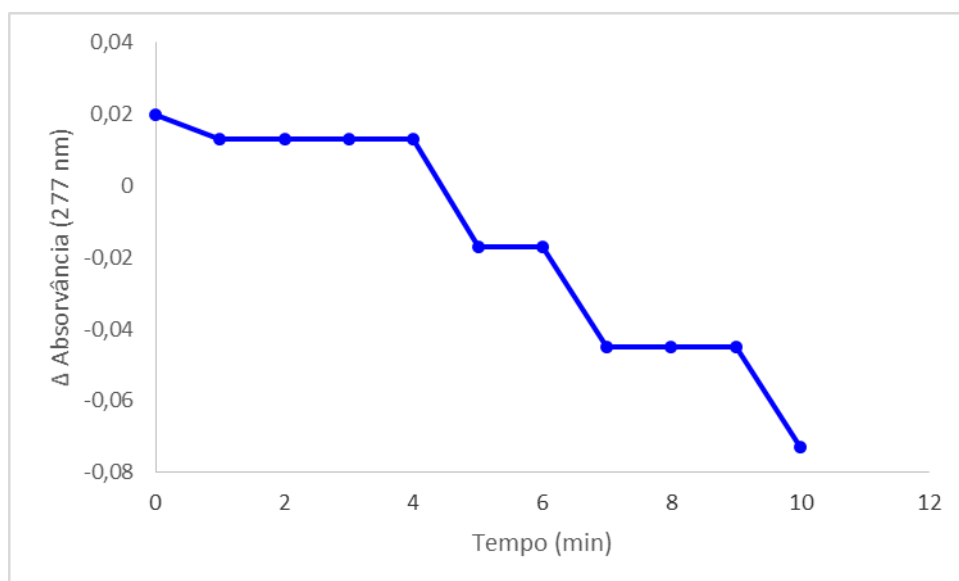


Fonte: A Autora.

4.1.1.2 Atividade enzimática

Embora os ensaios de atividade não tenham sido representativos, pode-se pelo menos verificar que a enzima *TcUH* recombinante purificada mostrou-se capaz de catalisar a hidrólise do urocanato. Esta ação pode ser constatada pela análise da Figura 6, em que se pode notar a diminuição da concentração do urocanato em solução pelo decaimento da absorbância em 277 nm. A atividade enzimática apontaria o correto enovelamento da proteína heteróloga obtida.

Figura 6. Teste de atividade enzimática da *TcUH*. A linha azul representa o decaimento da absorbância do urocanato, evidenciando a atividade enzimática.



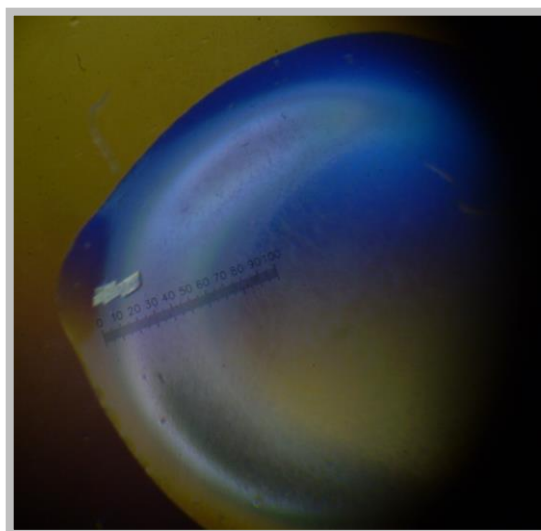
Fonte: A Autora.

4.1.2 Testes de cristalização

4.1.2.1 Testes de cristalização da enzima TcUH realizados na UEPG e coleta dos dados de difração

Nos experimentos realizados na UEPG, observou-se a formação de pequenos cristais em duas condições do kit Morpheus e em uma condição do kit Crystal Screen. No caso do kit Morpheus, após 27 dias da realização do experimento, foram dois cristais, nas seguintes condições: (a) 0,09 mol L⁻¹ halogênios (NaF; NaBr; NaI), 0,1 mol L⁻¹ de *Buffer System 1* pH 6,5 (composto de imidazol e MES ácido), 20 % (V/V) Polietileno Glicol (PEG) 550 mme e 10 % (m/V) PEG 20.000; (b) 0,09 mol L⁻¹ halogênios (NaF; NaBr; NaI), 0,1 mol L⁻¹ *Buffer System 2* pH 7,5 (composto de HEPES sódico e MOPS ácido), 20 % (V/V) glicerol e 10 % (m/V) PEG 4000. Já no caso do kit Crystal Screen, foram precipitados cristalinos em várias gotas. Porém, após 32 dias, observou-se um cristal maior no ensaio com a solução constituída de: (c) 0,2 mol L⁻¹ acetato de magnésio, 0,1 mol L⁻¹ cacodilato de sódio e 20 % (m/V) PEG 8.000 (Figura 7).

Figura 7. Cristal obtido no experimento realizado na UEPG com a utilização do kit Crystal Screen. Enzima TcUH a 10 mg mL⁻¹. Dimensões aproximadas: 29 µm × 6 µm.



Fonte: A Autora.

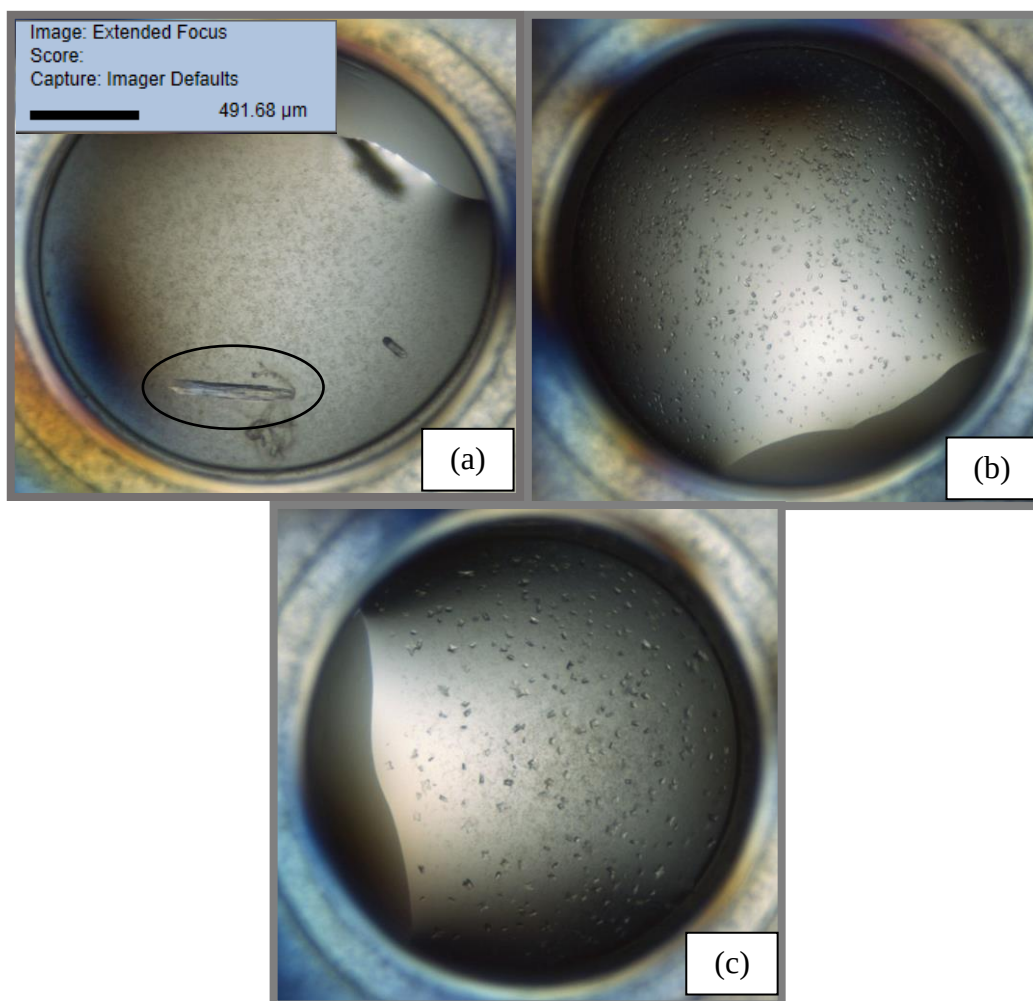
O cristal obtido com o kit Morpheus, descrito na condição (a) e um cristal obtido com o kit Crystal Screen, descrito na condição (c) e mostrado na Figura 6, foram submetidos à difração de raios X. Análise dos padrões de difração obtidos revelaram tratarem-se de

cristais de sal. Os cristais obtidos na condição (b) não foram submetidos à difração devido ao aspecto altamente desordenado apresentado na solução de cristalização.

4.1.2.2 Testes de cristalização da enzima *TcUH* realizados no LNLS e coleta dos dados de difração

Três dias após o preparo das gotas, observaram-se cristais com a utilização do kit JCSG nas três concentrações de proteína (5,0, 7,5 e 10,0 mg mL⁻¹) nas seguintes condições: (a) 0,10 mol L⁻¹ tampão citrato de sódio pH 5,5 e 20 % (V/V) PEG 3.000; (b) 24 % (m/V) PEG 1.500 e 20 % (V/V) glicerol e (c) 0,04 mol L⁻¹ dihidrogenofosfato de potássio, 16 % (m/V) PEG 8000 e 20 % (V/V) glicerol. A Figura 8 a, b e c mostra os cristais obtidos nestas três condições, respectivamente.

Figura 8. Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNLS com a utilização do kit JCSG. Enzima *TcUH* a 10 mg mL⁻¹. O maior cristal, em destaque em (a), apresenta dimensão aproximada de 581 μ m $\times$ 31 μ m.

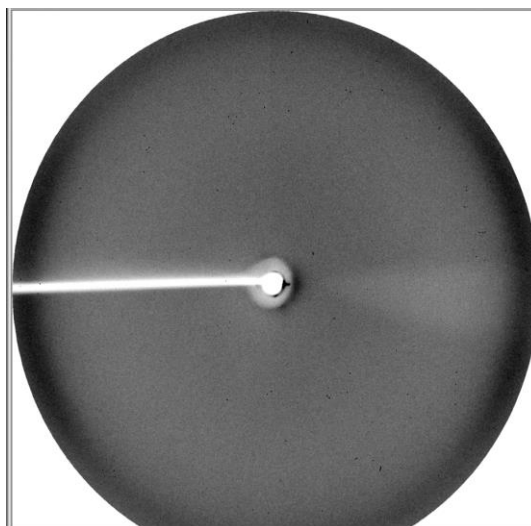


Fonte: A Autora.

Foram submetidos à coleta de difração o cristal em destaque na Figura 7a e um cristal da Figura 7b. Nenhum cristal permitiu uma coleta de dados de difração de raios X. Portanto, devido ao tamanho diminuto e ao aspecto desordenado, nenhum cristal da Figura 7c foi submetido à difração de raios X.

A Figura 9 mostra a imagem obtida após o experimento de difração com o cristal destacado na Figura 8a. A inexistência de reflexões na imagem é um forte indício de que se trata de cristal de proteína, porém, desordenado. Cristais de sal em sua maioria, mesmo que pequenos ou com átomos não totalmente organizados, apresentam padrão de difração de raios X. Os testes realizados com radiação ultravioleta com os cristais da Figura 8a, b e c apresentaram fluorescência, corroborando com os dados de raios X no sentido de que tratam de cristais de proteína e não de sal. Os cristais de proteínas contêm grupos excitáveis que são as cadeias laterais do triptofano e da tirosina na faixa Ultravioleta que reemitem essa radiação em energias menores de forma não-ressonante, fenômeno conhecido como fluorescência intrínseca e permite sua inspeção visual, diferenciando assim os cristais de proteínas daqueles constituídos de sais, que não têm tal propriedade (CALDEIRA *et al.*, 2010).

Figura 9. Imagem de difração obtida para o cristal maior da Figura 7a.



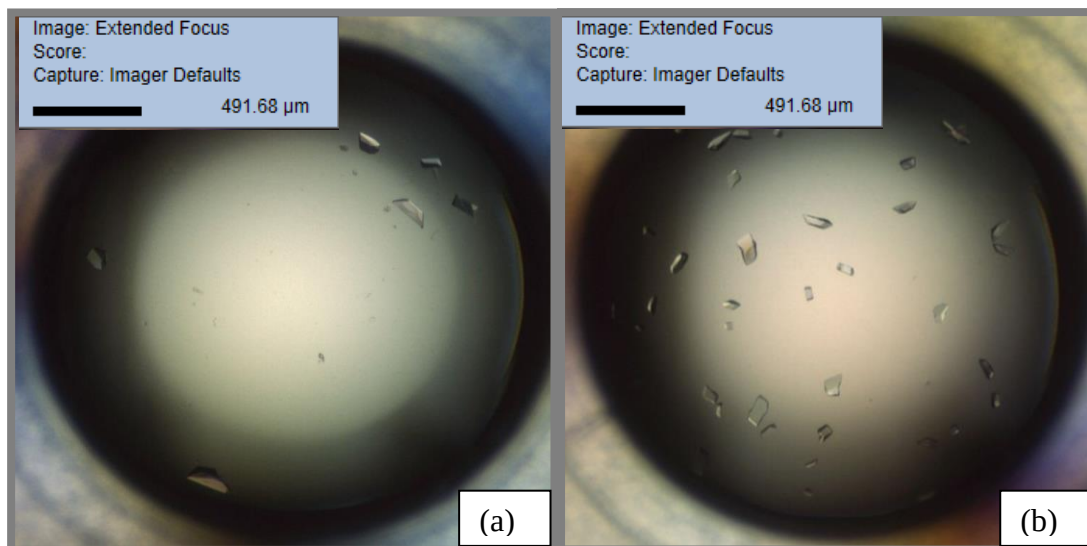
Fonte: A Autora.

Assim, a partir dos resultados preliminares destes experimentos, foi possível determinar quais as condições mais favoráveis para a cristalização. As proteínas homólogas à TcUH, que já foram cristalizadas, depositadas com código PDB 1UWK e 2FKN (KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004; YU; LIANG; SU, 2006) também utilizaram o PEG como agente precipitante. Essa informação reforça que novos experimentos da TcUH devem ser realizados

com este agente precipitante. Então, estas condições foram submetidas a melhoramento (refinamento). Foram testadas outras 96 condições, também nas concentrações proteicas de 5,0, 7,5 e 10 mg mL⁻¹. O volume da gota e da solução de proteína foram os mesmos, ou seja, 0,7 µL. Variações foram feitas nos agentes precipitantes (PEGs 1.500 e 8.000), suas concentrações (12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 e 26 %) e na concentração do glicerol (16 a 22 %). Em boa parte das condições testadas cresceram cristais, porém, os melhores em relação ao tamanho surgiram na concentração proteica de 5 mg mL⁻¹ em apenas 2 condições: (a) 0,04 mol L⁻¹ dihidrogenofosfato de potássio, 18 % (m/V) PEG 8.000 e 20 % (V/V) Glicerol, (b) 0,04 mol L⁻¹ dihidrogenofosfato de potássio, 16 % (m/V) PEG 8.000 e 22 % (V/V) glicerol. Cristais obtidos a partir do refinamento serão submetidos a coleta de difração de raios X.

Uma vez confirmado que se tratam de cristal de proteína, as condições de cristalização da TcUH serão novamente ajustadas. Dentre as variações experimentais a serem consideradas, está a realização do experimento a 4 °C. Não há investigações sistemáticas que demonstrem vantagens na escolha de uma temperatura específica, porém, sabe-se que a solubilidade das proteínas está relacionada com o aumento ou diminuição da temperatura e que a temperatura baixa pode ser útil para retardar o crescimento do cristal (RUPP, 2010); assim, os cristais da TcUH poderão crescer lentamente e de maneira ordenada, possibilitando a obtenção de cristais maiores. Considera-se que cristais de proteínas adequados para coleta de difração com qualidade, devem ter centenas de micrometros (µm), menores talvez para síncrotrons mais intensos, desde que bem ordenados (RUPP, 2010). Os cristais da TcUH obtidos até o momento são muito pequenos (Figura 10), mesmo para as estações correntemente disponíveis do LNLS.

Figura 10. Cristais obtidos nos experimentos realizados no LNLS a partir do refinamento dos testes preliminares da cristalização da enzima *TcUH* a 5 mg mL^{-1} . O cristal maior de cada gota apresenta dimensão aproximada de $178 \times 44 \text{ }\mu\text{m}$ e $178 \times 44 \text{ }\mu\text{m}$, (a) e (b).



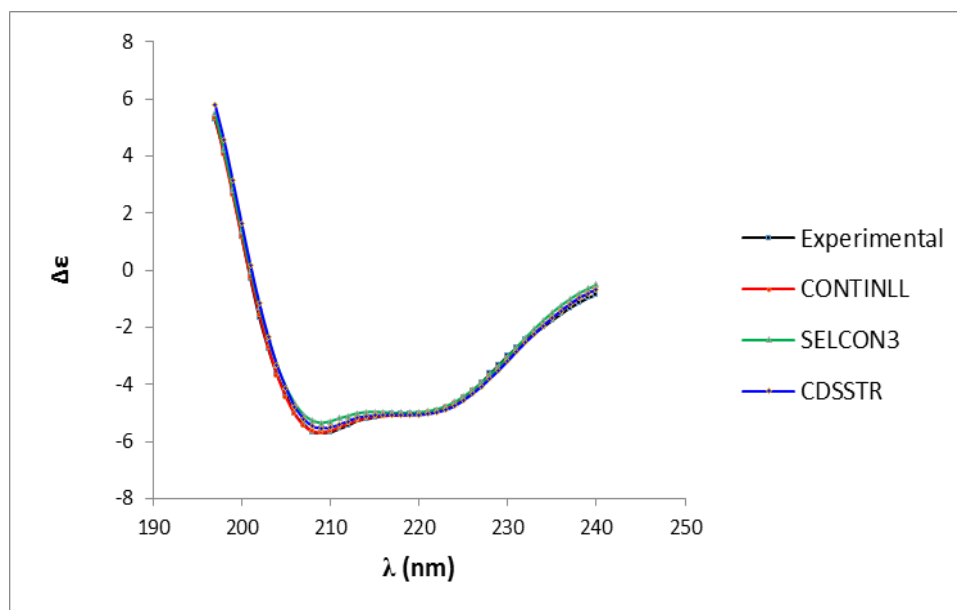
Fonte: A Autora.

4.1.3 Dicroísmo circular (CD) da *TcUH*

4.1.3.1 Cálculo da composição de estruturas secundárias e estabilidade térmica da *TcUH*

A espectroscopia de CD foi utilizada para estimar o conteúdo de estruturas secundárias. Por meio da análise do gráfico da Figura 11, pode-se identificar que a enzima *TcUH* apresenta mínimos por volta de 208 e 222 nm e uma banda positiva por volta de 195 nm. O mínimo próximo a 222 nm é atribuído a transições encontradas em estruturas helicoidais (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000). Desta forma, observa-se um espectro bem definido, característico de proteínas composta majoritariamente por hélices- α .

Figura 11. Espectro de dicroísmo circular da enzima TcUH. A legenda mostra o perfil experimental e aqueles obtidos a partir de modelos com os programas CONTINLL, SELCON3 e CDSSTR para quantidade de estruturas secundárias.



Fonte: A Autora.

A desconvolução do espectro pelos três programas utilizados indicou que a enzima TcUH é constituída de cerca de 30,0 % de hélices- α regular, 19,4 % de hélices- α desordenadas, 2,7 % de fitas- β regular e 5,1 % de fitas- β desordenadas, como pode ser visto na Tabela 2. Hélice- α é a estrutura secundária dominante de muitas proteínas, em média, 33 % dos resíduos em proteínas globulares ocorrem nessa estrutura (BEROVA; NAKANISHI; WOODY, 2000). As estruturas secundárias com porcentagem desordenadas indicadas estão de acordo com o trabalho de Sreerama e colaboradores (1999), em que os autores consideram, a média de quatro e dois resíduos distorcidos (desordenados) em hélice- α e em fitas- β respectivamente, para defini-los como desordenados.

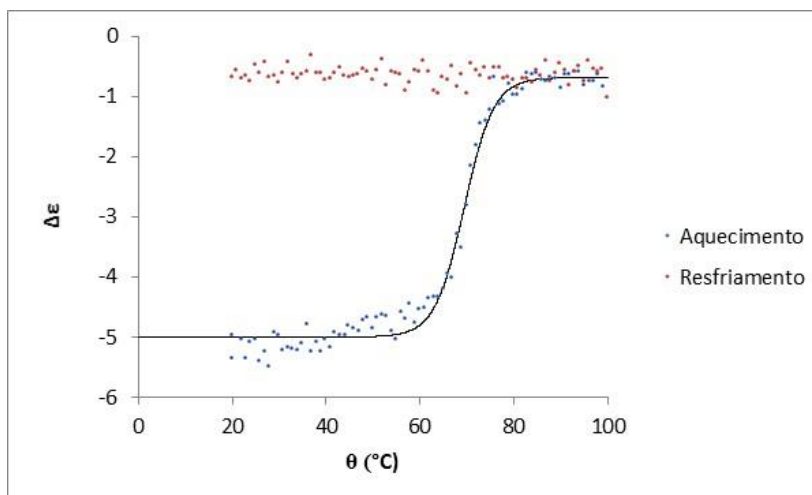
Tabela 2. Estimativas de estrutura secundária da enzima TcUH. Valores, média e desvio padrão em porcentagens obtidos a partir da desconvolução pelos programas utilizados (CONTINLL, SELCON3 e CDSSTR).

ESTRUTURAS	CONTINLL	SELCON3	CDSSTR	MÉDIA $\pm$ DP
Hélices- α (regular) (%)	28,1	26,9	35,1	30,0 $\pm$ 4,4
Hélices- α (desordenada) (%)	18,7	18,7	20,9	19,4 $\pm$ 1,3
Fitas- β (regular) (%)	2,2	2,0	4,0	2,7 $\pm$ 1,1
Fitas- β (desordenada) (%)	6,5	4,3	4,6	5,1 $\pm$ 1,2
Voltas (%)	20,6	22,2	12,9	18,6 $\pm$ 5,0
Desordenada (%)	23,9	26,3	23,3	24,5 $\pm$ 1,6

O estudo da TcUH por CD com elevação da temperatura da solução proteica (20 a 100 °C) foi utilizado para obtenção de informação a respeito da estabilidade térmica. O gráfico da Figura 12 mostra que após a temperatura atingir cerca de 50 °C a proteína inicia o seu processo de perda de estrutura secundária, aumentando assim as regiões desorganizadas, caracterizando a desnaturação da proteína. Todavia, após a desnaturação total não se reenovelou ao ser resfriada novamente à 20 °C, o que indica uma desnaturação térmica irreversível. Como apresentado na Tabela 2, a enzima em estudo apresenta quantidade significativa de porções desordenadas, sendo assim, era pouco provável que ocorresse renaturação.

A temperatura relativamente alta para início da desnaturação caracteriza uma enzima relativamente estável, do ponto de vista térmico. Os dados obtidos com o CD corroboram o valor teórico quanto à estabilidade, esta expressa como índice de instabilidade através da ferramenta ProtParam, em que a TcUH apresentou valor de 37,29. Valores maiores que 40 classificam, teoricamente, as proteínas como instáveis. O efeito estabilizador de maior quantidade de hélices- α na estrutura já foi também descrito na literatura (KUMAR; TSAI; NUSSINOV, 2000).

Figura 12. Espectro de desnaturação térmica da enzima TcUH obtido pela técnica de dicroísmo circular. Monitoramento do mínimo em 222 nm com variação da temperatura durante o aquecimento (20 a 100 °C) com resfriamento (100 a 20 °C) subsequente.



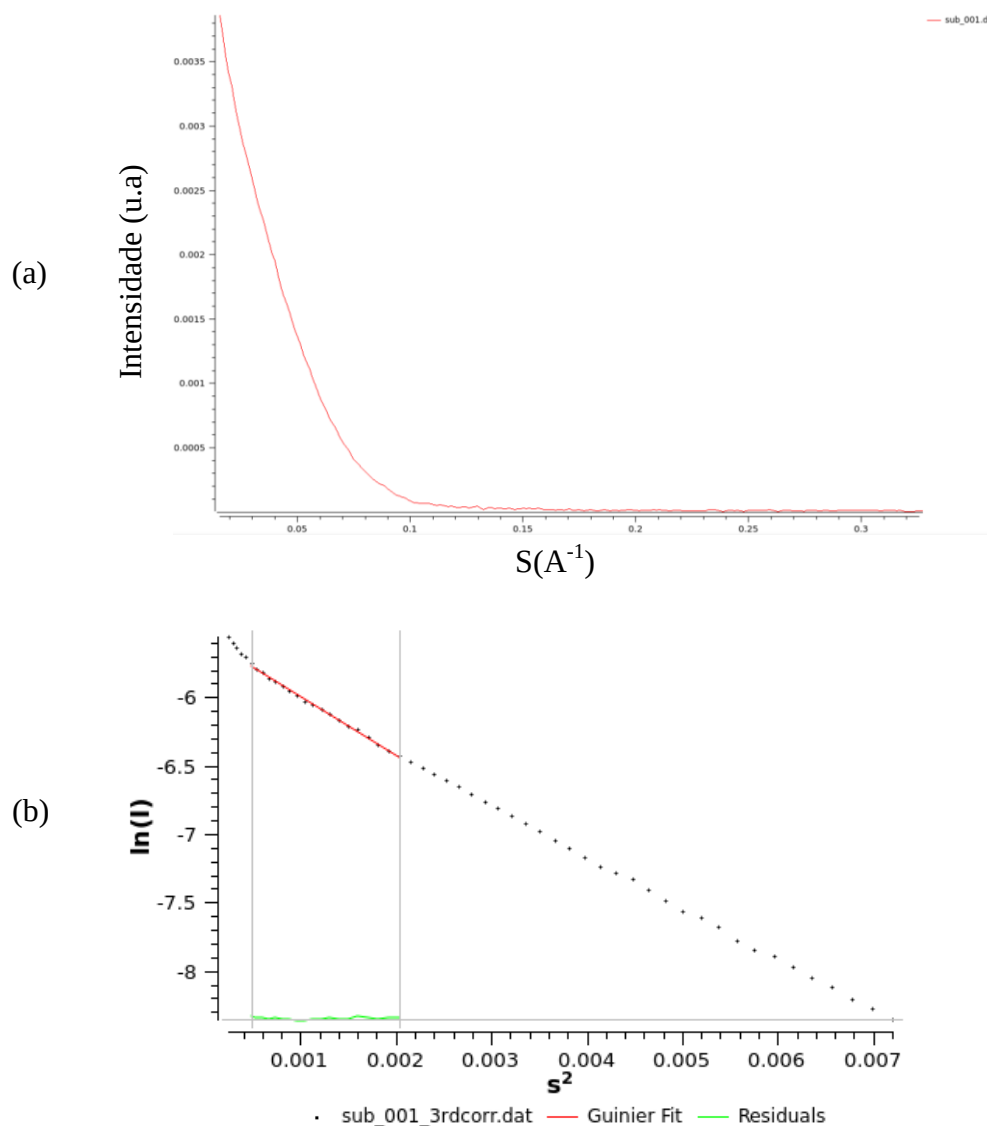
Fonte: A Autora.

4.1.4 Espalhamento de raios X a baixo ângulo

A Figura 13a mostra a curva de espalhamento de raios X, proveniente da TcUH em solução e na Figura 13b tem-se o gráfico de Guinier. Verifica-se que o raio de giro pode ser calculado com razoável qualidade, pelo programa AUTORG, valendo 35,80 Å. Esse valor,

calculado experimentalmente para a enzima em solução, está acima do calculado teoricamente para o monômero modelado por homologia, que foi estimado pelo programa CRY SOL como sendo igual a 25,73 Å.

Figura 13. (a) Curva de intensidade de espalhamento obtida da TcUH a 5 mg mL⁻¹ e (b) gráfico de Guinier.

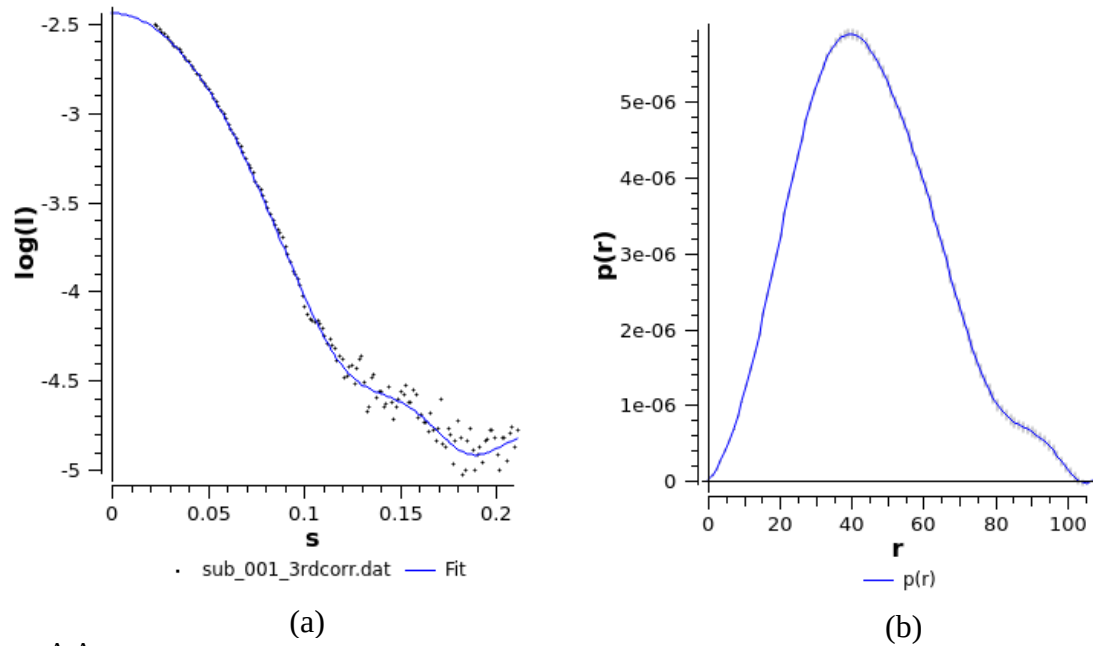


Fonte: A Autora.

Efetivamente, depois de calculada a curva de espalhamento em escala logarítmica na ordenada (Figura 14a) e a função de distribuição de distância (Figura 14b) utilizou-se o programa DAMMIN para o cálculo do envelope da enzima em solução (Figura 15) na qual se observa que em solução, nas condições de medida, a partícula deve ser um tanto maior que um simples monômero, em que pese este modelo não possuir os 87 resíduos do N-terminal. Tal resultado pode ser esperado já que sua homóloga de maior identidade apresenta-se biologicamente como dímero (KLEPP *et al.*, 1990; KESSLER; RÉTEY; SCHULZ, 2004).

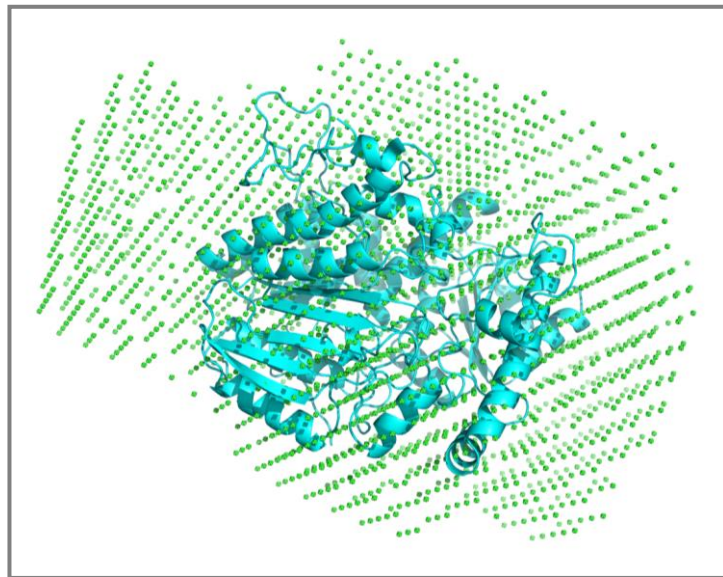
Tentativas de modelagem do dímero em tal envelope pelos programas MASSHA e OLIGOMER mostraram-se infrutíferas, todavia, o que poderia indicar eventual equilíbrio entre as duas formas em solução, levando-se em consideração inclusive a curva da figura 14b

Figura 14. (a) Curva de espalhamento em escala logarítmica na ordenada; (b) Função de distribuição de distâncias para a TcUH.



Fonte: A Autora.

Figura 15. Sobreposição do modelo por homologia com o modelo de esferas para a partícula em solução. Imagem obtida por meio do programa Pymol.



Fonte: A Autora.

4.2 PROCEDIMENTOS COMPUTACIONAIS

4.2.1 Construção do modelo

4.2.1.1 Busca por proteínas homólogas e alinhamento das sequências

Na ausência de dados experimentais de alta resolução sobre a estrutura 3D da TcUH, foi dada sequência ao trabalho por meio da técnica de modelagem molecular comparativa.

Por meio da ferramenta BLAST, foram identificadas 14 proteínas homólogas, de 10 diferentes organismos. Com a ferramenta MHOLline os modelos foram classificados com pontuação BATS para apenas 6 estruturas, das quais 3 de organismos diferentes. Assim, a seleção dos moldes levou ao uso de estruturas de 3 diferentes organismos, como sugeridas pelo MHOLline, e de maior resolução entre as repetidas desde que contivesse os ligantes, (Tabela 3).

O grau de identidade entre as proteínas homólogas usadas para modelagem e a alvo foram sempre superiores a 34 %. Sequências de resíduos de aminoácidos de proteínas com cerca de 25 % de identidade ou superior podem ser utilizadas para construir um modelo para a proteína alvo (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Tabela 3. Dados das proteínas homólogas à enzima TcUH, obtidos a partir de alinhamentos feito com as estruturas depositadas no PDB.

Código	Resolução (Å)	Proteína/Organismo	Cobertura (%)	Identidade (%)
1UWK	2,23	Urocanase/ <i>Pseudomonas putida</i>	81	36
2FKN	2,20	Urocanase/ <i>Bacillus subtilis</i>	79	35
1X87	2,40	Urocanase/ <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	81	36

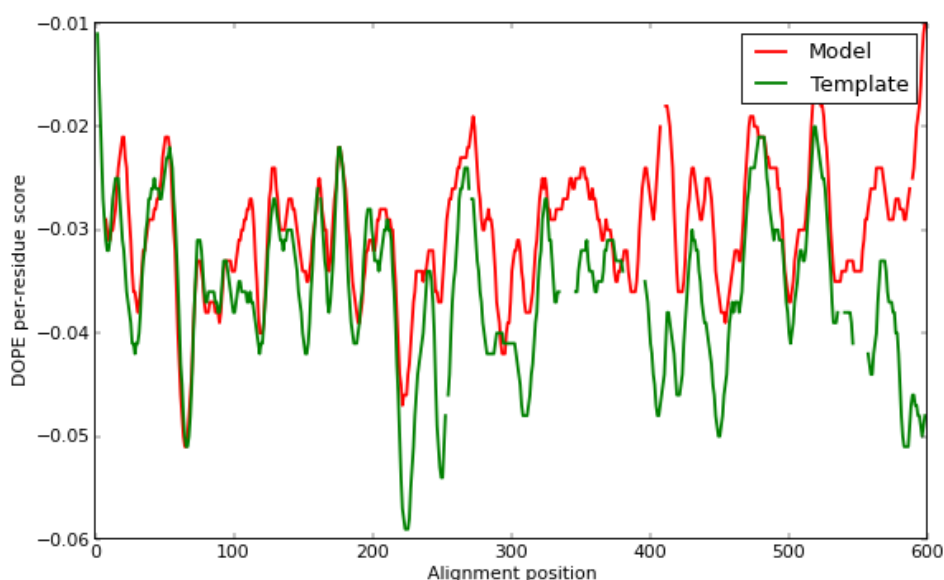
Fonte: A Autora.

O alinhamento feito pelo programa computacional T-coffee está apresentado na Figura 16. Acima das sequências das estruturas, em vermelho, há a representação das estruturas secundárias, com setas representando fitas- β e cilindros representando hélices- α . Note-se que os 87 primeiros resíduos do N-terminal da TcUH não se alinham com qualquer trecho disponível das estruturas molde, assim, essa região não foi modelada.

4.2.1.2 Construção propriamente dita e avaliação dos modelos gerados

Com o programa computacional Modeller, foram construídos 300 modelos, sem os 87 primeiros resíduos da posição N-terminal, como citado anteriormente, que foram avaliados por meio do escore DOPE, do escore GA341 e do gráfico de Ramachandran. Foi escolhido o modelo que apresentou valor mais negativo para a função de energia DOPE normalizado e cujos poucos resíduos que se apresentassem em regiões desfavoráveis no gráfico de Ramachandran não fossem constituintes do sítio ativo. Assim, a estrutura escolhida apresentou DOPE normalizado igual a -0,272 e seu perfil energético, para este escore, pode ser visto na Figura 17 junto com o do molde 1UWK, no qual foi baseada a modelagem dos ligantes.

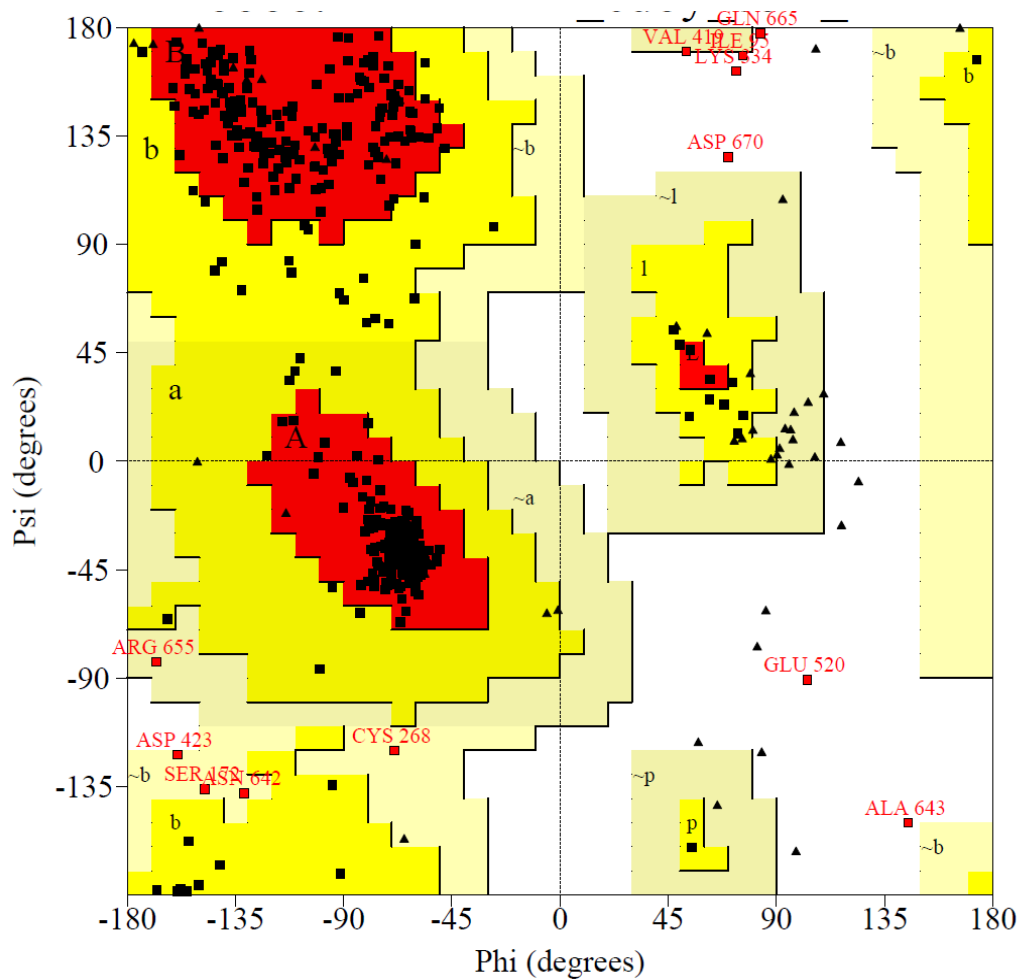
Figura 17. Gráfico de pontuação por resíduo do modelo construído com melhor valor DOPE em comparação à estrutura de maior homologia.



Fonte: A Autora.

O gráfico de Ramachandran (Figura 18) indica que 87,2 % dos aminoácidos estão em regiões mais favoráveis, 10,4 % nas regiões adicionalmente permitidas, 1,0 % nas regiões desfavoráveis e 1,4 % proibidas.

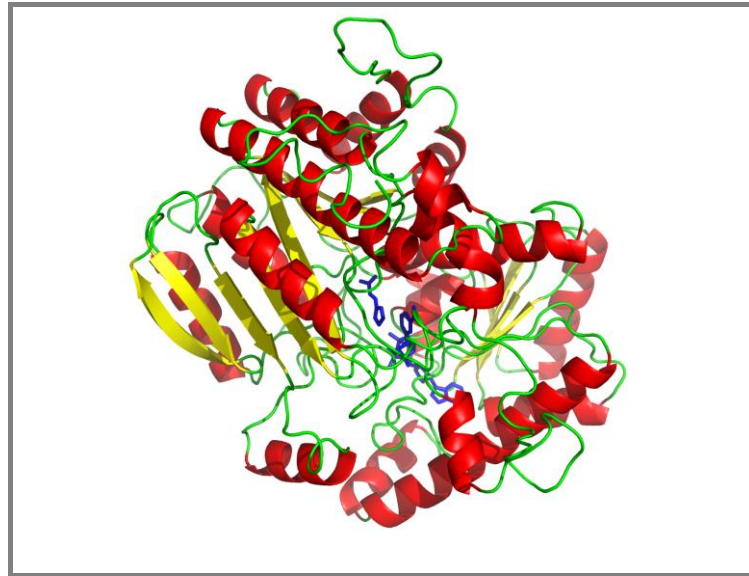
Figura 18. Gráfico de Ramachandran para o melhor modelo da enzima TcUH. As glicinas são representadas por triângulos e os demais aminoácidos por quadrados. As áreas em vermelho são chamadas de regiões muito favoráveis; em amarelo de regiões favoráveis; em bege de regiões generosamente favoráveis e em branco de regiões desfavoráveis. Figura gerada por meio do programa Procheck.



Fonte: A Autora.

O modelo final da TcUH apresentou uma organização estrutural contendo hélice- α (cor vermelha), folha- β (cor amarela), “loops” ou alças (cor verde) e os ligantes (NAD^+ e urocanato) na cor azul, como demonstrado na Figura 19. A análise feita por meio da ferramenta Pdbsum explicita os elementos da estrutura secundária, indicando que o modelo da TcUH apresenta 22 hélices- α (representadas em vermelho, Figura 20) e 17 fitas- β (representadas em rosa).

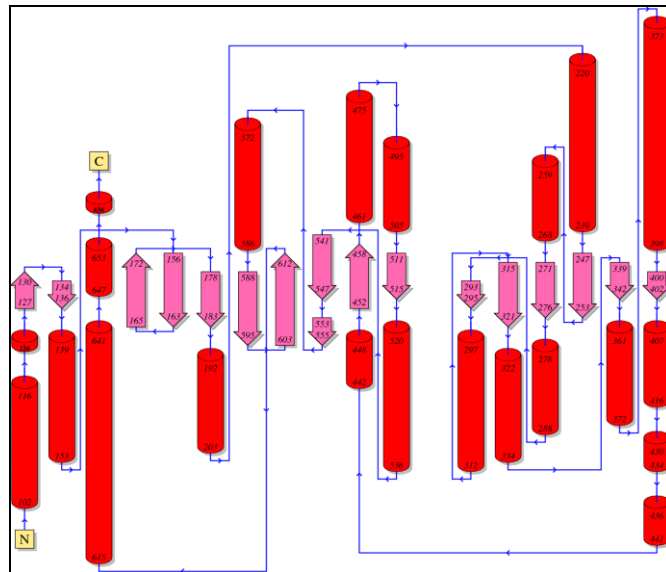
Figura 19. Estrutura da enzima TcUH obtida por modelagem por homologia. As hélices- α estão representadas em cor vermelha, as fitas- β em cor amarela, os loops ou alças em cor verde e os ligantes (NAD^+ e urocanato) em cor azul. Figura produzida com o programa Pymol.



Fonte: A Autora.

A estrutura tridimensional da proteína determinada por homologia possui 588 resíduos, sendo que 221 destes estão em estruturas secundárias de hélice- α enquanto que 72 em folha- β , de acordo com os cálculos feitos com o programa DSSP, sendo assim, 37,58 % de hélice- α e 12,24 % de folha- β em relação a este comprimento. Os dados de CD indicam uma porcentagem de 49 % de hélices- α e 7,8 % de fitas- β . Todavia, deve-se lembrar que a enzima que foi submetida ao CD apresenta na região N-terminal o acréscimo dos 87 primeiros resíduos mais 6 resíduos de histidinas que não foram modelados, gerando alguma distorção nas porcentagens estimadas.

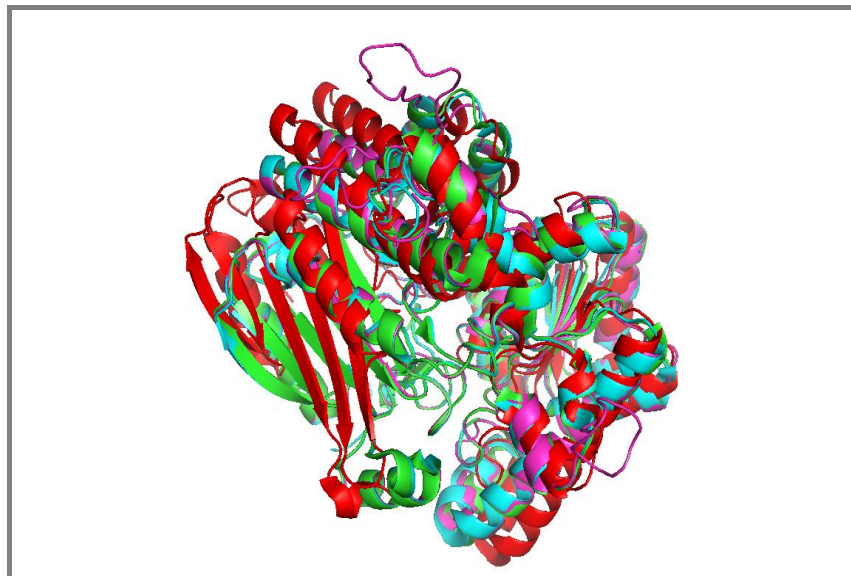
Figura 20. Diagrama de topologia do modelo obtido da enzima TcUH. Em forma de bastão vermelho estão as hélices- α e em setas rosas as fitas- β . Figura gerada por meio da ferramenta ProtParam.



Fonte: A Autora.

As estruturas com códigos do PDB 1UWK, 1X87 e 2FKN são representadas em sobreposição ao modelo da TcUH obtido (Figura 21). Pode-se notar que o modelo gerado, quando comparado visualmente com os modelos tridimensionais das estruturas homólogas, apresenta boa sobreposição, não indicando grande quantidade de elementos estruturais desorganizados.

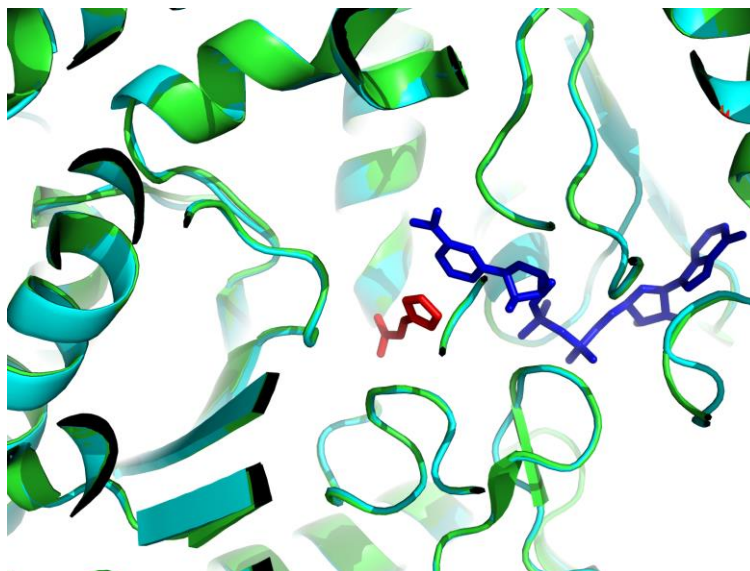
Figura 21. Sobreposição da estrutura da TcUH com as estruturas homólogas utilizadas para construção do modelo por homologia. TcUH em rosa, 1UWK em azul, 2FKN em verde e 1X87 em vermelha. Figuras produzidas com o programa Pymol.



Fonte: A Autora.

O NAD^+ (cofator) e o urocanato (substrato), inseridos também durante a modelagem, são destacados, no modelo, na Figura 22.

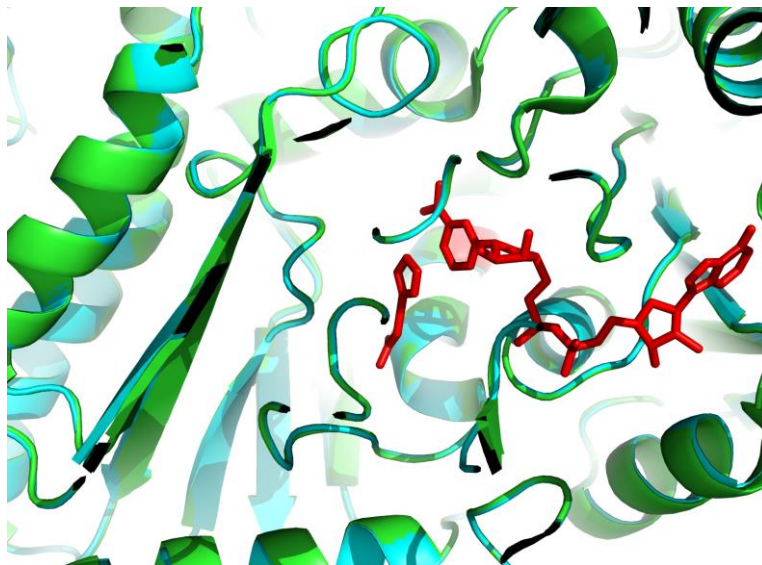
Figura 22. Imagem destacando os ligantes inseridos durante a modelagem por homologia. O NAD^+ está representado em azul e o urocanato em vermelho. Figuras produzidas com o programa Pymol.



Fonte: A Autora.

A estrutura 1UWK foi sobreposta ao modelo da *TcUH* para avaliá-lo quanto à constituição do sítio catalítico (Figura 23). A sobreposição das estruturas mostrou que, tanto o NAD^+ quanto o urocanato, presentes nos sítios de ligação, ficaram exatamente em mesma posição.

Figura 23. Sobreposição das estruturas das enzimas *TcUH* e 1UWK para visualização da constituição do sítio catalítico. Em vermelho estão os ligantes da *TcUH*. Os ligantes da 1UWK estão totalmente sobrepostos. Figura gerada com o programa Pymol.



Fonte: A Autora.

4.2.2 Análise dos contatos com os ligantes

A Tabela 4, construída com dados do programa ncont, traz um resumo dos contatos do urocanato na estrutura da *TcUH*. Esses dados são comparados com a estrutura com maior identidade sequencial depositada no PDB (1UWK). Os resíduos de interação até 4 Å estão listados.

Tabela 4. Aminoácidos que interagem com o substrato urocanato na estrutura tridimensional obtida por modelagem por homologia da TcUH.

TcUH	1UWK
130 Tirosina	52 Tirosina
...	131 Glicina
210 Metionina	132 Metionina
211 Treonina	133 Treonina
217 Tirosina	139 Tirosina
222 Glicina	144 Glicina
223 Isoleucina	145 Isoleucina
257 Metionina	178 Metionina
454 Arginina	362 Arginina
547 Aspartato	443 Aspartato
559 Arginina	...
597 Glicina	493 Glicina
676 NAD	558 NAD

Fonte: A Autora.

Pode-se notar que, com exceção de dois aminoácidos, todos os contatos do substrato (urocanato) se conservam em relação ao sítio catalítico.

4.2.3 Docagem

No início dos cálculos de docagem é necessário fazer algumas identificações e escolhas, como por exemplo, a identificação do sítio de ligação e determinação do tamanho da caixa onde os cálculos de afinidade e interação serão realizados, de forma que todos os resíduos de aminoácidos importantes para a inibição sejam incluídos.

No tocante ao *redocking* do urocanato, o complexo modelado foi dividido e o processo realizado. Depois de obtido o complexo virtual, este foi comparado com o complexo modelado original. O resultado do *redocking* não levou à reconstrução deste complexo e o motivo deve ser a não pontuação para as interações tipo empilhamento π - π por parte do AutoDock Vina, o que implicaria em ação junto à função de pontuação. Porém, para efeito de análise inicial, decidiu-se mesmo assim avaliar com as funções de pontuação convencionais o comportamento computacional de algumas moléculas disponíveis de colaboradores para

formação do complexo proteína-ligante. Na Tabela 5, estão os valores das energias obtidos para todas as moléculas testadas.

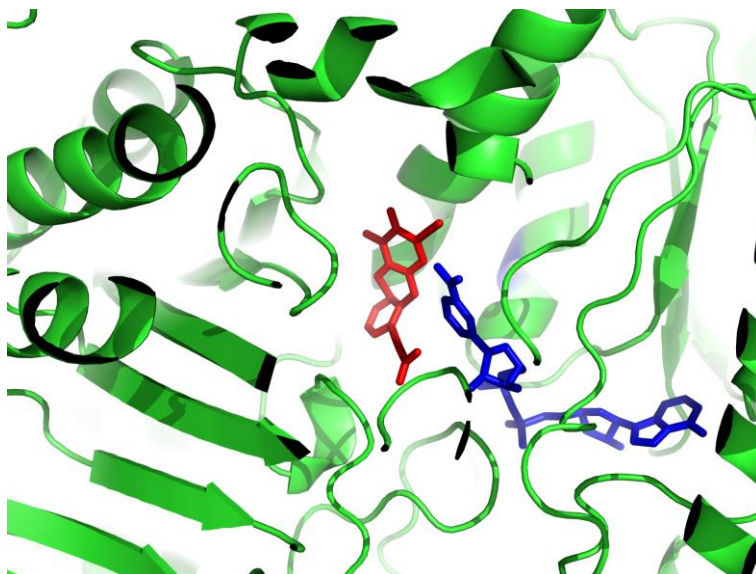
Tabela 5. Resultado da docagem da TcUH.

LIGANTES	MENOR ENERGIA DE LIGAÇÃO DO MAIOR AGRUPAMENTO / kcal mol ⁻¹
Urocanato	-5,7
Dom1	-5,1
Dom4	-2,6
Dom2	-0,5
Luc1	0,7
Luc2	0,7
Luc3	9,3
Jul1	14,7
Jul6	15,6
Jul5	16,0
Jul3	16,1
Dom3	16,2
Jul2	16,7
Jul4	18,0
Luc4	23,0

Fonte: A Autora.

Os cálculos de docagem indicaram que, com exceção das 4 primeiras que são listados na tabela, não é possível a formação de complexo entre os compostos testados e a enzima TcUH em condições padrão. A Figura 24 mostra a imagem representativa da docagem com a molécula de melhor interação (Dom1) no sítio ativo da TcUH. Vale ressaltar ainda que um estudo mais detalhado, mediante dinâmica molecular, com as moléculas, deverá ser feito a fim de obter informações mais detalhadas sobre os complexos.

Figura 24. Forma prevista do modo de ligação do composto Dom1, no sitio ativo da enzima *TcUH*. A molécula está representada em vermelho e em azul está o NAD⁺. Figura gerada com o programa Pymol.



Fonte: A Autora.

5 CONCLUSÕES

- A expressão e purificação ocorreram de maneira satisfatória, provendo quantidade suficiente da enzima *TcUH* ativa para os demais estudos que foram realizados neste trabalho;
- Os ensaios de cristalização permitiram a obtenção de cristais de proteínas, porém não adequados ainda para coleta de dados de difração de raios X.
- Por meio da técnica de dicroísmo circular pode-se concluir que a enzima estudada apresenta maior quantidade de estruturas secundárias em hélices- α , além de que inicia seu processo de desnaturação térmica em temperatura próxima de 50 °C.
- O envelope calculado para a enzima, através da técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo, permitiu identificar que a mesma em solução não se apresenta como monômero.
- A enzima teve sua estrutura modelada computacionalmente. O modelo consta de 588 resíduos na presença do NAD^+ e do urocanato.
- O estudo de docagem indicou algumas prováveis moléculas com interação favorável a partir do sítio ativo da *TcUH*.

6 TRABALHOS FUTUROS

- Novos ensaios de atividade enzimática poderão ser realizados, com aprimoramento, para determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$, abrindo a perspectiva de utilização da mesma em ensaios para busca de inibidores *in vitro*.
- Ensaios de cristalização deverão ser realizados visando a obtenção de cristais maiores para possível coleta de dados de difração e resolução de estrutura.
- Outros testes por meio da técnica de dicroísmo circular poderão ser feitos objetivando testar aditivos ou agentes crioprotetores em relação à estabilização da estrutura secundária quando submetidas à elevação de temperatura. Também, poderão ser determinadas as interações proteína-ligante e se estas são capazes de alterar a conformação estrutural.

REFERÊNCIAS

ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 274-9, 2007.

ATWOOD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/309/5733/473.abstract> >.

BARTON, G. J. ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. **Protein Engineering**, v. 6, n. 1, p. 37-40, 1993. Disponível em: < <http://peds.oxfordjournals.org/content/6/1/37.short> >.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular Dichroism: Principles and Applications**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

BOIANI, M.; GONZALEZ, M. Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 409-424, 2005. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/79735/article> >.

BOND, C. S.; SCHÜTTELKOPF, A. W. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 65, n. Pt 5, p. 510-512, 2009. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/19390156> >.

CALDEIRA, A. O.; CASTRO, A. R. B.; BARBOSA, C. A.; MATSUO, E.; ZAWISLAK, F. C.; COSTA, F. F.; BETTINI, J.; FILHO, J. E. R.; MELO, L. C. P.; RAUPP, M. A.; WONGTSCHOWSKI, P.; GALVAO, R. M. O.; BARBOSA, R. R.; LEITE, R. C. C. Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron - ABTLuS - Plano Diretor. Campinas, 2010. Disponível em: < [http://www.cnpem.br/wp-content/documents/Plano Diretor 10 16](http://www.cnpem.br/wp-content/documents/Plano_Diretor_10_16) >.

CASE, D. A.; DARDEN, T. A.; CHEATHAM, T. E.; SIMMERLING, I., C.L. ; WANG, J.; DUKE, R. E.; LUO, R.; WALKER, R. C.; ZHANG, W.; MERZ, K. M.; ROBERTS, B.; HAYIK, S.; ROITBERG, A.; SEABRA, G.; SWAILS, J.; GOETZ, A. W.; KOLOSSVÁRY, I.; WONG, K. F.; PAESANI, F.; VANICEK, J.; WOLF, R. M.; LIU, J.; WU, X.; BROZELL, S. R.; STEINBRECHER, T.; GOHLKE, H.; CAI, Q.; YE, X.; WANG, J.; HSIEH, M. J.; CUI, G.; ROE, D. R.; MATHEWS, D. H.; SEETIN, M. G.; SALOMON-FERRER, R.; SAGUI, C.; BABIN, V.; LUCHKO, T.; GUSAROV, S.; KOVALENKO, A.; KOLLMAN, P. A. **AMBER 12**. San Francisco: University of California 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze 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. 195-218, 1909. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=en&nrm=iso >.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, p. S4-S5, 2010. Disponível em: < http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/full/nature09220.html >.

COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010. Disponível em: < http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301_supp/full/nature09221.html >.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos: DeLano Scientific 2002.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 370-375, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000400010&nrm=iso >.

DÍAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01941187> >.

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

DUNDAS, J.; OUYANG, Z.; TSENG, J.; BINKOWSKI, A.; TURPAZ, Y.; LIANG, J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Web Server issue, p. W116-W118, 2006. Disponível em: < <http://10.1093/nar/gkl282> >.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 19-51, 2007. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/77649/article> >.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; ERAMIAN, D.; SHEN, M. Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using

Modeller. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 5, p. 2.9.1–2.9.31, 2006. Disponível em: < <http://10.1002/0471140864.ps0209s50> >.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WIKKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. New York: Humana Press, 2005. p.571-607.

GE, H. L. S., 2013. Disponível em: < <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/Home/pt/GELifeSciences/> >.

GEORGE, D. J.; PHILLIPS, A. T. Identification of alpha-Ketobutyrate as the Prosthetic Group of Urocanase from *Pseudomonas putida** **The Journal of Biological Chemistry** v. 245, n. 3, p. 528-537, 1970. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/245/3/528.full.pdf> >.

HUG, D. H.; O'DONNELL, P. S.; HUNTER, J. K. Thioglycolate, competitive inhibitor of urocanase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 81, n. 4, p. 1435-42, 1978. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91296-2](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(78)91296-2) >.

HUG, D. H.; ROTH, D. Inhibition of urocanase by cupric ion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 293, n. 2, p. 497-505, 1973. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005274473903562> >.

JOHN, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 14, p. 3982-3992, 2003. Disponível em: < <http://nar.oxfordjournals.org/content/31/14/3982.abstract> >.

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. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bip.360221211> >.

KAPPAGODA, S.; IOANNIDIS, J. P. A. Neglected tropical diseases: survey and geometry of randomised evidence. **BMJ**, v. 345, p. e6512 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.e6512> >.

KESSLER, D.; RÉTEY, J.; SCHULZ, G. E. Structure and Action of Urocanase. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 1, p. 183-194, 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604008551> >.

KLEE, C. B.; LA JOHN, L. E.; KIRK, K. L.; COHEN, L. A. 2-Fluorourocnic Acid, a potent reversible inhibitor of Urocanase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 75, n. 3, p. 674-681, 1977. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X7791525X> >.

KLEPP, J.; FALLERT-MULLER, A.; GRIMM, K.; HULL, W. E.; RETEY, J. Mechanism of action of urocanase. Specific ¹³C-labelling of the prosthetic NAD⁺ and revision of the structure of its adduct with imidazolylpropionate. **Eur J Biochem**, v. 192, n. 3, p. 669-76, 1990. Disponível em: < <http://10.1111/j.1432-1033.1990.tb19274.x> >.

KOBERSTAEDT, A.; LENZ, M.; RETEY, J. Isolation, sequencing and expression in *E. coli* of the urocanase gene from white clover (*Trifolium repens*). **Federation of European Biochemical Societies**, v. 311, n. 3, p. 206-208, 1992. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81103-S](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)81103-S) >.

KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. MASSHA - a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, n. 4, p. 527-532, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889801006100> >.

KONAREV, P. V.; VOLKOV, V. V.; SOKOLOVA, A. V.; KOCH, M. H. J.; SVERGUN, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 5, p. 1277-1282, 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889803012779> >.

KUMAR, S.; TSAI, C.-J.; NUSSINOV, R. Factors enhancing protein thermostability. **Protein Engineering**, v. 13, n. 3, p. 179-191, 2000. Disponível em: < <http://peds.oxfordjournals.org/content/13/3/179.abstract> >.

LAEMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> >.

LANE, R. S.; SCHEUER, S. A.; THILL, G.; DYLL, R. J. Irreversible inactivation of Urocanase by 4-Bromocroton. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 71, n. 1, p. 400-407, 1976.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889892009944> >.

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

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol**, v. 100, n. 8, p. 663-77, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/136485906X112248> >.

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. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600940427> >.

OMS, O. M. D. S.-. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2013. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >.

PAES, L. S.; MANTILLA, B. S.; BARISON, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 17, p. 2074-2099, 2011. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/74882/article> >.

PARK, Y.; SHEETLIN, S.; MA, N.; MADDEN, T.; SPOUGE, J. New finite-size correction for local alignment score distributions. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-5-286> >.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA--an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. **J Comput Aided Mol Des**, v. 18, n. 3, p. 167-73, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15368917> >.

RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060061X> >.

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

RUPP, B. **Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology**. 1. ed. New York: Garland Science, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

SANNER, M. F. A Component-Based Software Environment for Visualizing Large Macromolecular Assemblies. **Structure**, v. 13, n. 3, p. 447-462, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212605000626> >.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. D. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253-259, 2003. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000200019&nrm=iso >.

SHATSKY, M.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. MultiProt — A Multiple Protein Structural Alignment Algorithm. In: GUIGÓ, R. e GUSFIELD, D. (Ed.). **Algorithms in Bioinformatics**. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v.2452, 2002. cap. 18, p.235-250. (Lecture Notes in Computer Science).

SILBER, A. M.; COLLI, W.; ULRICH, H.; ALVES, M. J.; PEREIRA, C. A. Amino acid metabolic routes in Trypanosoma cruzi: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777198> >.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269700948802> >.

SREERAMA, N.; VENYAMINOV, N.; WOODY, R. W. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science**, v. 8, n. 2, p. 370-380, 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1110/ps.8.2.370> >.

SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 6, p. 768-773, 1995. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889895007047> >.

SVERGUN, D. I. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879-2886, 1999. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349599774436> >.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334> >.

TURRENS, J. F.; WATTS JR, B. P.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 125-129, 1996. Disponível em: <
<http://idc311-www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685196027223> >.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901001539> >.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492203002411> >.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry : Student Solutions Manual**. 1. ed. Chichester: Wiley & Sons, 1990.

YU, Y. M.; LIANG, Y. H.; SU, X. D. Crystal Structure of Urocanase from *Bacillus Subtilis*. 2006. Disponível em: <
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/literature.do?structureId=2FKN&bionumber=1> >.