

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR)  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE (CCBS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR (PPGGEv)

ALAN RAPHAEL FARIAS KLEIN DE MORAES

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA DELTA-1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO  
DESIDROGENASE DE *Trypanosoma cruzi***

SÃO CARLOS, SP  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR)  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE (CCBS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR (PPGGEv)

ALAN RAPHAEL FARIAS KLEIN DE MORAES

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA DELTA-1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO  
DESIDROGENASE DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

SÃO CARLOS, SP  
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M827c Moraes, Alan Raphael de Farias Klein  
Caracterização biofísica da delta-1-pirrolina-5-  
carboxilato desidrogenase de Trypanosoma cruzi /  
Alan Raphael de Farias Klein Moraes. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
102 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Delta-1-Pirrolina-5-  
Carboxilato Desidrogenase. 3. Doença de Chagas. 4.  
Biologia Estrutural. I. Título.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Alan Raphael de Farias Klein Moraes, realizada em 28/07/2016:

---

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann  
USP

---

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal  
UFSCar

---

Prof. Dr. Andrei Leitão  
IQSC/USP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que me apoiou incansavelmente durante toda a minha formação e aos meus queridos avós, Adalberto e Eliete.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Wilson e Dieine, e ao meu irmão Níkolás, pelos conselhos, apoio e suporte em diversos momentos, que foi fundamental para o meu desenvolvimento, e a conclusão desta etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann, pela confiança e dedicação mostrados durante o decorrer do projeto, pela sua preocupação, não apenas com o trabalho, mas com o meu desenvolvimento pessoal, e por ter aceitado o desafio de me orientar durante este projeto.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, ao Dr. Brian Mantilla, e à equipe do Laboratório de Parasitologia do ICB-USP, pelo o apoio, paciência e amizade durante este período de colaboração.

Aos Doutores Vitor Serrão, Ivan Silva, Marco Tulio da Silva e Tatiana Watanabe, pela paciência, críticas, ensinamentos e dicas que enriqueceram meu aprendizado em diversas ocasiões.

Aos Técnicos dos laboratórios do Grupo de Cristalografia e do Grupo de Biofísica, pelo auxílio durante os experimentos.

Aos meus colegas e amigos, Adriano, Fernandes, Diego Leonardo, Jéssica Fernandes e Paola Lanzoni, pelo auxílio e pelas discussões enriquecedoras durante as longas noites no laboratório.

Também aos meus colegas e não menos amigos, Ana Laura, Gabriela Sarro, Jéssica Bonomo, Natália Belline, Renata Porto e Thomás Santos, que em diversas ocasiões me motivaram e ensinaram, sem perceber, sobre dedicação e companheirismo.

Ao Grupo de Cristalografia e ao IFSC pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de São Carlos e da Universidade de São Paulo que ministraram aulas, seminários ou apenas contribuíram com suas opiniões no projeto durante seu desenvolvimento.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo financiamento da pesquisa desenvolvida.

À todos estes e outros mais que direta ou indiretamente contribuíram para a existência deste trabalho, meu sincero

MUITO OBRIGADO!

*“O mistério gera curiosidade e a curiosidade é a base do desejo humano para compreender”*

**Neil Armstrong**

## RESUMO

A Doença de Chagas é uma enfermidade que afeta a população presente nos países da América Latina e é classificado pela Organização Mundial da Saúde como uma Doença Tropical Negligenciada. A Doença de Chagas é causada pelo parasita flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à mesma família dos parasitas *Trypanosoma brucei* e a *Leishmania sp.*, organismo que possui um complexo ciclo de vida, passando de um hospedeiro invertebrado para um vertebrado. Para sobreviver e proliferar nessa mudança de hospedeiro, o *T. cruzi* precisa se adaptar a estresses oxidativo-redutivos e osmóticos, mudanças da composição iônica do ambiente e mudanças na fonte de energia. Para realizar essas mudanças, o aminoácido L-prolina apresenta uma importante participação que afeta o ciclo de vida do parasita como suporte no metabolismo mitocondrial, invasão de células hospedeiras e na metaciclo-gênese. A 1-Delta-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase de *T. cruzi* (*TcP5CDH*) está envolvida no catabolismo da prolina tendo um papel importante na sua conversão através da transformação da pirrolina-5-carboxilato em L-glutamato (a segunda etapa da via) e, assim, parece ser um alvo molecular promissor para desenvolvimento de novos fármacos. A sequência de aminoácidos da P5CDH foi utilizada para análises de conservação, predição de estruturas secundárias, identificação de domínios funcionais e modelos computacionais da estrutura terciária através das técnicas de Modelagem por Homologia e Ancoramento Molecular. A *TcP5CDH* (MW: 60 kDa) foi expressa de forma heteróloga em *Escherichia coli*, purificada por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular e, em seguida, concentrada, resultando em aproximadamente 2 mg/L de expressão. Os experimentos de Espalhamento Dinâmico da Luz foram realizados com a P5CDH recombinante nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL e apresentaram uma massa molecular aparente de 223,4 kDa (Rh: 12,01 nm), 246,4 kDa (Rh: 12,53 nm), 310,5 kDa (Rh: 13,83 nm) e 312,0 kDa (Rh: 12,13,86 nm), respectivamente. A Espectroscopia de Dicroísmo Circular foi realizada utilizando 0,2 mg/mL da *TcP5CDH* e com a proteína na presença de 100  $\mu$ M de NAD<sup>+</sup>, L-Glu e do inibidor Dissulfiram, apresentando uma T<sub>m</sub> 60,01 °C, 59,76 °C, 57,76 °C e 58,18 °C, respectivamente. Além disso, uma deconvolução foi realizada mostrando que a *TcP5CDH* possui 23% de alfa-hélices, 12,3% de folhas-beta antiparalelas, 12,4% de folhas-beta paralelas, 18,3% de voltas e 41,7% de regiões desorganizadas. Estes resultados irão contribuir no entendimento da via da L-prolina em *T. cruzi* e no possível desenvolvimento futuro de novos fármacos.

**Palavras-chaves:** *Trypanosoma cruzi*, Delta-1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase, Biologia Estrutural. Doença de Chagas.

## ABSTRACT

Chagas Disease is a sickness that affects the population present of Latin America and it is classified by the World Health Organization as a Neglected Tropical Diseases. Chagas disease is caused by the flagellated parasite *Trypanosoma cruzi*, which belong to the same family as *Trypanosoma brucei* and *Leishmania sp.*, and has a complex life cycle, going from an invertebrate host to a vertebrate one. In order to survive and proliferate in these host changes, *T. cruzi* must adapt itself to osmotic and oxidative stresses, changes in the environmental ion composition and shifts in energy sources. To perform this adaptation, the amino acid L-proline has presented an important and essential participation that affects the protozoan life cycle, such as support of the mitochondrial metabolism, the host-cell invasion and metacyclogenesis. *T. cruzi* 1-Delta-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase (*TcP5CDH*) is involved in the catabolism of proline holding a major role in its conversion by transforming pyrroline-5-carboxylate into L-glutamate (the second step of the catabolic path) and, thus, seeming to be a promising molecular target for new drug development. The amino acids sequence of PP5CDH was used for conservation analysis, secondary structure prediction, identification of functional domains, and building of tertiary structure computer models with the techniques of Molecular Modeling and Molecular Docking. The *TcP5CDH* (MW: 60 kDa) was expressed in a heterologous fashion in *Escherichia coli*, and purified with affinity and size exclusion chromatography, resulting in approximately 2 mg/L of expression. The Dynamic Light Scattering assays were carried out with the recombinant P5CDH in the concentrations of 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 mg/mL, and presented an apparent molecular weight of 223,4 kDa (Rh: 12,01 nm), 246,4 kDa (Rh: 12,53 nm), 310,5 kDa (Rh: 13,83 nm) e 312,0 kDa (Rh: 12,13,86 nm), respectively. The Circular Dichroism spectroscopy was performed with 0.2 mg/mL of *TcP5CDH* in the presence and absence of 100  $\mu$ M of NAD<sup>+</sup>, L-Glu, and its inhibitor Disulfiram, presenting a Tm of Tm 60,01 °C, 59,76 °C, 57,76 °C e 58,18 °C, showing that *TcP5CDH* has a more thermic stability without ligands. Also, a deconvolution was made showing that *TcP5CDH* has 23% of alfa-helix, 12,3% of antiparallel beta-sheetst and 12,4% parallel beta-sheets, 18,3% of turns 41,7% of disorganized structures. These results will contribute to the understanding of the pathway of L- proline in *T. cruzi* and the possible future development of new drugs.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, Delta-1-Pyrroline-Carboxylate Dehydrogenase, Structural Biology. Chagas disease.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de casos de infecção por <i>T. cruzi</i> baseados nas estimativas oficiais e status da transmissão vetorial no mundo (2006-2009).....	13
Figura 2: Número de Casos Agudos de Doença de Chagas no Brasil (2000-2009).....	14
Figura 3: Transmissão da Doença de Chagas Aguda no Brasil (2000-2009).....	15
Figura 4: O ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
Figura 5: Participação dos aminoácidos na nutrição e homeostase geral dos organismos.....	22
Figura 6: Estrutura molecular e características químicas da Prolina.....	26
Figura 7: Via Metabólica da Prolina.....	27
Figura 8: Via da Prolina no contexto Metabólico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	29
Figura 9: Estruturas dos Metabólitos inibidores de ALDH derivados do Dissulfiram. ....	30
Figura 10: Decomposição do feixe de luz plano polarizado em suas componentes esquerda (L) e direita (R).....	35
Figura 11: Espectros de CD das estruturas secundárias de proteínas.....	35
Figura 12: Gráfico de Decaimento da Função de Autocorrelação .....	38
Figura 13: Esquema Ilustrativo da estrutura da resina da coluna de cromatografia por afinidade com metal imobilizado. ....	45
Figura 14: Análise de Domínios Conservados pelo servidor da <i>TcP5CDH</i> .....	50
Figura 15: Alinhamento Múltiplo da Proteína P5CDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> com homólogas de organismos da família Trypanosomatidae.....	52
Figura 16: Região N-terminal das P5CDH dos organismos da família Trypanosomatidae.....	53
Figura 17: Alinhamento múltiplo dos resíduos de ligação a $\text{NAD}^+$ , ao substrato e catalíticos das proteínas homólogas dos organismos da família Trypanosomatidae.....	53
Figura 18: Alinhamento Múltiplo da Proteína P5CDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> com proteínas homólogas resolvidas por cristalografia. ....	56
Figura 19: Alinhamento múltiplo dos resíduos de ligação a $\text{NAD}^+$ , ao substrato e catalíticos das proteínas homólogas dos organismos da família Trypanosomatidae.....	57
Figura 20: Predição da Estrutura Secundária da P5CDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58
Figura 21: Resultados das predição de regiões transmembranas. ....	59
Figura 22: DOPE Score dos modelos gerados pelo software MODELLER 9.16. ....	61
Figura 23: Estrutura tridimensional do modelo 71 ( <i>TcP5CDH</i> ).....	62
Figura 24: Análise da qualidade local do modelo 71 pelo servidor ProSa.....	63
Figura 25: Análise da qualidade local do modelo 71 pelo servidor ProSa.....	64

Figura 26: Gráfico de Ramachandran para o modelo 71 da proteína <i>TcP5CDH</i> . .....	65
Figura 27: Gráfico de Ramachandran do modelo 71 da <i>TcP5CDH</i> em relação aos aminoácidos Pre-Pro, Pro e Gly.....	66
Figura 28: Equação da Raiz da Distância Quadrada Média (RMSD) .....	67
Figura 29: RMSD do modelo 71 .....	68
Figura 30: RMSD do sítio catalítico.....	69
Figura 31. Modelo dimérico da <i>TcP5CDH</i> .....	71
Figura 32: Modelo hexamérico da <i>TcP5CDH</i> .....	72
Figura 33: Mecanismo de reação das Aldeído Desidrogenase .....	74
Figura 34. Comparação visual entre as melhores moléculas ligantes com o L-Glu de estruturas resolvidas por cristalografia de raios-x.....	75
Figura 35. Ancoragem Molecular da <i>TcP5CDH</i> com seus ligantes .....	73
Figura 36. Ancoramento molecular do NAD <sup>+</sup> com o Modelo 71 .....	74
Figura 37: Expressão e purificação por IMAC analisado em gel SDS-PAGE 10% . .....	74
Figura 1: Lise da cauda de histidina com Trombina analisado em gel SDA-PAGE 10%.....	75
Figura 39: Resultados da Cromatografia de Exclusão Molecular .....	76
Figura 40: Curva de Calibração para a Massa Molecular (MM).....	77
Figura 41: Distribuição das partículas em relação ao seu diâmetro hidrodinâmico .....	78
Figura 42: Espectro de Dicroísmo Circular da P5CDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	80
Figura 43. Espectros da denaturação térmica da <i>TcP5CDH</i> na presença e ausência de NAD, Dissulfiram e L-glutamato.....	81
Figura 44. Espectro de Dicroísmo Circular da <i>TcP5CDH</i> na presença e ausência de ligantes no ensaio de denaturação térmica.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da Estrutura Primária da P5CDH de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	49
Tabela 2. Organismos da família Trypanosomatidae utilizados no alinhamento múltiplo .....	51
Tabela 3: Estruturas molde utilizadas na modelagem por homologia.....	54
Tabela 4: Distribuição dos aminoácidos do gráfico de Ramachandram do modelo 71 .....	67
Tabela 5. RMSD da TcP5CDH modelada em relação às proteínas molde .....	68
Tabela 6. Valores de energia das 10 melhores poses dos ligantes L-Glutamato, NAD e Dissulfiram .....	75
Tabela 7: Padrões Moleculares para Calibração de Colunas de Cromatografia de Exclusão Molecular.....	76
Tabela 8. Resultados estimados à partir da Cromatografia de Exclusão Molecular .....	77
Tabela 9. Informações hidrodinâmicas da P5CDH obtidas pelo DLS .....	79
Tabela 10. Composição de Estrutura Secundária da TcP5CDH.....	80
Tabela 11: Resultados do fit na equação de Boltzman.....	83

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).....	11
1.2	Tripanossomíase Americana.....	12
1.2.1	Epidemiologia da Doença de Chagas.....	12
1.2.2	Patologia da Doença de Chagas.....	15
1.2.3	O Tratamento da Doença de Chagas.....	16
1.3	O <i>Trypanosoma cruzi</i> : Classificação e Ciclo de Vida.....	17
1.4	Metabolismo Energético do <i>T.cruzi</i> .....	21
1.4.1	O Papel dos aminoácidos em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.4.2	A Via da Prolina em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	26
1.4.3	Delta-1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenases (TcP5CDH).....	27
1.4.4	Papel fisiológico da P5C.....	28
1.4.5	Dissulfiram como possível quimioterápico.....	29
1.5	A Importância dos métodos computacionais e biofísicos na caracterização de macromoléculas.....	31
1.5.1	Modelagem Molecular.....	31
1.5.2	Ancoragem molecular como ferramenta investigativa.....	33
1.5.3	Dicroísmo Circular (CD) na análise biofísica.....	34
1.5.4	O Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) na análise biofísica.....	36
2	JUSTIFICATIVA.....	40
3	OBJETIVOS.....	41
4	METODOLOGIA.....	42
4.1	Análise da proteína TcP5CDH por meio de ferramentas de Bioinformática.....	42
4.1.1	Análise da estrutura primária.....	42
4.1.2	Análise das regiões funcionais da TcP5CDH.....	42
4.1.3	Modelagem das estruturas terciárias e quaternárias da TcP5CDH.....	43
4.1.4	Ancoragem Molecular.....	43
4.2	Preparação da proteína recombinante TcP5CDH.....	43
4.2.1	Expressão da proteína recombinante TcP5CDH em <i>E. Coli</i> .....	43
4.2.2	Purificação por Cromatografia de Afinidade.....	44
4.2.3	Diálise.....	46
4.2.4	Clivagem da cauda de histidina com Trombina.....	46

4.2.5	Purificação por Cromatografia de Exclusão Molecular .....	46
4.3	Caracterização Biofísica da proteína recombinante <i>TcP5CDH</i> .....	47
4.3.1	Espalhamento Dinâmico da Luz.....	47
4.3.2	Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
5.1	Análise da proteína <i>TcP5CDH</i> por meio de ferramentas de Bioinformática .....	49
5.1.1	Análise da estrutura primária.....	49
5.1.2	Análise das regiões funcionais da <i>TcP5CDH</i> .....	57
5.1.3	Modelagem das estruturas terciárias e quaternárias da <i>TcP5CDH</i> .....	60
5.1.4	Ancoragem Molecular .....	73
5.2	Preparação da proteína recombinante <i>TcP5CDH</i> .....	73
5.3	Caracterização Biofísica da proteína recombinante <i>TcP5CDH</i> .....	78
5.3.1	Espalhamento Dinâmico da Luz.....	78
5.3.2	Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....	79
6	CONCLUSÃO.....	84
7	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	86
	REFERÊNCIAS .....	87
	APÊNDICE A: MATERIAL COMPLEMENTAR.....	99

## 1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma enfermidade que foi identificada a mais de um século, entretanto, ainda não existem tratamentos eficazes contra seus efeitos ou vacinas. Ela é causada pelo parasita flagelado *Trypanosoma cruzi* que possui um complexo ciclo de vida, passando de um hospedeiro invertebrado para um vertebrado. Sua sobrevivência a essas complexas mudanças de composição ambiental é fascinante e devida, em grande parte, à via metabólica dos aminoácidos L-prolina, L-arginina e L-glutamato. A L-prolina, em especial, apresenta uma importante participação na sobrevivência e adaptação do *T. cruzi*, pois afeta o seu ciclo de vida agindo como fonte de carbono e energia para a invasão de células hospedeiras, crescimento e metaciclogênese. A 1-Delta-Pyrrolina-5-Carboxilato Desidrogenase de *T. cruzi* (*TcP5CDH*), envolvida no catabolismo da Prolina, tem um papel importante na conversão da pirrolina-5-carboxilato (P5C) em L-glutamato e auxiliando no equilíbrio e resistência oxido-redutivos no parasita. Este trabalho descreve a expressão recombinante e estudos biofísicos aplicados à P5CDH do *T. cruzi*, em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber (ICB-USP) em um esforço de desvendar a via de catabolismo de aminoácidos do parasito e contribuir no possível uso desta via como alvo terapêutico futuro.

### 1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de 17 doenças infecciosas, incluindo a Doença do Sono (causado pelo *Trypanosoma brucei*) e as leishmanioses (causado por *Leishmania sp.*). As DTNs afetam diretamente cerca de um bilhão de pessoas e possuem agentes etiológicos, sintomas, diagnósticos, tratamentos e métodos de prevenção distintos. Apesar disso, elas apresentam algumas características comuns que possibilitam seu agrupamento (Quadro 1).

De acordo com Chirac e Torreale (2006), 1556 novos medicamentos foram produzidos e patenteados entre 1975 e 2004, mas apenas 18 foram voltados para as DTNs. Além disso, menos de 1% dos 77 bilhões de dólares aplicados na saúde pelo G8 são destinados a essas doenças (GARG, 2011). Esses dados mostram que há necessidade de investimento em pesquisa, produção, distribuição de novas terapias, além do desenvolvimento de políticas públicas para impedir transmissão dessas doenças.

**Quadro 1: Características comuns das Doenças Tropicais Negligenciadas**

<b>Associadas à populações de baixa renda e regiões tropicais</b>	A predileção às regiões quentes é resultado da maior concentração populacional de comunidades rurais, comunidades carentes e aglomerados urbanos (favelas, por exemplo). Estão também relacionadas a condições de saneamento precários ou inexistentes, áreas de conflitos, moradias e medidas de saúde pública inadequadas ou ausentes (HOTEZ et al., 2007; FEASEY, 2010)
<b>Regionalmente limitadas</b>	Ao contrário das doenças virais, essas doenças não são capazes de se espalhar por longas distâncias, tendo sua distribuição limitada a fatores climáticos favoráveis e do modo de transmissão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).
<b>Causam invalidez e/ou desfiguramento</b>	Muitas das DTNs trazem consigo problemas sociais como discriminação e desemprego, devido às sequelas relacionadas à patologia, comprometendo a qualidade de vida da população e a capacidade do indivíduo de buscar sustento. (HOTEZ; BROW, 2009; FEASEY, 2010)
<b>Apresentam medidas profiláticas.</b>	Praticamente todas as DTNs podem ser prevenidas e controladas, possuindo potencial de erradicação. Segundo a Organização Mundial da Saúde, as principais medidas são a quimioterapia preventiva, o gerenciamento intensivo dos casos, o controle de vetores, o acesso à água potável, à higiene e ao saneamento, além de cuidados veterinários (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Fonte: Quadro elaborado pelo autor.

## 1.2 Tripanossomíase Americana

A Tripanossomíase Americana, comumente conhecida como Doença de Chagas, foi descoberta em 1909 pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Justiniano das Chagas (1878-1934) em Lassance-MG. No período da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, Chagas atuava como médico tratando os casos de malária na região, doença de maior recorrência no período. Durante suas investigações, ele se deparou com um organismo monoflagelado nas amostras de sangue de animais silvestres e posteriormente o mesmo organismo em amostras de sangue humano. Carlos Chagas investigou a fundo o microorganismo e sua transmissão, sendo o primeiro cientista na história a identificar um parasita, caracterizá-lo, descrever seu ciclo de vida e suas manifestações clínicas. Por sua dedicação e trabalho, Chagas foi indicado ao Prêmio Nobel de Medicina duas vezes (REY, 2008).

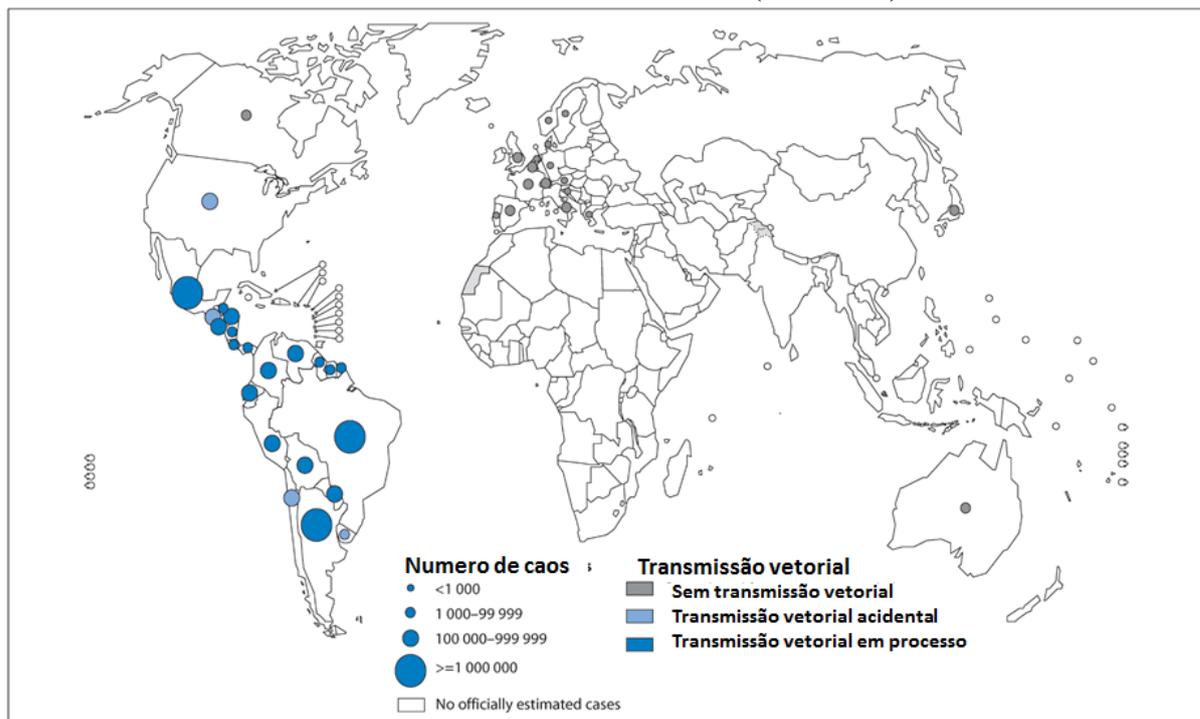
### 1.2.1 Epidemiologia da Doença de Chagas

A Doença de Chagas, uma das doenças tropicais negligenciadas, é uma antroponose transmitida por vetor cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma*

*cruzi*, que causa anualmente cerca de 50 mil mortes e é o responsável por uma das maiores taxas de mortalidade e morbidade na América Central e Sul. Estão atualmente infectados aproximadamente 10 milhões de pessoas no mundo, com potencial de infectar 80 milhões de pessoas que vivem em áreas de risco (NEVES, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; 2010; 2012; REY, 2008).

O panorama da epidemiologia da doença de Chagas (Figura 1) vem se alterando devido a mudanças climáticas e as migrações de populações rurais para as cidades e imigrações das populações latino-americanas endêmicas para a Europa (80 mil casos), Canadá (5,5 mil casos), Estados Unidos (300 mil casos), Japão (3 mil casos) e Austrália (1,5 mil casos) (COURA; VIÑA, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

**Figura 2: Distribuição de casos de infecção por *T. cruzi* baseados nas estimativas oficiais e status da transmissão vetorial no mundo (2006-2009)**

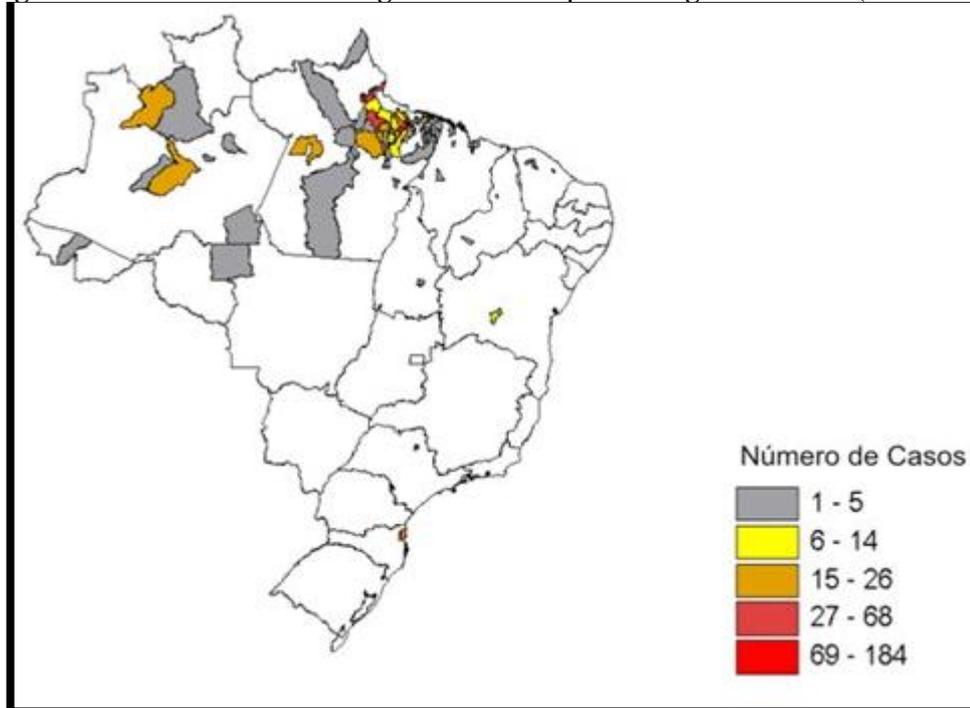


Adaptado de: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010).

Nas regiões não endêmicas, a triagem sanguínea e a congênita são o foco principal das medidas preventivas contra a infecção. Apesar da existência de insetos triatomíneos nas regiões temperadas não ser novidade, a identificação de espécies em latitudes maiores vem sendo observada nos últimos anos, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas.

No Brasil predominam os casos crônicos da doença de Chagas decorridas de infecções antigas, compondo cerca de 3 milhões de pessoas. Antes do programa nacional de combate de vetores, iniciado na década de 1970, a maioria dos casos notificados era de transmissão vetorial e mais de 2000 municípios em 18 estados estavam em áreas de risco de transmissão. Atualmente ainda são registradas ocorrências de casos agudos (Figura 2), entretanto estes casos se concentram em municípios da Amazônia Legal, composta pelos estados da região Norte, Mato Grosso e Maranhão. Entre o período de 2000-2011 foram registrados cerca de 1200 novos casos agudos de infecção dos quais cerca de 7% ocorreram através do inseto vetor, 23% por formas ignoradas e 70% por ingestão (FIOCRUZ, 2013).

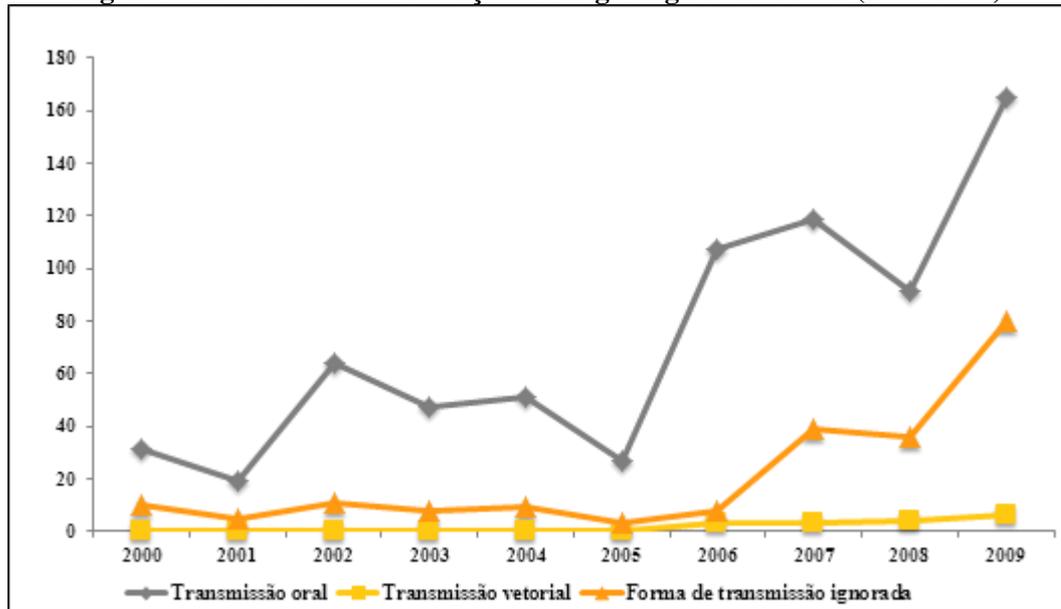
**Figura 3: Número de Casos Agudos de Doença de Chagas no Brasil (2000-2009)**



Fonte: PENNA (2010)

A Figura 3 mostra como o perfil da infecção vem se alterando e como a forma de contaminação oral está se tornando um dos principais fatores de transmissão, principalmente devido o aumento do consumo de produtos amazônicos *in natura* como, por exemplo, o açaí.

**Figura 4: Transmissão da Doença de Chagas Aguda no Brasil (2000-2009)**



Fonte: PENNA (2010)

Esses dados da Secretaria de Vigilância em Saúde mostram que apesar do sucesso do programa nacional de controle de vetores, a Doença de Chagas ainda é um problema de saúde pública a ser controlado.

### 1.2.2 Patologia da Doença de Chagas

A Doença de Chagas apresenta duas fases distintas em que ocorrem manifestações clínicas de caráter inflamatório. A fase aguda pode apresentar ou não sintomatologia e afeta acentuadamente crianças e adultos jovens em áreas endêmicas. A sintomatologia clássica é caracterizada pela inflamação do local de entrada do parasita, chamado de sinal de Romaña, mal-estar, febre, hepatosplenomegalia, inflamação dos linfonodos e edema subcutâneo que podem durar de 2 semanas a 4 meses (REY, 2008; NEVES 2005). A taxa de mortalidade nessa fase é menor que 5% dos casos, sendo normalmente indivíduos imunossuprimidos e crianças. O diagnóstico nesta fase é difícil de ser realizado, pois a sintomatologia é inespecífica, evoluindo rapidamente para uma fase assintomática não causando maiores preocupações aparente ao indivíduo. Além disso, muitos casos não são diagnosticados devido à falta de acesso a cuidados médicos em regiões carentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

Seguida à fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença de Chagas. A forma crônica evolui silenciosamente (fase latente) por tempo indeterminado, podendo não ser observados efeitos fisiopatológicos em até 80% dos pacientes. O paciente não nota sintomas ou

deficiências, apresentando exames radiológico do coração, cólon e esôfago normais; entretanto, é sorologicamente positivo e apresenta atividade imunológica constante. A sintomatologia emerge, em média, entre 10-30 anos após a infecção (RASSI JR; RASSI; LITTLE, 2000; PRATA, 1968; NEVES, 2005; REY, 2008).

A forma cardíaca é a manifestação mais expressiva, sendo a responsável por 50-70% dos casos sintomáticos. Observa-se grande comprometimento do sistema autônomo regulador das contrações cardíacas que causam problemas circulatórios, trombozes e hipóxia, além da insuficiência cardíaca. Ocorre diminuição da massa muscular e intensa fibrose causada por inflamação crônica do miocárdio prejudicando o estímulo cardíaco. Não raro, ocorrem compensações fisiológicas para a insuficiência cardíaca como, por exemplo, aumento do diâmetro das fibras musculares e aumento do volume cardíaco com consequente aumento das cavidades e hipertrofia das paredes do órgão (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDÁ, 1999; RASSIR JR; RASSI; LITTLE, 2000; MARIN-NETO et al, 2010). As formas digestivas, também chamadas de megas (megacólon com 20% dos casos e megaesôfago com 24% dos casos), são caracterizadas pela perda da capacidade motora de contração e fragilização da cavidade. Nota-se grande atividade fibrosante, formação de granulomas, destruição dos plexos nervosos, necrose e hipertrofia muscular compensatória (PRATA, 1968; REY, 2008; MATSUDA, 2009).

Estudos mostram que a fase crônica da doença de Chagas é uma manifestação autoimune que se desenvolve como resultado da contínua exposição de antígenos moleculares do parasita, que mimetizam moléculas próprias do hospedeiro para seu escape do sistema imune. A exposição desses antígenos e a contínua atividade sorológica na fase aguda e na fase transiente podem levar ao desenvolvimento de respostas autoimunes (KIERSZENBAUM, 1999; TARLETON; ZHANG, 2009; TEIXEIRA et al., 2011).

### *1.2.3 O Tratamento da Doença de Chagas*

O tratamento da doença de Chagas, recomendado na fase aguda, infecções congênitas e para crianças soropositivas, é o quimioterápico com susceptibilidade à cura parasitológica. O medicamento utilizado é o Benznidazol, entretanto apresentaefeitos colaterais como anorexia e perda de peso, náusea e vômitos, dores de cabeça, vertigem e polineuropatias. Cerca de 40% dos pacientes tratados sofrem com algum efeito colateral fazendo com que o medicamento seja ministrado em hospitais, encarecendo o tratamento. Além disso, a alta heterogeneidade do *T. cruzi* e a presença de enzimas homólogas com os hospedeiros tornam a

busca por um medicamento universal problemática (SEILER, 1976; CASTRO; DIAZ DE TORANZO, 1988; URBINA; DOCAMPO, 2003).

A ação do Benznidazol ocorre na forma tripomastigota, onde atua na indução da fagocitose e lise do parasita de forma dependente de Interferon- $\gamma$  e na inibição do NADH-fumarato redutase (MORELLO, 1988; MAYA, 2007; FUENTES; MATURANA; DE LA CRUZ, 2012). Ainda não existe uma vacina de dose única aprovada pela OMS para prevenção de nenhuma DTN, incluso a doença de Chagas (HOTEZ; BROWN, 2009; GARG, 2011). Muitas pesquisas estão sendo realizadas a nível estrutural para o descobrimento e entendimento de novos alvos farmacêuticos, mas ainda não há nada conclusivo. Este trabalho, em colaboração ao grupo do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, do Departamento de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), é um exemplo desse esforço.

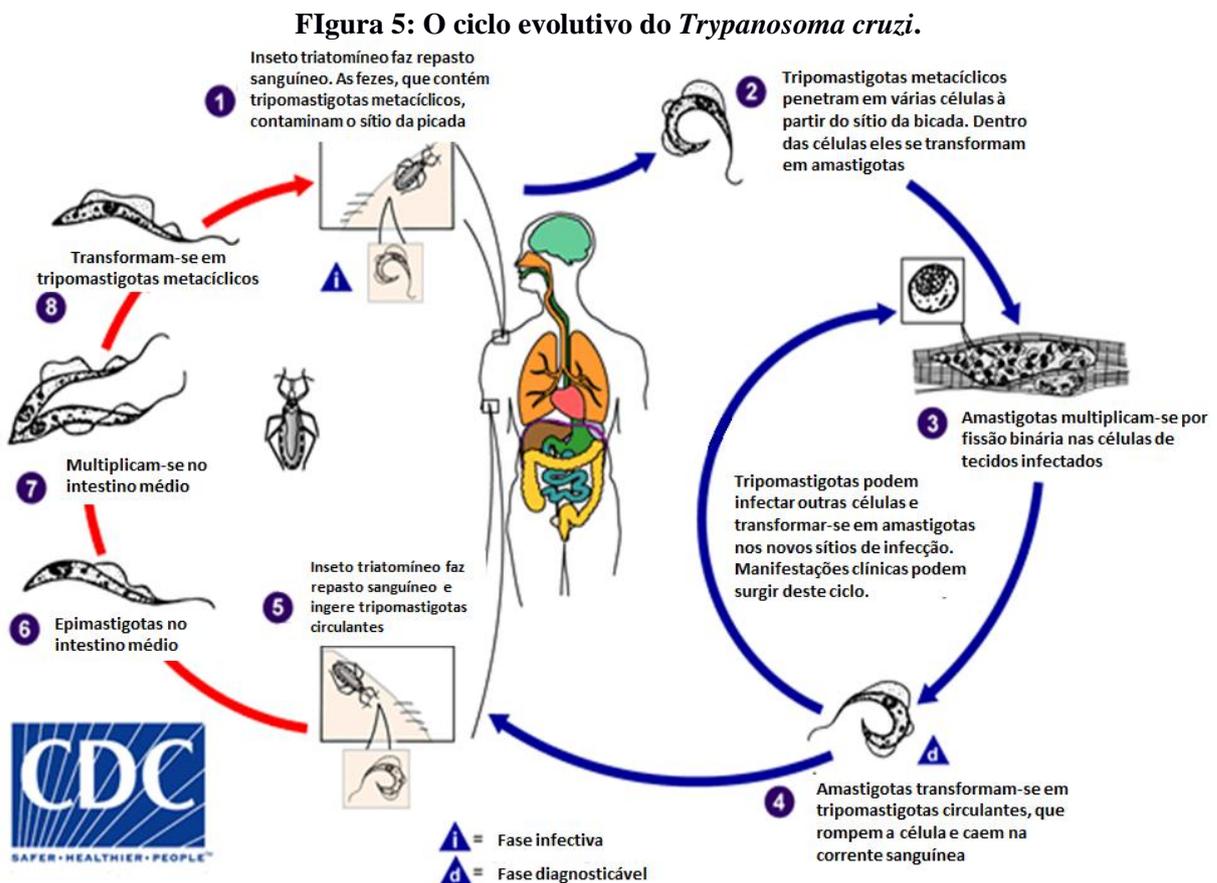
### **1.3 O *Trypanosoma cruzi*: Classificação e Ciclo de Vida**

O *Trypanosoma cruzi* é um organismo eucarioto unicelular monoflagelado com alta mobilidade pertencente à família *Trypanosomatidae* (juntamente com o gênero *Leishmania sp.*), da ordem *Kinetoplastida*, filo *Sarcomastigophora*. Seu genoma é diploide (2n) e sua reprodução se dá por fissão binária. O tripanossomatídeo é capaz de parasitar humanos e vários outros mamíferos. Os tipos celulares que podem ser infectados são diversos, mas os principais são macrófagos, fibroblastos, células musculares e células nervosas. Seus vetores biológicos são os invertebrados hemípteros hematófagos da família *Reduviidae*, compreendendo mais de 160 espécies (BRENER, 1973; CLAYTON, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxênico (Figura 4), ou seja, possui um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo, onde processos distintos ocorrem. Neste caso, seu hospedeiro definitivo são os vertebrados mamíferos (incluindo os humanos), onde são encontrados os tripomastigotas circulantes e amastigotas. Os hospedeiros intermediários são os seus vetores invertebrados e neles são encontrados os tripomastigotas metacíclicos e as epimastigotas. As formas reprodutivas do *T. cruzi* são as epimastigotas e amastigotas (BRENER, 1973; TYLER; ENGMAN, 2001).

O ciclo biológico do *T. cruzi* se inicia com a picada do hemíptero hematófago que enquanto se alimenta, ou imediatamente depois, defeca sobre a pele do hospedeiro mamífero. Nas fezes e urina do inseto encontram-se majoritariamente a forma de tripomastigotas metacíclicos. Se em contato com as mucosas conjuntivas, oral ou por qualquer ruptura na

epiderme, incluindo o próprio local da picada, os parasitas podem entrar no organismo e, na matriz extracelular ou na corrente sanguínea, atingir e invadir as células musculares, fibroblastos ou macrófagos (BRENER, 1973; TYLER; ENGMAN, 2001; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO et al, 2010).



1 – insetos triatomíneos ao fazerem o repasto sanguíneo defecam tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes. Estes entram na corrente sanguínea ou pelas mucosas. 2 – os tripomastigotas metacíclicos invadem diversos tipos celulares (musculo estriado, cardíaco, nervos, macrófagos, etc.) e no interior da células tornam-se amastigotas. 3 – os amastigotas multiplicam-se assexuadamente por fissão binária gerando 300-400 indivíduos. 4 – Os amastigotas tornam-se tripomastigotas circulantes que rompem a célula hospedeira e entram na corrente sanguínea e no periplasma. Os tripomastigotas podem então infectar novas células e tecidos. 5-8 – Triatomíneos (infectados ou não) ao fazerem um repasto sanguíneo ingerem tripomastigotas circulantes. No intestino médio, os tripomastigotas tornam-se epimastigotas e multiplicam-se assexuadamente por fissão binária. Na porção final do sistema digestivo do triatomíneo, as epimastigotas tornam-se tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas no próximo repasto sanguíneo.

Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (2016).

A invasão celular dos tripomastigotas metacíclicos pode ocorrer de forma ativa ou passiva, porém ambas necessitam de moléculas de superfície específicas que irão interagir com a superfície da célula hospedeira. Essas moléculas são normalmente glicolípídeos e mucinas, proteínas ligas à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol

(FERGUSON, 1997; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1999; DI NOIA; D'ORSO; FRASCH, 2003; YOSHIDA, 2006). Em macrófagos, normalmente as primeiras células a entrarem em contato com micro-organismos invasores, a invasão celular do *Trypanosoma cruzi* ocorre em etapas bem definidas (DVORAK; SCHMUNIS, 1972; VRAY, 2002). Inicialmente, as proteínas *trans*-sialidases da superfície do parasita e do macrófago se reconhecem ocorrendo a adesão. Essa adesão desencadeia uma série de reações de transferência de ácido siálico entre glicoproteínas do hospedeiro e do parasita inicializando o processo de interiorização onde ocorre a formação de um vacúolo fagocitário. O parasita também secreta proteases, peptídeos e glicosidases que auxiliam na deformação e modificação da membrana citoplasmática hospedeira (SCHENKMAN; EICHINGER 1993; BURKE; LEWIS, 2002). Em seguida o vacúolo fagocitário migra para o citoplasma, fundindo-se a lisossomos, formando o fagolisossomo. Os tripomastigotas escapam do fagolisossomo e invadem o citoplasma, transformando-se em amastigotas. Nesse processo de escape, as *trans*-sialidases da superfície do parasita interagem com glicoproteínas da membrana interna do fagolisossomo transferindo ácido siálico destas para as suas próprias proteínas de membrana, normalmente mucinas, fragilizando a estrutura do vacúolo fagocitário. Ao mesmo tempo, o parasita libera neuraminidases e hemolisinas que são ativadas pelo pH ácido do fagolisossomo e interagem com as glicoproteínas fragilizadas do fagolisossomo, criando rupturas que facilita o escape do parasita para o meio celular. *In vitro*, o processo de aderência ao escape, dura, em média, 2 horas (MORENO; DOCAMPO, 2003; FIOCRUZ, 2013).

O *T. cruzi* também pode invadir pelo mesmo processo as células fagocíticas não profissionais, como os fibroblastos, as células epiteliais e os mioblastos, através de uma fagocitose induzida (TAN; ANDREWS, 2002; VRAY, 2002; FERNANDES; ANDREWS, 2012). Após a aderência, os lisossomos migram para o sítio onde o parasita se encontra e é formado o fagolisossomo próximo à membrana. Para estas células, foi descrito que o aumento das concentrações intracelulares de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no hospedeiro é fundamental (MORENO, 1994; MORENO; DOCAMPO, 2003; DOCAMPO; LUKES, 2012; NAGAJYOTHI et al., 2012), mas não se sabe ainda ao certo como o parasita é capaz de modular esse desbalanço. Outros estudos (ANDRADE; ANDREWS, 2004, 2005) mostram que a inibição da fusão do lisossomo ao vaculo parasitófago inibe a invasão celular, mostrando que o ambiente oxidativo tem um papel fundamental no ciclo de vida do *T. cruzi*.

No citoplasma, a célula amastigota inicia o processo de reprodução por fissão binária após 35 horas da invasão. O processo reprodutivo dura, então, cerca de 5 dias em ciclos de 12 horas, produzindo nove gerações (cerca de 450-500 novos parasitas) que, antes da lise celular

do hospedeiro, transforma-se em tripomastigotas circulantes. Uma vez liberados no periplasma podem invadir outras células ou cair na corrente sanguínea, atingindo novos tecidos (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1999; TYLER; ENGMAN, 2001; SOUZA, 1999).

A etapa final do ciclo ocorre no hospedeiro invertebrado, quando este se alimenta do sangue de um vertebrado mamífero infectado. No estômago do hemíptero muitos parasitas são digeridos; os que sobrevivem migram para o intestino médio, transformando-se em esferomastigotas. As esferomastigotas ou transformam-se em epimastigotas longos, incapazes de se reproduzir, ficando aderidas às células da cavidade intestinal; ou em epimastigotas curtas que iniciam um processo de reprodução por fissão binária. No intestino posterior ocorre a diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (infectante para os mamíferos) que serão eliminados nas fezes e urina do próximo repasto (BRENER, 1973; TYLER; ENGMAN, 2001; SOUZA, 2002; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO et al, 2010).

Existem pelo menos seis formas diferentes de infecção possíveis para adquirir a Doença de Chagas além do ciclo descrito anteriormente (NEVES, 2005; REY, 2008; COURA; DIAS, 2009). São elas:

- Transmissão por Transfusão (DIAS; BRENER, 1984; GRANT, 1989). É o segundo maior mecanismo de contágio. Este mecanismo tem grande importância para os países do norte da América e Europa devido aos altos índices de migrações.
- Transmissão congênita (BITTENCOURT; BARBOSA, 1972; BITTENCOURT, 1992; MORETTI, 2005). Esta ocorre quando ninhos de amastigotas são encontrados na placenta; estes liberam tripomastigotas que são capazes de migrar até o feto.
- Transmissão oral (SHIKANAI-YASUDA, 1991; BENCHIMOL BARBOSA, 2006; CARDOSO, 2006; DIAS et al., 2008; NÓBREGA, 2009). Ganhou nova importância devido a recentes casos de infecção através do consumo de alimentos contaminados, como por exemplo, o caldo de cana e açaí. Ocorre também através da amamentação e ingestão de carnes cruas contaminadas.
- Transmissão por Transplantes (RIARTE, 1999; BARCÁN, 2005; KUN, 2009). Mecanismo mais raro de ocorrência, mas causa grande impacto ao transplantado, pois, uma vez que este se encontra imunosuprimido, a fase aguda desencadeada é grave.
- Acidentes laboratoriais. Ocorre com o manuseio inadequado dos meios de cultura, água, sangue, reagentes contaminados ou com o próprio vetor. A contaminação se dá através do contato dos materiais contaminados com as mucosas ou lesões cutâneas ou, ainda, a auto inoculação acidental.

- Coito (CARVALHO; RIBEIRO; LOPES, 1991; TAVARES, 1994; HERRERA; URDANETA-MORALES, 2001; CARVALHO et al., 2009; RIBEIRO, 2016). Apesar de não haver provas destes mecanismos em humanos, é possível encontrar tripomastigotas no canal vaginal e sêmem de murinos infectados e observar a sua transmissão após o coito.

#### **1.4 Metabolismo Energético do *T.cruzi***

A obtenção de energia no *T. cruzi* ocorre por duas vias principais, a primeira através da via glicolítica e ciclo de Krébs e a outra através da fosforilação oxidativa. A glicólise é semi-compartmentalizada, sendo que as três primeiras etapas do catabolismo da glicose ocorrem no glicossomo e as demais reações ocorrem no citoplasma. Cazzulo (1992a; 1992b) verificou que a glicólise neste organismo não ocorre de forma dependente das pressões de oxigênio, ou seja, o processamento da glicose não é afetado em ambientes ricos em oxigênio, tendo um padrão fermentativo. A glicose é transformada em Gliceraldeído-1,3-bisfosfato e exportado ao citoplasma, onde pode ser convertido a fosfonolpiruvato ou glicerol para a geração de ATP. O fosfonolpiruvato, se não for convertido a piruvato, retorna ao glicossomo, é transformado em oxaloacetato e, então, em succinato. O piruvato pode ser transformado em Alanina, Acetil-CoA ou lactato (em situação de hipóxia). Assim, esse processo gera malato, piruvato, gliceraldeído-3-fosfato, succinato e dióxido de carbono (CANNATA; CAZZULO, 1984), que alimentam a fosforilação oxidativa, na geração de ATP. Além disso, os aminoácidos podem ser uma fonte energética importante, como demonstraram Sylvester e Krassner (1976).

##### *1.4.1 O Papel dos aminoácidos em Trypanosoma cruzi*

Apesar de sua diversidade, os aminoácidos apresentam algumas características semelhantes, seja na sua estrutura e propriedades físico-químicas, seja na produção de intermediários moleculares. Do ponto de vista metabólico, os aminoácidos podem produzir intermediários e subprodutos como amônia, dióxido de carbono, lipídeos de cadeia longa e curta, glicose, sulfeto de hidrogênio, corpos cetônicos, óxido nítrico, ureia, ácido úrico, poliaminas, ATP e outros compostos nitrogenados (NELSON; COX, 2011). Nutricionalmente, os aminoácidos podem ser classificados em essenciais e não essenciais,

porém essa definição não leva em conta as necessidades quantitativas que determinados organismos requerem, nem os papéis que esses aminoácidos desempenham (WU, 2009).

Evidências das pesquisas dos últimos vinte anos mostram que alguns dos aminoácidos canônicos, além de sua função como parte de proteínas, são importantes reguladores de processos metabólicos chave para a manutenção, crescimento, reprodução e imunidade de organismos, favorecendo a eficiência na utilização dos alimentos, aumentando a produção proteica, reduzindo a adiposidade e melhorando a saúde (Figura 5). Esses aminoácidos (arginina, Prolina, cisteína, glutamina, leucina e triptofano) são chamados de Aminoácidos Funcionais (WU, 2009). Essa nova visão sobre a função vem sendo aplicada no melhoramento da produção de porcos (WU et al., 2007), ruminantes (FIRKINS et al., 2006), aves (BAKER, 2008), peixes (LI et al., 2008) e em humanos (ELANGO; BALL; PENCHARZ, 2009).

**Figura 6: Participação dos aminoácidos na nutrição e homeostase geral dos organismos.**



Fonte: Adaptado de WU (2009).

Em tripanossomatídeos, os aminoácidos também apresentam um papel muito mais profundo do que apenas estrutural. Além de estarem ligados ao metabolismo energético, participam de diversos processos biológicos que auxiliam na sua adaptação durante as mudanças ambientais que ocorrem durante seu ciclo de vida. Alguns desses processos

envolvem a resistência a estresse celular, a osmorregulação, a invasão de células hospedeiras, a reprodução e os processos de diferenciação.

Do ponto de vista energético, Sylvester e Krassner (1976) mostraram que os aminoácidos Asparagina, Glicina, Glutamato, Leucina, Isoleucina, e Prolina são consumidos pelo *T. cruzi*, gerando intermediários do ciclo de Krebs: amônia, dióxido de carbono, succinato e piruvato. Apesar de enzimas que fazem a interconversão de arginina, citrulina e ornitina serem catalogados, o ciclo da ureia não é funcional em tripanossomatídeos, sendo que seu conteúdo é eliminado na forma de amônia (NH<sub>3</sub>) (YOSHIDA; CAMARGO, 1978). Contudo, o excesso de amônia pode ser reutilizado para a regeneração de Asparagina e Glicina, através da Glutamina e Arginina Sintases (CALDAS et al., 1980). Além disso, foram identificadas transaminases altamente eficientes (Alanina aminotransferase - *Tc*ALAT, Aspartatoaminotransferase - *Tc*ASAT, Tirosina amino transferase - *Tc*TAT e Serinaaminotransferase - *Tc*SAT) que estariam relacionadas à regeneração de Glutamato, Fenilalanina, Alanina,  $\alpha$ -cetogluturato, oxaloacetato e piruvato (MARCIANO et al., 2009).

A Arginina, por exemplo, pode ser transformada em ATP a partir da ação da Arginina quinase que transfosforila a N-phospho-L-arginina de forma reversível formando fosfoarginina, que pode servir de armazenamento energético para a reconstituição do ATP, um processo que relembra o sistema de fosfocreatina de eucariotos superiores (PEREIRA et al., 2002). Além disso, evidências apontam que o controle energético do parasita em situações de depleção nutricional está sob a influência da atividade desta enzima, pois seus níveis de expressão crescem proporcionalmente com a densidade populacional do parasita e com isso as concentrações decrescentes de arginina estejam ligadas ao estímulo do processo replicativo. Por fim, estudos em *Triatoma infestans* mostram, de acordo com as condições nutricionais deste hospedeiro, o pH do seu material excretado pode variar de 5,7 a 8,9 e, em meios de cultura alcalinos, a ação da arginina quinase também se mostrou acentuada, indicando um possível papel na resistência às variações de pH (PEREIRA et al., 2003).

O Glutamato, que é absorvido pelas formas triplo- e epimastigotas através de um transportador dependente do potencial de prótons da membrana plasmática, apresenta um papel na resistência térmica, nutricional e oxidativa. Magdaleno et al. (2011) mostrou que análogos de glutamato testados para verificar os seus efeitos inibitórios apresentavam influência no crescimento celular em várias condições. Foi observado que culturas tratadas com os análogos apresentavam uma maior sensibilidade a temperaturas, mesmo quando em condições ideais de crescimento. Em situação de estresse nutricional induzido pelos análogos, foi constatado que o glutamato é obtido através da metabolização de arginina ou Prolina. Em

situação de estresse oxidativo, a ausência do glutamato causou maior sensibilidade aos danos causados por radicais livres.

#### 1.4.2. O Papel da Prolina

A Prolina apresenta um papel central na adaptação e proliferação do *Trypanosoma cruzi* frente a uma diversidade de estresses. Em meios condicionados ela auxilia a mimetização da urina do barbeiro promovendo a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (CONTRERAS et al., 1985). Células de mamíferos infectadas *in vitro* com amastigotas de *T. cruzi*, quando em meio carente em Prolina, mostravam um acúmulo dessas formas e uma diminuição das formas metacíclicas, indicando sua influência na transformação de amastigotas em tripomastigotas e afetando sua viabilidade e crescimento (TONELLI et al., 2009).

Ela também apresenta papel na osmorregulação, juntamente com o Glutamato e a Arginina, sendo exportada ou importada da célula em situações de estresse hídrico (BURSELL et al., 1973; ROHLOFF; RODRIGUES; DOCAMPO, 2003; 2004). A Prolina ainda parece estar ligada ao processo de invasão celular, como fornecedora de energia, já que está envolvida na produção de ATP nas formas tripomastigotas (SCHENKMAN et al., 1991). Além disso, em condições de depleção nutricional, a capacidade de invasão e proliferação é diminuída drasticamente. Contudo, quando essas culturas eram suplementadas com Prolina, a capacidade de infecção e crescimento era restabelecida. Interessantemente, o mesmo não foi observado quando culturas em estresse nutricional eram suplementadas com glicose, sugerindo a Prolina como um metabólito central na manutenção energética da invasão celular (MARTINS et al., 2009; SILBER et al., 2009).

Levando em conta que a Prolina é utilizada no ciclo de Krebs, este aminoácido necessita ser importado para dentro da célula e depois importado para a mitocôndria. Em organismos evolutivamente próximos, como a *L. donovani* e o *T. b. brucei*, o processo de transporte da Prolina pode ocorrer com dependência de gradientes de sódio, potássio ou prótons, ou de forma ativa. No *T. cruzi* esse processo é mediado por dois sistemas de transporte ativo de Prolina, denominados A e B (SILBER et al., 2002). O sistema A é dependente do gradiente de prótons da membrana plasmática e possui alta afinidade pela Prolina, mas com uma baixa capacidade de transporte; já o sistema B apresenta uma baixa afinidade à Prolina, mas alta capacidade de transporte mediada pela hidrólise de ATP.

Posteriormente Chamond et al. (2003) descreveu a presença, a estrutura e a função de uma estrutura imunogênica responsável pela conversão da D-Prolina em L-Prolina, a Prolina Racemase (*TcPRAC*). Esta enzima ainda não possui papel bem definido no metabolismo do *T. cruzi*, mas acredita-se que, quando expressa, ela é exportada para o meio extracelular para funcionar como um mitógeno das células B, facilitando sua evasão do sistema imune humoral.

Estudos em insetos vetores, como *Rhodinus prolixus*, mostram que sua hemolinfa apresenta quantidades de aminoácidos livres maiores que o plasma humano. Mais de 20 aminoácidos e derivados foram identificados na sua forma livre, com destaque a Prolina, Tirosina, Histidina e Valina. A Prolina, por exemplo, chega a representar de 31,8 a 57,3% da massa total dos aminoácidos presentes, enquanto os níveis de Tirosina aumentam de 6,3 para 73.2% em um período de 18 dias após o repasto sanguíneo (HARINGTON, 1961; BARRETT, 1973). Na mosca Tsé-tsé, os resultados foram similares. Acredita-se que os altos níveis de aminoácidos, principalmente de Prolina, estejam relacionados ao fornecimento de energia para a realização do voo (BRUSSELL et al., 1973; HANSFORD; SAKTOR, 1970; HARGROVE, 1976). Foi demonstrado que o *T. brucei* é capaz de suprir sua demanda energética em depleção de glicose exclusivamente com a Prolina disponível na hemolinfa (NJAGI et al., 1992), reforçando a importância da Prolina na manutenção do ciclo de vida destes parasitas.

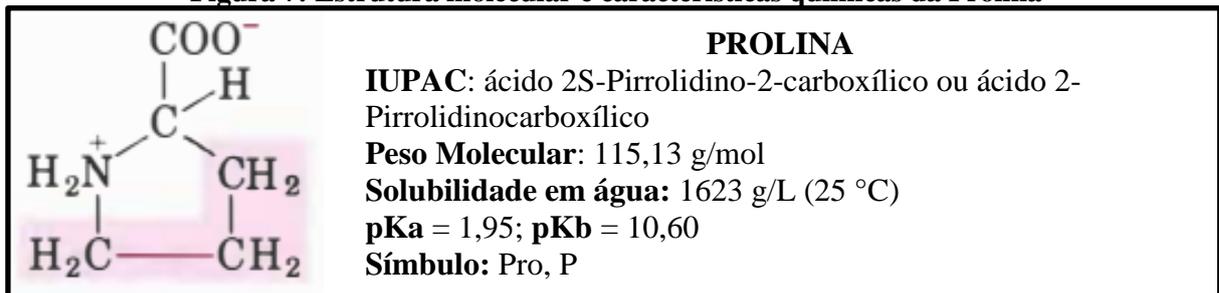
A via da prolina é responsável pelo controle dos níveis de prolina e seu intermediário, a pirrolina-5-carboxilato (P5C), é nodo metabólico entre a via do Glutamato e do Oxaloacetato. Mutações na enzima Delta-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase pode causar um aumento das concentrações de P5C dentro das células levando a apoptose (DEUSCHLE, 2001; NOMURA; TAKAGI, 2004). Entretanto, o ciclo da uréia não é funcional em tripanosomatídeos, fazendo com que a via da prolina tenha de ser muito bem regulada. Com isso, o estudo desta via se torna interessante, pois ela é fundamental para a sobrevivência do *T. cruzi* e essa incapacidade de redirecionamento da P5C para outras rotas torna este organismo vulnerável à interferência de quimioterápicos.

A Prolina apresenta papéis fundamentais para o *T. cruzi*, se destacando nos processos de diferenciação (CONTRERAS et al., 1985; TONELLI et al., 2004), adesão e invasão celular (MARTINS et al., 2009) e conferindo resistência a estresse oxidativo (MAGDALENO et al., 2011; SAYÉ et al., 2014), osmorregulação (ROHLOFF; RODRIGUES; DOCAMPO, 2003) e variação térmica (MAGDALENO et al., 2011).

#### 1.4.2 A Via da Prolina em *Trypanosoma cruzi*

A Prolina é um aminoácido apolar, alifático que apresenta um anel imínico formado pela ligação covalente do C3 da cadeia lateral com o grupo amino (Figura 6). Essa conformação gera uma estrutura rígida que, em estrutura secundária de proteínas, é encontrada em regiões de curvas, início de hélices-alfa e nas extremidades de fitas-beta. Entretanto, a sua presença no meio das hélices-alfa e fitas-beta normalmente causa instabilidade e, de maneira geral, as estruturas secundária e terciária são prejudicadas. Interessantemente, vários resíduos de Prolina e/ou hidroxiprolinas formam uma estrutura secundária em hélice, como observado na estrutura do colágeno, sendo fundamental para a composição dos tecidos das juntas e tendões. Além disso, a Prolina apresenta vários papéis importantes na manutenção do ciclo de vida do *T. cruzi*, ressaltando sua via como um possível alvo de tratamentos.

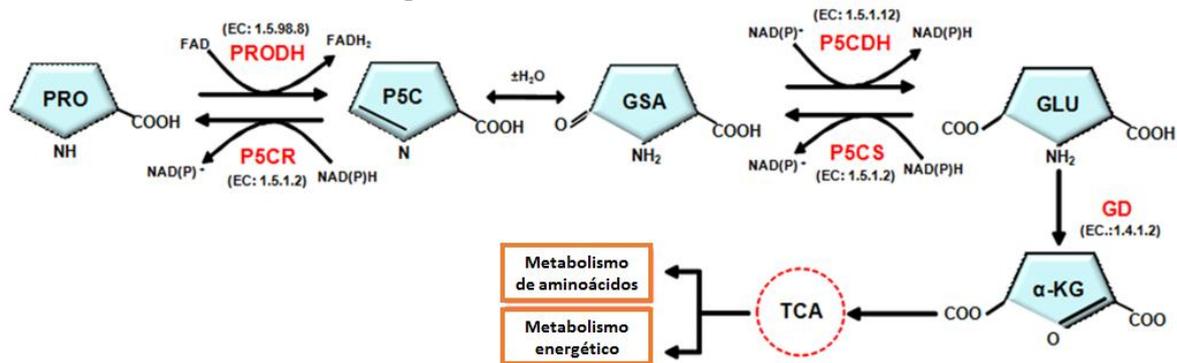
**Figura 7: Estrutura molecular e características químicas da Prolina**



Fonte: Adaptado de PUBCHEM (2016); NELSON; COX (2014)

A via metabólica da Prolina é composta por quatro enzimas (Figura 7). A via catabólica, que ocorre exclusivamente na mitocôndria do, é composta pela Prolina Desidrogenase (*Tc*PRODHD) (EC 1.5.99.8), que oxida a L-Prolina em delta-1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) utilizando FAD como receptor de elétrons. A atividade da *Tc*PRODHD também está ligada a resistência a estresse oxidativo e ao fornecimento de elétrons para o complexo II da cadeia transportadora de elétrons (PAES, 2010; 2013).

**Figura 8: Via Metabólica da Prolina.**



PRO – L-Prolina. P5C – pirrolina-5-carboxilato. GSA – ácido glutâmico semialdeído. GLU – L-Glutamato. A-KG –  $\alpha$ -cetoglutarato. PRODH – Prolina Desidrogenase. P5CDH – Delta-1-Pirrolina-Desidrogenase. GD – Glutamato Desidrogenase. P5CS – Pirrolina-5-Carboxilato Sintase. P5CR – Pirrolina-5-Carboxilato Redutase. TCA – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.

Fonte: Adaptado de Paes (2013).

O P5C sofre uma hidrólise espontânea, transforma-se em ácido glutâmico semialdeído e é captado pela Delta-1-Pirrolina Desidrogenase (*TcP5CDH*) (EC 1.5.1.12) sendo transformado irreversivelmente em Glutamato com a redução do  $\text{NAD(P)}^+$ . A via de metabolização, inversa a anterior, é composta pela Pirrolina-5-Carboxilato Sintase (*TcP5CR*) (EC 1.5.1.2) que transforma o L-glutamato em ácido glutâmico semialdeído de forma dependente de  $\text{NAD(P)H}$ , citoplasmática, e pela Pirrolina-5-Carboxilato Redutase (P5CR) (EC 1.5.1.2), que transfere um hidrogênio do  $\text{NAD(P)H}$  para o ácido glutâmico semialdeído transformando-o em L-prolina.

#### 1.4.3 Delta-1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenases (*TcP5CDH*)

A enzima P5CDH é parte da superfamília das Aldeído Desidrogenases (ALDH) que compreende centenas de proteínas divididas em aproximadamente 20 subfamílias e apresentam uma estrutura tridimensional e catalítica comum (TANNER, 2008). Esta enzima pertence à subfamília 4 e possui homologia com as enzimas dos organismos procaríotos *Thermus thermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus halorans*, com eucariotos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e plantas como *Arabidopsis thaliana*. Além disso, um organismo multicelular, como os humanos, pode possuir mais de 20 ALDHs, bem como diversas isoformas com atividades modificadas e/ou diferenciadas dependendo do tecido em que se encontram (KOPPAKA et al., 2012; SINGH et al., 2013).

Seu mecanismo de ação mais aceito descreve o ataque nucleofílico do resíduo de Cisteína catalítico, altamente conservado, ao carbono do grupo aldeído do substrato formando

um hemetioacetal. Em seguida a transferência de um hidreto ao NAD(P)<sup>+</sup> leva a formação de um intermediário tioacil e NAD(P)H. Por fim, uma hidrólise do tioacil gera o grupo ácido carboxílico liberando o produto (INAGAKI et al., 2006).

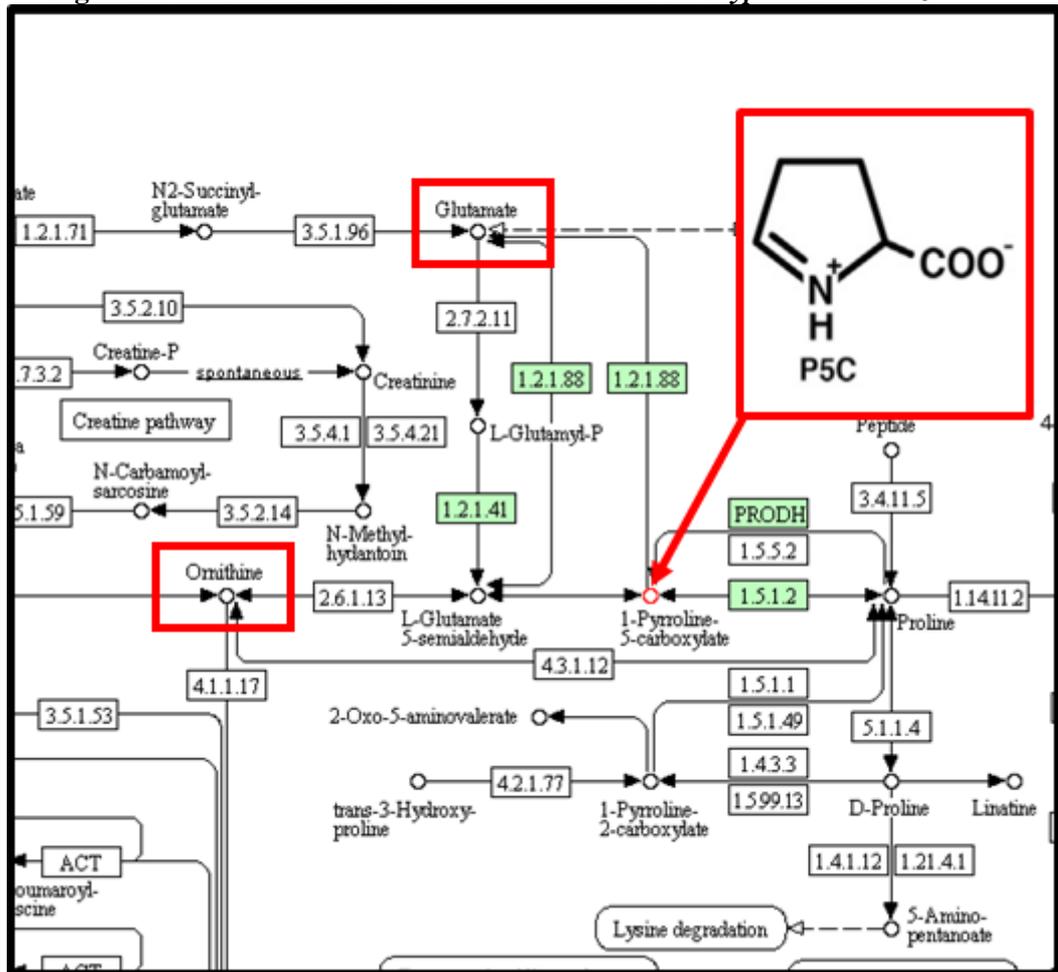
Mutações nos resíduos de ligação ao substrato da ALDH4A1 de podem causar hiperprolinemia do tipo II, uma doença genética autossômica recessiva, caracterizada pela falta de atividade da P5CDH, gerando um acúmulo de Prolina nos tecidos e sangue de 10 a 15 vezes maior que o normal, podendo causar retardos mentais e convulsões (SRIVASTAVA et al., 2012).

Mantilla e colaboradores (2015) identificaram e produziram uma P5CDH putativa de *Trypanosoma cruzi* funcional que se organiza estruturalmente como um hexâmero em solução. Além disso, foi verificado que a *TcP5CDH* em seu estado oligomérico se associa com a membrana interna mitocondrial aumentando a atividade enzimática em relação à forma purificada. A oligomerização, segundo Lue e colaboradores (2013), é causada pela porção C-terminal da proteína que se apresenta como uma folha-beta antiparalela.

#### 1.4.4 Papel fisiológico da P5C

A Pirrolina-5-Carboxilato (P5C) é um composto chave na interligação metabólica entre as vias da prolina, ornitina e glutamato (Figura 8). Sugere-se que o P5C seja capaz de agir como um aceptor de elétrons com potencial redutor na oxidorredução intra- e extracelular de plantas (MILLER, 2009). Mantilla e colaboradores (2013; 2015) realizaram experimentos de estresse nutricional em *T. cruzi* e notaram que este composto, além de metabolizado, pode ser importado para o citoplasma da célula e ser capaz de restabelecer os níveis de ATP intracelular, indicando uma participação na produção de energia. Além disso, os mesmos autores mostraram que a invasão celular pode ser restabelecida com a P5C como única fonte nutricional, resultados similares aos observados com prolina. Em leveduras, mutações no gene *PUT2*, homólogo da P5CDH, levam ao acúmulo de P5C aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mostrando a capacidade citotóxica deste metabólito (NOMURA; TAKAGI, 2004).

Figura 9: Via da Prolina no contexto Metabólico do *Trypanosoma cruzi*



O P5C é um nodo metabólico entre a via da Prolina, da Ornitina e Do glutamato. Em verde, proteínas identificada para o *Trypanosoma cruzi*: 1.5.1.2 (PRODH), 1.2.1.88 (P5CDH) e 1.2.1.41 (Glutamato-5-semialdeído Desidrogenase). Destacados em vermelho: a ornitina, o glutamato e a P5C. As setas indicam o caminho que o metabólito pode seguir.

Fonte: Adaptado de KEGG (2016).

Levando-se em conta que a via da ornitina e, assim, o ciclo da uréia, não é funcional em *T. cruzi* e que mutações na P5CDH levam a desbalanços oxido-redutivos, a inibição da P5CDH torna-se interessante, pois poderia levar a um efeito tripanocida. Assim, buscar moléculas e agentes químicos capaz de inibir a ação da *TcP5CDH* seria um passo interessante na busca de novos quimioterápicos.

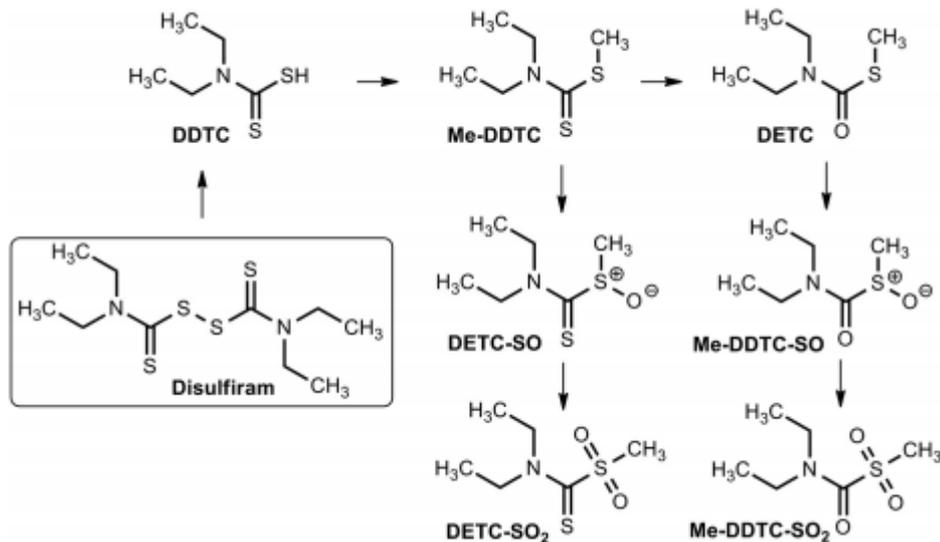
#### 1.4.5 Dissulfiram como possível quimioterápico

O Dissulfiram (DSF) (diamidatetraetilperoxidicarbonica), conhecido comercialmente como Antabuse ou Antietanol, é um derivado de carbamato utilizado como inibidor da Álcool Desidrogenase no tratamento de abuso de álcool desde 1948. Seu efeito

inibitório causa àqueles que ingerirem bebidas alcoólicas um aumento das concentrações de acetaldeído, causando vasodilatação, dificuldades respiratórias, hipertensão e náusea aguda, efeitos estes que tem a função de desencorajar o consumo de álcool.

O Mecanismo molecular da inibição do Aldeído Desidrogenases tipo II (ALDH2) presentes no fígado é mediado por produtos metabólicos do dissulfiram (Figura 9). Inicialmente ocorre uma redução da ligação de dissulfeto, formando dietilditiocarbamato (DDTC), um inibidor de ALDH *in vivo*, que é convertido pela tiol metiltransferase em S-metil-N,N-dietiltiocarbamato (DETC) e S-metil-N,N-dietilditiocarbamoil (Me-DDTC). Na sequência estes são oxidados ganhando um grupamento sulfóxido, tornando-se Me-DDTC-SO e DETC-SO, que são oxidados tornando-se Me-DDTC-SO<sub>2</sub> e DETC-SO<sub>2</sub> (KOPPAKA et al., 2012). Todos esses metabólitos (Figura 9) são inibidores irreversíveis devido à carbamilação da Cisteína catalítica das ALDH.

**Figura 10: Estruturas dos Metabólitos inibidores de ALDH derivados do Dissulfiram.**



Fonte: Koppaka et al. (2012)

Mantilla (2013) demonstrou que o DSF apresenta efeito tripanocida em células de epimastigotas com um IC<sub>50</sub> de 402 nM, observando-se um atraso na fase logarítmica de crescimento quando comparado ao grupo controle. Observou-se que não houve diferença significativa na inibição da metacilogênese, mas a quantidade de células tripomastigotas que eclodiam das células hospedeiras em meio com presença de DSF diminuiu significativamente. Além disso, o efeito da inibição enzimática da *TcP5CDH* pelo DSF testada mostrou-se dose-dependente com uma redução da atividade enzimática (EC<sub>50</sub>) de 2,4 μM.

Outros relatos, suportados por estudos de bioinformática, apontam a utilização do DSF individualmente ou em concorrência com outros fármacos, causando efeitos leishmanicidas (CHAVALI et al., 2012). Esses fatos, somados a alta dependência do *T. cruzi* em relação à Prolina, geram o interesse no estudo dessa via metabólica.

## **1.5 A Importância dos métodos computacionais e biofísicos na caracterização de macromoléculas**

Tendo a sequência de aminoácidos de uma proteína é possível fazer predições de sua estrutura secundária, terciária e quaternária, bem como possíveis modificações pós traducionais e interações proteína-ligantes e proteína-proteína que esta pode realizar. A análise das propriedades das proteínas *in silico* vem se mostrando bastante útil na investigação funcional de proteínas, *design* inteligente de novos medicamentos e no estudo de mecanismos biológicos. Estas predições são importantes, pois podem auxiliar no levantamento de dados, na criação de hipóteses e no ensaio experimental, passos fundamentais no processo de investigação científico.

Em biologia estrutural, as proteínas e enzimas são comumente os principais alvos dos estudos devido a sua importância celular. Para sua avaliação e caracterização são utilizadas diversas técnicas físico-químicas. Aqui, além da Modelagem e Ancoragem Molecular, serão descritos o Dicroísmo Circular (*Circular Dichroism, CD*) e o Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*).

### *1.5.1 Modelagem Molecular*

A estrutura terciária de uma proteína, bem como sua estrutura quaternária, está diretamente ligada a sua função biológica. Assim, estudar e conhecer o arranjo tridimensional de proteínas é imprescindível para o entendimento do mecanismo de ação da proteína; a identificação de sítios de interação e catálise; e o desenho inteligente de fármacos. Técnicas como cristalografia de proteínas e ressonância magnética nuclear (RMN) são amplamente utilizados para a resolução da estrutura terciária de proteínas, entretanto são técnicas que demandam altas concentrações de proteína e/ou condições ideais muitas vezes difíceis de obter para a amostra. Para contornar estes problemas, métodos computacionais vêm sendo

desenvolvidos e utilizados para a resolução das estruturas tridimensionais proteicas (BAZZOLI; TETTAMANZI; ZHANG, 2011).

Tem-se demonstrado que a estrutura tridimensional de uma proteína é mais conservada que a sua estrutura primária e menos de 15% das estruturas depositadas no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) apresentam algum novo tipo de enovelamento ou motivo (KACZANOWSKI; ZIELENKIEWICZ, 2010; PETSKO; RINGE, 2004). Dessa forma, é possível esperar que proteínas que possuem a mesma função tenham o mesmo tipo de arranjo tridimensional e resíduos catalíticos conservados. Em geral, os métodos de modelagem computacional de proteínas utilizam estruturas resolvidas por cristalografia e RMN como moldes para a construção dos modelos estruturais de uma dada proteína devido essa propriedade de conservação de estrutura observada na natureza.

A modelagem molecular pode ser dividida em três grandes grupos de acordo com as suas técnicas de resolução: Modelagem *Ab Initio*, *Threading* e a Modelagem por Homologia ou Comparativa (ZHANG, 2015). Quando não há nenhuma informação conhecida da estrutura tridimensional de proteínas homologas a Modelagem *Ab Initio* é utilizada. Ela utiliza funções de energia para criar as conformações termodinamicamente mais estáveis, partindo da estrutura primária da molécula de interesse. As funções de energia podem ser classificadas em (a) baseadas em física (utilizando funções campos de força molecular entre átomos) ou (b) baseadas em conhecimento (utilizando apenas o conhecimento empírico adquirido de outras estruturas resolvidas). Esta técnica é bem empregada para proteínas pequenas (<150 resíduos), mas é dificilmente utilizada para proteínas maiores, pois a limitação da técnica é a capacidade de processamento do computador utilizado (BAZZOLI; TETTAMANZI; ZHANG, 2011).

Quando existem informações da estrutura tridimensional de proteínas homólogas resolvidas por cristalografia ou RMN, a Modelagem por *Threading* (com 20 a 30% de identidade) ou a Modelagem por Homologia (com identidade maior ou igual a 30%) são utilizadas. No caso da Modelagem por *Threading* a sequência de aminoácidos alvo é alinhada com a estrutura das proteínas modelo, enquanto que na Modelagem por Homologia a sequência alvo é alinhada com as sequências das proteínas modelo. Para a Modelagem por *Threading* é necessário uma sequência alvo e uma biblioteca de proteínas, motivos e fragmentos de sequência de aminoácidos com estruturas conhecidas, onde a sequência alvo poderá ser alinhada e os alinhamentos com maior significância estatística são selecionados. O resultado é a criação de uma subpopulação de fragmentos estruturais que se alinham à sequência primária de interesse que serão montados para a obtenção do modelo otimizado.

No caso da Modelagem por Homologia, a construção do modelo é baseada no alinhamento entre a proteína alvo e as proteínas homologas com estrutura resolvida. Inicialmente realiza-se uma busca nos bancos de dados de estruturas resolvidas como PDB ou SwissProt e seleciona-se as melhores proteínas molde. O programa faz com que a sequência alvo satisfaça as restrições e condições estruturais da proteína molde gerando um número de modelos determinado pelo usuário. O programa produz um arquivo .log e todos os resultados e os procedimentos são registrados com indicação do melhor modelo (ZHANG, 2015).

A escolha da técnica de modelagem (Homologia ou *Threading*) dependerá da qualidade do alinhamento entre a estrutura primária da proteína alvo com a estrutura primária das proteínas homólogas. Entretanto, o uso conjunto de duas ou mais técnicas de modelagem molecular vem se mostrando muito útil para proteínas que não apresentam alta porcentagem de cobertura ou identidade (ZHANG, 2015).

### *1.5.2 Ancoragem molecular como ferramenta investigativa*

A Ancoragem Molecular (*Molecular Docking*) é uma ferramenta essencial na bioinformática para *design* racional de drogas. Seu principal objetivo é o estudo da interação entre um ligante e uma proteína alvo de estrutura conhecida. A técnica de ancoramento molecular apresenta um amplo aspecto de aplicações, podendo ser utilizada na descoberta e otimização de fármacos, hipótese de atividade biológica, identificação de sítios de ligação, interações proteína-proteína e proteína-ácidos nucleicos, mecanismos reacionais, anotação de proteínas e engenharia de proteínas. Os resultados são analisados por funções de pontuação estatística que convertem a energia de interação em valores numéricos. As posições dos ligantes em relação à proteína de interesse podem ser visualizadas por programas como Pymol e Chimera (MORRIS; LIM-WILBY, 2008; KILBURG; GALLICCHIO, 2016).

Existem duas metodologias gerais nas quais a ancoragem molecular pode ser realizada. A primeira considera que o ligante e o receptor são estáticos. O paradigma utilizado é o da chave-fechadura, onde o espaço de busca se torna limitado, pois apenas três graus de liberdade rotacional e translacional podem ser utilizados (eixo x, y e z), e a seleção dos ligantes se dá pelo melhor encaixe estérico. A segunda metodologia considera que o ligante é flexível e o receptor é rígido ou que ambos, ligante e receptor, são flexíveis. O paradigma empregado é o da ligação induzida, no qual emprega a idéia de que as interações entre o ligante e o receptor alterarão a sua conformação inicial até atingir um estado de equilíbrio em

que a proteína passa a exercer função. Entretanto, considerar o receptor, no caso a proteína, como flexível tem um custo de processamento muito elevado e usualmente este é mantido rígido para uma melhor relação tempo-accurácia (MENG et al., 2011).

Para realização dos cálculos conformacionais, vários métodos estatísticos são utilizados e cada um deles pode ser empregado no cálculo das energias de ligação e conformação das moléculas para encontrar o melhor ligante. Contudo, cada função estatística utilizada apresentam vantagens e limitações baseada no tipo de conhecimento empregado para a formulação das equações de energia (MENG et al., 2011).

### *1.5.3 Dicroísmo Circular (CD) na análise biofísica*

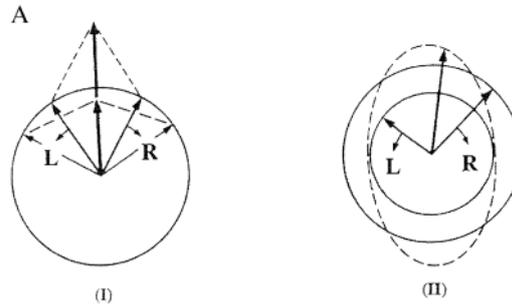
O Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica espectroscópica utilizada para a análise de vários tipos de moléculas, mas seu uso mais importante se dá no estudo de biomoléculas, em especial, proteínas e ácidos nucleicos, podendo ser aplicado na investigação de sua estabilidade, conformação e interação com ligantes e, assim, obter-se informações conformacionais, termodinâmicas e cinéticas (CORRÊA; RAMOS, 2009; KELLY; JESS; PRICE, 2005).

O CD é a diferença na absorção da luz polarizada a esquerda e a direita que ocorre quando moléculas que contém um ou mais grupos que absorvem luz, também chamados de cromóforos. Após passar por uma molécula cromófora, os feixes componentes da luz polarizada sofrem uma alteração nas suas amplitudes e os seus vetores campo-elétrico, quando combinados, formam um feixe de luz elipticamente polarizado (Figura 10). O CD é dado pela equação (1)

$$CD = \Delta A(\lambda) = A(\lambda)_L - A(\lambda)_R \quad (1)$$

Onde  $\lambda$  é o comprimento de onda; L é referente à luz polarizada a esquerda e R é referente à luz polarizada a direita.

**Figura 11: Decomposição do feixe de luz plano polarizado em suas componentes esquerda (L) e direita (R).**

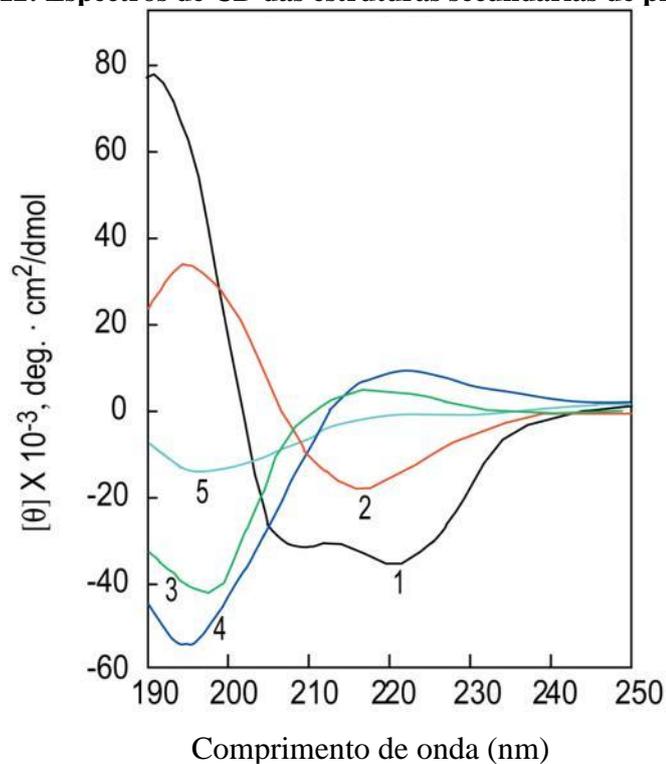


I – antes de passar pela amostra. II – depois de passar pela amostra (linha tracejada).

Fonte: Elaborado pelo autor

Como a maioria das macromoléculas biológicas são opticamente ativas e sua atividade óptica está intimamente relacionada à sua conformação, elas, em especial as proteínas, estão cheias de centros quirais (como o  $C\alpha$  e  $C\beta$  dos aminoácidos) distribuídos ao longo de suas estruturas secundárias, que podem ser distinguidas através de seus espectros de CD (Figura 11). Além disso, as ligações dissulfeto e as ligações peptídicas também exibem bandas de absorção entre 250-260 nm e 182-250 nm, respectivamente.

**Figura 12: Espectros de CD das estruturas secundárias de proteínas.**



1. Hélices-alfa. 2. Fita-beta antiparalela. 3. Fita-beta paralela. 4. Colágeno. 5. Colágeno denaturado. Fonte: Greenfield (2009)

A composição da estrutura secundária pode ser estimada partir do espectro de CD (KELLY; JESS; PRICE, 2005; GREENFIELD, 2006; CORRÊA; RAMOS, 2009), através da equação (2)

$$[\theta(\lambda)] = \chi\alpha[\theta\alpha(\lambda)] + \chi\beta[\theta\beta(\lambda)] + \chi t[\theta t(\lambda)] + \chi r[\theta r(\lambda)] \quad (2)$$

Onde  $[\theta(\lambda)]$  é a elipicidade molar média;  $\chi\alpha$ ,  $\chi\beta$ ,  $\chi t$  e  $\chi r$  são os coeficientes, em porcentagem, das estruturas secundárias de hélices-alfa, folhas-beta, curvas-beta e estruturas desordenadas, respectivamente, em função da elipicidade que está relacionada à  $\Delta A$  (equações (3) e (4))

$$\theta = 180 \ln 10 x \frac{\Delta A}{4\pi} \quad (3)$$

$$[\theta] = \frac{\theta}{cl} \quad (4)$$

Onde  $[\theta]$  é a elipicidade molar;  $c$  é a concentração da amostra;  $l$  é o caminho óptico;  $\theta$  é a elipicidade em graus. A elipicidade é correspondente ao ângulo cujo arco é igual a razão entre os eixos maior e menor da elipse do feixe elipticamente circularizado (Figura 10).

#### 1.5.4 O Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) na análise biofísica

O Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*) é uma técnica que mede o espalhamento da luz a partir de moléculas, macromoléculas ou partículas em suspensão em uma solução em função do tempo e, assim, permite verificar medidas hidrodinâmicas, a polidispersividade (variações de tamanho das partículas), agregação da amostra e sua massa aparente (SCHIMITZ, 1990; GOLDBURG, 1999; BERNE; PECORA, 2000; MALVERN, 2004; BARRON; LI, 2014; SARTOR, [s. d.]).

O DLS parte de dois pressupostos. O primeiro é que as partículas em suspensão estão em movimento Browniano, ou seja, em movimento aleatório resultante da interação física das partículas com as moléculas do solvente; o segundo é que as partículas em suspensão se comportam como se fossem esferas perfeitas com mesmo diâmetro molecular da partícula. Da primeira suposição, pode-se inferir que a temperatura e a viscosidade do solvente irão interferir na velocidade da movimentação das partículas suspensas, ou seja, na sua difusão pelo solvente. Da segunda suposição, quanto maior for a partícula, mais lentamente ela se moverá, uma vez que o atrito sofrido durante sua translação no solvente será maior do que em

relação a partículas de menor diâmetro. Além disso, esta última ignora o fato de que as macromoléculas nem sempre são globulares, mesmo as que são, podem não ter seus arranjos de estrutura quaternária se comportando como esferas, e nem mesmo o efeito da solvatação do solvente, que contribui para um diâmetro superestimado. As suposições acima são expressas através da equação de Stoke-Einsten (5).

$$D = \frac{RT}{N_A 6\pi\eta R_h} \quad (5)$$

Onde D é o coeficiente de difusão. R é a constante universal dos gases; T é a temperatura em Kelvin;  $N_A$  é o número de Avogadro;  $\eta$  é a viscosidade do solvente;  $R_h$  é o raio de Stokes.

Sabendo que a constante de Boltzmaan é dada por

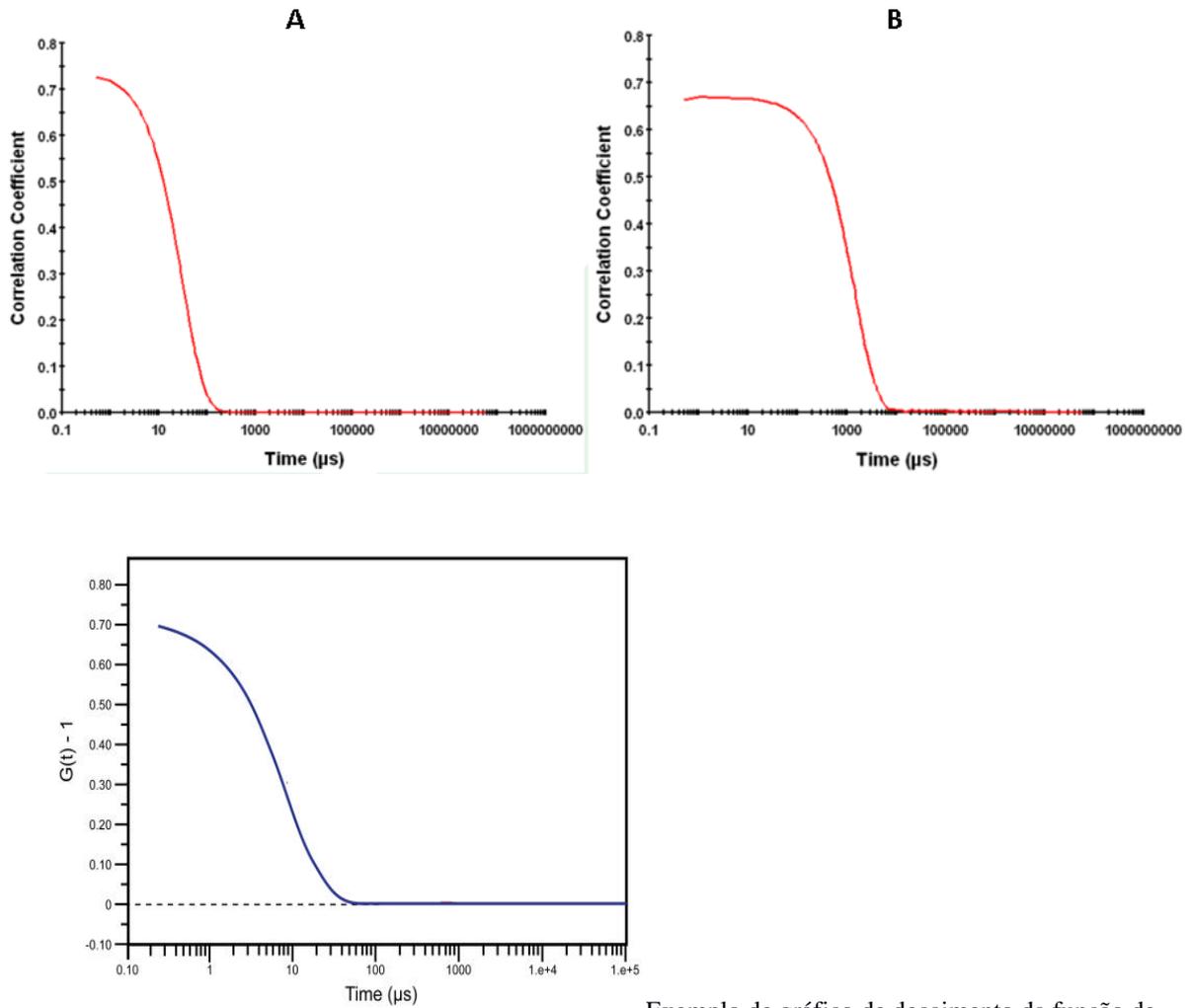
$$k_B = \frac{R}{N_A} \quad (6)$$

Temos,

$$D = k_B \frac{T}{6\pi\eta R_h} \quad (7)$$

O princípio do DLS baseia-se na incidência de uma fonte de luz monocromática em uma suspensão com o monitoramento das flutuações da intensidade da luz espalhada em função do tempo (medido em nano- ou microssegundos). Como as partículas estão se movimentando, os intervalos de tempo utilizados são muito curtos, assim é possível existir uma correlação forte entre o padrão de espalhamento da luz em um instante de tempo inicial (t) e um instante de tempo subsequente muito próximo (t+ $\tau$ ), pois a distância percorrida pela partícula se torna muito pequena e é plausível considerar os dois sinais como o mesmo. Com o passar do tempo, a distância percorrida aumenta e a função de autocorrelação decai exponencialmente, e está diretamente ligado ao coeficiente de difusão (Figura 12).

Figura 13: Gráfico de Decaimento da Função de Autocorrelação



Exemplo de gráfico de decaimento da função de autocorrelação. A – amostras pequenas. B – Amostras grandes  
Fonte: (MALVERN, 2004)

A equação de autocorrelação é dada por

$$G(t) = \frac{I(t)I(t+\tau)}{I(t_\infty)^2} \quad (8)$$

$$G(t) = Ae^{2\Gamma t} + B \quad (9)$$

Onde  $I(t)$  é a intensidade da luz espalhada em um instante inicial e  $I(t+\tau)$  é a intensidade num instante imediatamente subsequente;  $A$  e  $B$  são constantes;  $\Gamma$  é a constante de decaimento exponencial, dada por

$$\Gamma = Dq^2 \quad (10)$$

Onde  $q$  equivale a

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (11)$$

E  $\theta$  é o ângulo do espalhamento.

Na prática, encontrando-se a constante de decaimento, obtém-se o coeficiente de difusão e dele calcula-se o raio de Stokes (Equação 7). Como o raio de Stokes refere-se à esfera perfeita com massa definida, é possível calcular a massa molecular aparente das partículas em solução e identificar o seu estado oligomérico. Esses dados podem ser comparados com outras técnicas, como, por exemplo, a cromatografia de exclusão molecular, para corroboração dos dados.

## 2 JUSTIFICATIVA

A Doença de Chagas é uma enfermidade que afeta 10 milhões de pessoas no mundo e ainda não apresenta tratamento eficaz. Apesar do sucesso no controle de vetores, outras formas de infecção vem disseminando a doença para outras regiões do mundo, aumentando a urgência de se desenvolver novos tratamentos e fármacos para os indivíduos afetados, e vacinas.

Levando-se em consideração a importância da prolina na resistência do *Trypanosoma cruzi* aos estresses oxidativos, osmóticos, nutricionais e térmicos, sua influência na metacicloquênese e na capacidade de adesão e invasão celular, o estudo da via metabólica da prolina torna-se interessante, pois esse aminoácido é essencial para todas estas funções. Além disso, levando-se em conta a importante função da P5CDH realizada no controle das concentrações da molécula intermediária P5C, que pode afetar a viabilidade do parasita, pode-se concluir que esta enzima apresenta um papel crucial na sobrevivência do *T. cruzi*. Dessa forma, caracterizar a P5CDH do *Trypanosoma cruzi* é extremamente interessante, pois ela passa a ser um possível alvo terapêutico no tratamento da Doença de Chagas; o entendimento de suas características estruturais e biofísicas são, então, cruciais para o melhor entendimento da via bem como para o futuro *design* inteligente de fármacos.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a caracterização biofísica da *TcP5CDH* recombinantes para contribuir com a investigação desta enzima como potencial alvo quimioterápico contra a infecção por *T. cruzi*.

Para alcançar este objetivo foram detalhados os seguintes objetivos específicos:

1. Criar um Modelo Tridimensional e realizar análises de Ancoragem Molecular com a *P5CDH in silico*.
2. Expressar e purificar a proteína recombinante *TcP5CDH*.
3. Verificar o comportamento oligomérico da *TcP5CDH* através do Espalhamento Dinâmico da Luz.
4. Verificar a composição da estrutura secundária da *TcP5CDH* e sua estabilidade térmica através do Dicroísmo Circular.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Análise da proteína *TcP5CDH* por meio de ferramentas de Bioinformática

A análise das propriedades das proteínas *in silico* vem se mostrando bastante útil na investigação funcional e também como guia para o desenho de experimentos em biologia molecular e estrutural. Tendo a estrutura primária de uma proteína é possível fazer previsões de sua estrutura secundária, terciária e quaternária, bem como possíveis modificações pós traducionais e interações proteína-ligantes e proteína-proteína.

#### 4.1.1 Análise da estrutura primária

A sequência de aminoácidos da *TcP5CDH* foi obtida no site do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sob o identificador CDG15436.1 . Em seguida ela foi utilizada para a análise teórica dos parâmetros físico-químicos através do programa PROTPARAM do servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Para prever se algum par de cisteínas presente na estrutura primária poderia formar ligações dissulfeto para manutenção estrutural, recorreu-se ao programa DISULFIND (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>). O Banco de Dados de Domínios Conservados (*Conserved Domain Database*, CDD. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd\\_search.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html)) e o programa InterProScan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>) foram escolhidos para analisar os domínios e aminoácidos conservados.

Alinhamentos múltiplos foram realizados e avaliados por meio do programa Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) e JALVIEW 2.9.0b.2 (disponível em <http://www.jalview.org/>) utilizando-se a matriz BLOSUM. Foram comparadas as sequências da proteína P5CDH homólogas de outros organismos com a *TcP5CDH*.

#### 4.1.2 Análise das regiões funcionais da *TcP5CDH*

Para verificar a existência de sequências de endereçamento, foram empregados os programas MitoProt II (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), PSORT II (<http://www.genscript.com/psort.html>) e TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Para verificar a existência de regiões transmembrana foram utilizados os programas Phobius (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>), TMPred (<http://www.ch.embnet.org/>

software/TMPRED\_form.html), DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

As predições da estrutura secundária da proteína foram realizadas pelo servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

#### 4.1.3 Modelagem das estruturas terciárias e quaternárias da TcP5CDH

Os modelos da P5CDH de *T. cruzi* foram realizados pela técnica de Modelagem por Homologia com o programa MODELLER 9.16. A avaliação dos modelos gerados foi feita por meio de programas específicos como SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>), RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) e ProSa (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). Os modelos criados e avaliados foram visualizados pelo programa PyMol (DeLano Scientific LLC) através do RMSD com proteínas homólogas. Os procedimentos (scripts) se encontram nos ANEXOS

#### 4.1.4 Ancoragem Molecular

A ancoragem molecular da P5CDH de *Trypanosoma cruzi* foi realizada utilizando o método receptor rígido e ligante flexível com programa AUTODOCK-VINA seguindo o Tutorial de Huey e colaboradores (2012). O receptor foi a P5CDH, gerada via Modelagem por Homologia e os ligantes foram o NAD<sup>+</sup>, L-Glutamato, obtidos no banco de dados ZINC (<http://zinc.docking.org/>). O Dissulfiram e o Ácido glutâmico semialdeído (GSA) que foram desenhados através do software ACDLabs 2016. As melhores poses foram comparadas às estruturas resolvidas dos homólogos com estes ligantes.

## 4.2 Preparação da proteína recombinante TcP5CDH

### 4.2.1 Expressão da proteína recombinante TcP5CDH em *E. Coli*

Inicialmente, células de *E. coli* CodonPlus, transformadas com a construção pET28a-TcP5CDH, foram expandidas em inóculos de 10 mL de meio de cultura LB contendo Kanamicina (30 ug/mL) e Tetraciclina (2ug/mL) e incubadas por 16 horas sob agitação de 80 rpm a 37°C. Após crescimento das células, adicionou-se o inóculo em 1 L de meio LB líquido (diluição 1:100) que foi incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm até atingir a densidade óptica de 0,6 absorbância, medido a 600 nm em espectrofotômetro. Em seguida, a expressão

da proteína P5CDH foi induzida com 200 mM de IPTG por 20 horas a 20°C sob agitação de 150 rpm.

A construção pET28a-*Tc*P5CDH foi cordialmente cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ariel Mariano Silber do Grupo de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Nessa construção a cauda de poli-histidina foi colocada no N-terminal seguida de um sítio de clivagem por trombina.

Após a expressão, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 40 minutos a 4°C. O Pellet foi então ressuscitado em 50 mL de Tampão de Lise (50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 100 µg/mL Lisozima, 10 µM Chymostatina, 1 µM Pepstatina, 1 µM Leupeptina, 1 µM Aprotinina, 1 µM Antipain) e incubado em gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida à ultrassonicação por 4 ciclos no equipamento *550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific)*. Cada ciclo corresponde a uma sonicação de 30 segundos seguida de um intervalo de 60 segundos. As células lisadas foram centrifugadas a 13000 rpm por 45 minutos à 4°C para separar a fração solúvel (sobrenadante) da fração insolúvel (precipitado). A fração solúvel foi submetida ao processo de purificação.

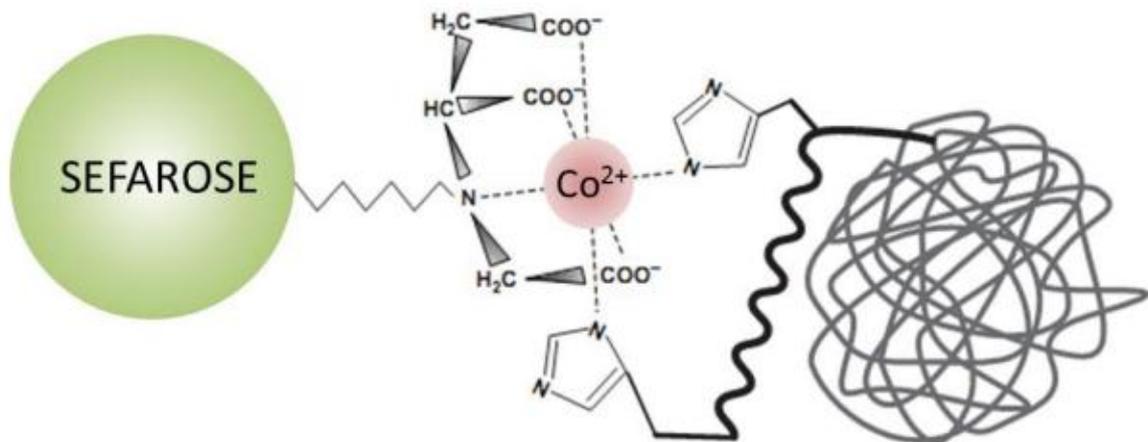
#### 4.2.2 Purificação por Cromatografia de Afinidade

O vetor pET28 apresenta duas possibilidades de adição da cauda de poli-histidina ao gene de interesse. Uma das caudas pode ser colocada no C-terminal, onde se torna parte integral da proteína por não possuir um sítio de clivagem para sua remoção. A segunda cauda pode ser colocada no N-terminal, lugar em que a clivagem por Trombina a remove, deixando apenas 3 resíduos extras. A presença da cauda de poli-histidina possibilita a purificação de proteínas de interesse através da Cromatografia de Afinidade (*Affinity Metal Ion Chromatography – IMAC*). A construção pET28a-P5CDH apresenta a cauda de poli-histidina no N-terminal.

Uma coluna de bancada foi utilizada para fazer o processo de purificação por gravidade. 5 mL da matriz *TALON Metal Affinity Resin* (BD BIOSCIENCES, 2003), na qual o íon metálico utilizado é o cobalto (Co<sup>2+</sup>). A coluna, então, foi equilibrada com 3 volumes de coluna (1 volume de coluna equivale a 5 mL de resina) de Tampão A (50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5% Glicerol). Em seguida o sobrenadante foi aplicado e fez-se uma nova lavagem com 10 volumes de coluna de Tampão A para remoção das proteínas não ligadas. Em seguida aplicou-se 10 volumes de coluna Tampão B (50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 5% Glicerol) e a eluição foi realizada com 2 volumes de coluna de Tampão C (50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 300 mM NaCl, 300 mM

Imidazol, 5% Glicerol). Alíquotas de cada passo da cromatografia, incluindo alíquotas do sobrenadante e do precipitado, foram coletadas e acompanhadas através de gel de eletroforese 10% SDS-PAGE, como mostra o esquema ilustrativo na figura 13.

**Figura 14: Esquema Ilustrativo da estrutura da resina da coluna de cromatografia por afinidade com metal imobilizado.**



Fonte: Adaptado do manual TALON Metal Affinity Resin (BD Bioscience)

As resinas de afinidade são compostas por esferas de sefarose quelantes que imobilizam os íons metálicos, normalmente Níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e Cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), mas também Zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), Cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou Ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). A ligação de proteínas com o íon metálico ocorre devido à formação de um complexo entre o íon quelado e estruturas ricas em histidina e cistina, por exemplo, que são dependentes do pH (variando de 6 a 8). Entretanto, essas regiões podem ou não estar expostas dificultando a formação do complexo. Com a cauda de poli-histidina, a proteína alvo fica mais facilmente selecionável, pois a região rica neste resíduo (6 a 8 histidinas em tandem) fica exposta para interagir facilmente com a resina. Para a eluição, é possível utilizar variação da força iônica e pH do tampão (podem causar danos à proteína), adicionando EDTA para remover o íon metálico ligado à proteína (pode causar contaminação com o íon metálico) ou o uso de competidores de afinidade como, por exemplo, o Imidazol (pode causar contaminação da amostra, mas facilmente removido por diálise). O Imidazol possui um anel imidazólico que em pH 8.0 compete pela ligação ao íon da resina por formar um complexo mais estável. Assim, aumentos crescentes da concentração de Imidazol podem ser utilizados para remoção gradual de proteínas da coluna, processo este comumente aplicado em sistemas automatizados como o AKTA.

#### 4.2.3 Diálise

Para os ensaios de cristalização, a fração eluída da cromatografia por afinidade foi dialisada em 2 litros de Tampão de Diálise I (50 mM Hepes (pH 8.1), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM TCEP, 5% Glicerol) a 4°C sob agitação por 16 horas.

Para os ensaios de Dicroísmo Circular, a fração eluída da cromatografia por afinidade foi dialisada em 2 litros de Tampão de Diálise II (50 mM Fosfato de sódio (pH 8.1), 150 mM NaF, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM TCEP, 5% Glicerol) a 4°C sob diálise por 16h.

O TCEP (*Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride*, SIGMA) é um composto solúvel que apresenta alta capacidade redutora sendo aplicado na redução de ligações de sulfeto em peptídeos e proteínas, auxiliando para evitar a agregação de proteínas. O NaF é um sal que não apresenta absorção significativa da luz polarizada na região do UV distante, ao contrário do NaCl, não interferindo nas medições.

A amostra dialisada foi então concentrada por ultrafiltração em membrana Millipore com cut-off de 50 kDa, sob rotação de 2500 rpm a 4°C. A concentração da proteína foi medida utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), no qual é possível aplicar apenas 2 uL da amostra de proteína para a leitura da absorbância a 280 nm e, com seu coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) é possível obter a concentração (C) através da lei de Beer-Lambert, a saber:

$$A(\lambda) = \log(I/I_0) = C\epsilon(\lambda) \lambda$$

Onde  $\lambda$  é o caminho óptico, que neste caso equivale a 1 mm.

#### 4.2.4 Clivagem da cauda de histidina com Trombina

Após a diálise e concentração, a amostra proteica foi submetida à clivagem da cauda de poli-histidina com a protease Trombina, que foi adicionada na proporção de 1 U para cada 100 ug de proteína recombinante. A reação foi mantida a 4°C por 16 horas e interrompida com a adição de 1 mM de PMSF, que atua como inibidor da atividade proteolítica da Trombina.

#### 4.2.5 Purificação por Cromatografia de Exclusão Molecular

Em seguida, a proteína foi submetida a uma Cromatografia de Exclusão Molecular (*Molecular Exclusion Chromatography, SEC*), para a remoção de proteínas contaminantes e a

cauda de poli-histidina clivada. Nesta etapa, foi utilizada a coluna Superdex 200 16/60 acoplada ao sistema de cromatografia AKTA Explorer 10, ambas da empresa General Electric. 2 mL da amostra na concentração aproximada de 2.0 mg/mL foi injetada do sistema com a coluna previamente equilibrada com tampão de diálise I. O fluxo da corrida foi de 1 mL/min e o monitoramento foi realizado a 280 nm por espectrofotometria e as frações foram analisadas em gel 10% SDS-PAGE. As frações da proteína foram reunidas e concentradas por ultrafiltração.

Na cromatografia de exclusão molecular, as moléculas são separadas em relação ao seu tamanho. A matriz da coluna é constituída de um polímero com poros de tamanhos selecionados, no qual as proteínas com maior massa molecular migram mais rapidamente pela resina, enquanto as menores penetram nesses poros migrando mais lentamente. Dessa forma, proteínas maiores sairão mais rapidamente que as menores e uma separação entre a proteína alvo e seus contaminantes é possível. O sistema automático AKTA de cromatografia possui um sistema de espectrofotometria com comprimento de onda de 280 nm acoplado no final da coluna para monitorar graficamente a saída das proteínas. Assim, pode-se verificar a qualidade da cromatografia e seus contaminantes, bem como estimar, utilizando padrões moleculares, o tamanho das proteínas eluídas e seu raio hidrodinâmico.

### **4.3 Caracterização Biofísica da proteína recombinante *TcP5CDH***

A caracterização biofísica da proteína recombinante P5CDH de *Trypanosoma cruzi* foi realizada através das técnicas de dicroísmo circular para verificar a composição da estrutura secundária, espalhamento da luz dinâmica para investigar o estado oligomérico em solução e suas propriedades hidrodinâmicas. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo, em associação com o Dr. Brian Mantilla, pós-doutorando do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, representado pelo Prof. Dr. Ariel Silber.

#### *4.3.1 Espalhamento Dinâmico da Luz*

O DLS da proteína P5CDH foi realizado no aparelho Zetasizer  $\mu$ V (Malvern Instr. Ltda) a 15 °C em cubetas de quartzo com capacidade de 2  $\mu$ L. A amostra foi concentrada a 0.5mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.5 mg/mL e 2.0 mg/mL em Tampão de Diálise I. Em seguida, a

amostra foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos e posteriormente aplicada na cubeta para leitura imediata. Os dados foram calculados e analisados pelo software Malvern (Malvern Instr. Ltda).

#### 4.3.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A Espectroscopia de Dicroísmo Circular da P5CDH foi obtida utilizando o espectropolarímetro JASCO J-810 (JASCO International Co. Ltda.) equipado com um sistema de controle de temperatura PELTIER PTC 423S/15, do Laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. A proteína apresentava concentrações de 0.2 mg/mL em Tampão de Diálise II e foi analisada na presença e ausência de 100  $\mu$ M de  $\text{NAD}^+$ , L-Glu e do inibidor Dissulfiram. A denaturação térmica foi realizada na faixa de 10 a 90°C, com variações de 5°C e variações de 1°C na região de inflexão da curva de denaturação com monitoramento do comprimento de onda de 220 nm. Os escaneamentos do espectro de dicroísmo circular para cada ponto da curva de denaturação foram realizados com velocidade de 50nm/min, 17 scans para cada temperatura. A partir dos espectros foram calculados a porcentagem de estrutura secundária da P5CDH de *T. cruzi*. À partir da curva de denaturação foram obtidos os valores de  $T_m$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise da proteína TcP5CDH por meio de ferramentas de Bioinformática

#### 5.1.1 Análise da estrutura primária

A sequência de aminoácidos para o monômero de P5CDH de *Trypanosoma cruzi* foi analisada pelo programa PROTPARAM sem a cauda sinalizadora para exportação mitocondrial, uma vez que ela não estaria presente na sequência dos vetores utilizados para a expressão. O programa mostrou que a proteína possui 539 aminoácidos e uma massa molecular de 59.91 kDa (aprox. 60 kDa), um ponto isoeletrico teórico de 7.61 e coeficientes de extinção molar de 70415 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> e 69790 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para os estados oxidados e reduzidos, respectivamente, e ainda apresentou a composição de aminoácidos da sequência (Tabela 1). Entretanto, em relação ao ponto isoeletrico, experimentos anteriores (MANTILLA, 2013) mostram que a TcP5CDH apresenta um ponto isoeletrico empírico de aproximadamente 7,1 e, portanto, esse resultado empírico foi utilizado para a preparação dos tampões.

**Tabela 1: Composição da Estrutura Primária da P5CDH de *Trypanosoma cruzi***

Resíduo	Quantidade	(%)	Resíduo	Quantidade	(%)	Resíduo	Quantidade	(%)
Ala	54	10,0	Gly	33	6,1	Pro	27	5,0
Arg	30	5,6	His	16	3,0	Ser	45	8,3
Asn	21	3,9	Ile	26	4,8	Thr	31	5,8
Asp	29	5,4	Leu	39	7,2	Trp	7	1,3
Cys	10	1,9	Lys	28	5,2	Tyr	21	3,9
Gln	20	3,7	Met	10	1,9	Val	36	6,7
Glu	28	5,2	Phe	28	5,2	Sec	0	0,0

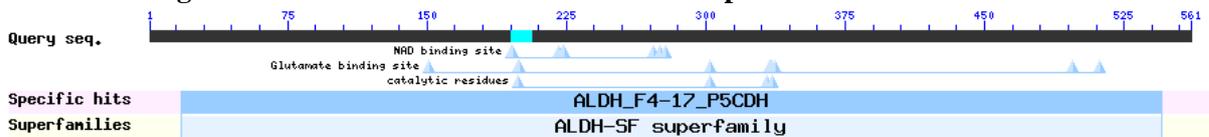
Fonte: Elaborada pelo autor

Olhando para a composição de aminoácidos, nota-se uma grande quantidade de resíduos de cisteína, o que levantou o questionamento sobre a existência de ligações de dissulfeto na sua estrutura. Para verificar se esses resíduos estavam formando ligação de dissulfeto ou reduzidos, foi utilizado o programa DISSULFINDE. O DISSULFINDE prediz o estado oxidativo das cisteínas dando valores de 1 para cisteínas oxidadas, ou seja, que estão formando ligações de dissulfeto, e 0 para as cisteínas que estão reduzidos, ou seja, não formam ligações de dissulfeto. Além disso, o programa dá uma pontuação para cada cisteína

que varia de 1 a 9 como valores de confiabilidade estatística do resultado, sendo 9 o mais confiável (CERONI et al., 2006).

Para a *TcP5CDH*, nenhuma cisteína na sequência de aminoácidos foi predita como formadora dessas ligações, tendo todas recebido o valor 9 de confiabilidade. Para verificar se este resultado era concreto, repetiu-se o teste no programa com sequências de proteínas homólogas de *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae* (também ricas em cisteína) já resolvidas pro cristalografia de raios-x. A análise dos domínios da sequência da *TcP5CDH* foi realizada através do Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) e pelo servidor InterProScan. Nestas ferramentas, a *TcP5CDH* foi apontada como pertencente à superfamília das Aldeído Desidrogenases (ALDH) família 4 (humanos e outros mamíferos) e 17 (*Drosophila melanogaster*). No CDD, foi indicado um sítio de ligação a NAD<sup>+</sup> (195I, 196A, 221K, 223S, 224P, 272F, 275S, 278V), um sítio de ligação a Glutamato (151E, 199N, 200F, 302E, 333G, 334Q, 335K, 336C, 337S, 497Y, 512F) e os resíduos catalíticos (199N, 302E, 333G, 336C) (Figura 14).

**Figura 15: Análise de Domínios Conservados pelo servidor da *TcP5CDH*.**



A sequência da proteína P5CDH de *T. cruzi* pertence à superfamília das Aldeído Desidrogenases e possui similaridade com as famílias 4 e 17.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>

Em seguida, foi realizada uma análise de conservação da sequência através de alinhamentos múltiplos. Inicialmente, a sequência primária da *TcP5CH* foi alinhada com a sequência homólogas de organismos da família Trypanosomatidae (Figura 15) e, em seguida, foi alinhada de proteínas homólogas com estrutura tridimensional resolvidas (Figura 18). As sequências foram obtidas através do uso da ferramenta BLASTp e posteriormente alinhadas utilizando-se os programas MUSCLE e analisados com o *software* Jalview.

A sequência completa da *TcP5CDH* alinhada com os homólogos da família Trypanosomatidae apresenta mais de 80% de identidade com as sequências dos *Trypanosoma sp.*, enquanto apresenta até 67,5% de identidade com as *Leishmania sp.* (Tabela 2). Olhando para o alinhamento, é possível observar que na região N-terminal há uma sequência conservada MLRR seguida de regiões ricas em alanina FAFAA(Y)A, que foram descritas por Kranacova e colaboradores (2012) como motivos proteicos de endereçamento de proteínas para a mitocôndria (Figura 16). Contudo, esta região não foi encontrada nem apontada pelos

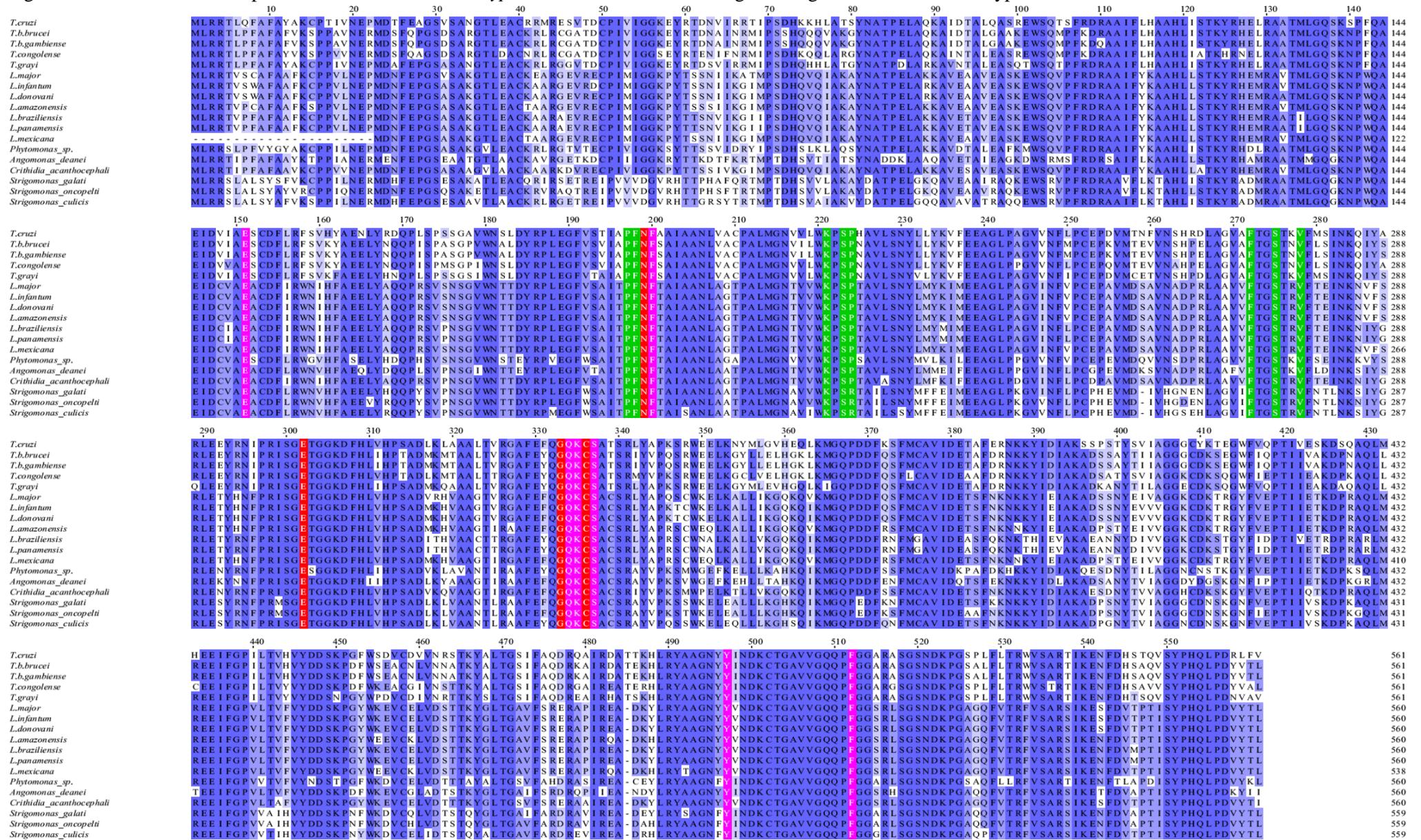
programas Mitoprot, TargetIP, SignalIP e PSORT quando foram utilizados para verificar a existência de sequências de exportação celular. Nota-se também que os aminoácidos de ligação a  $\text{NAD}^+$ , ao substrato e os resíduos catalíticos são extremamente conservados nesses organismos (Figura 17).

**Tabela 2. Organismos da família Trypanosomatidae utilizados no alinhamento múltiplo**

<b>Organismo</b>	<b>ID de Acesso</b>	<b>Identidade</b>	<b>E-value</b>
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	XP822573.1	81,64 %	0.0
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	XP011777586.1	81,46 %	0.0
<i>Trypanosoma congolense</i>	CCC93505.1	80,04 %	0.0
<i>Trypanosoma grayi</i>	XP009308031.1	85,03 %	0.0
<i>Leishmania major</i>	XP003721698.1	67,56 %	0.0
<i>Leishmania infantum</i>	XP001462773.1	67,56 %	0.0
<i>Leishmania donovani</i>	XP003857958.1	67,56 %	0.0
<i>Leishmania mexicana</i>	XP003871691.1	67,53 %	0.0
<i>Leishmania braziliensis</i>	XP001561611.1	66,31 %	0.0
<i>Leishmania panamensis</i>	XP010700961.1	66,13 %	0.0
<i>Leishmania amazonensis</i>	AEB52361.1	67,56 %	0.0
<i>Angomonas deanei</i>	EPY26278.1	64,88 %	0.0
<i>Strigomonas oncopelti</i>	AGT02588.1	64,71 %	0.0
<i>Strigomonas galati</i>	AGT02713.1	65,53 %	0.0
<i>Strigomonas culicis</i>	EPY28301.1	63,81 %	0.0
<i>Phytomonas sp.</i>	CCW64018.1	69,52 %	0.0
<i>Crithidia acanthocephali</i>	AGT02655.1	66,84 %	0.0

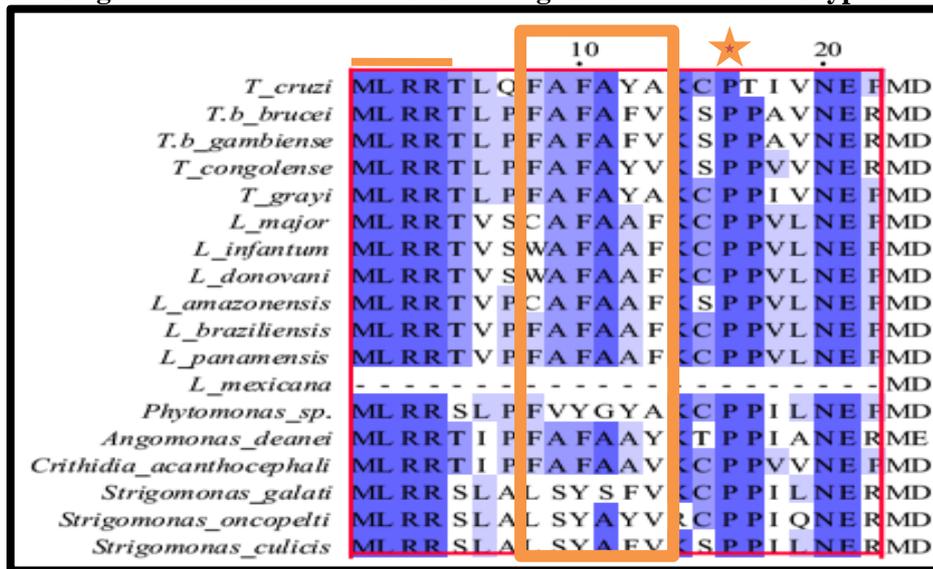
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 16: Alinhamento Múltiplo da Proteína P5CDH de *Trypanosoma cruzi* com homólogas de organismos da família Trypanosomatidae.



(Verde) Resíduos do sítio de ligação ao NAD<sup>+</sup>. (Magenta) Resíduos do sítio de ligação a Glutamato. (Vermelho) Resíduos Catalíticos. (Azul) Grau de conservação de aminoácidos.

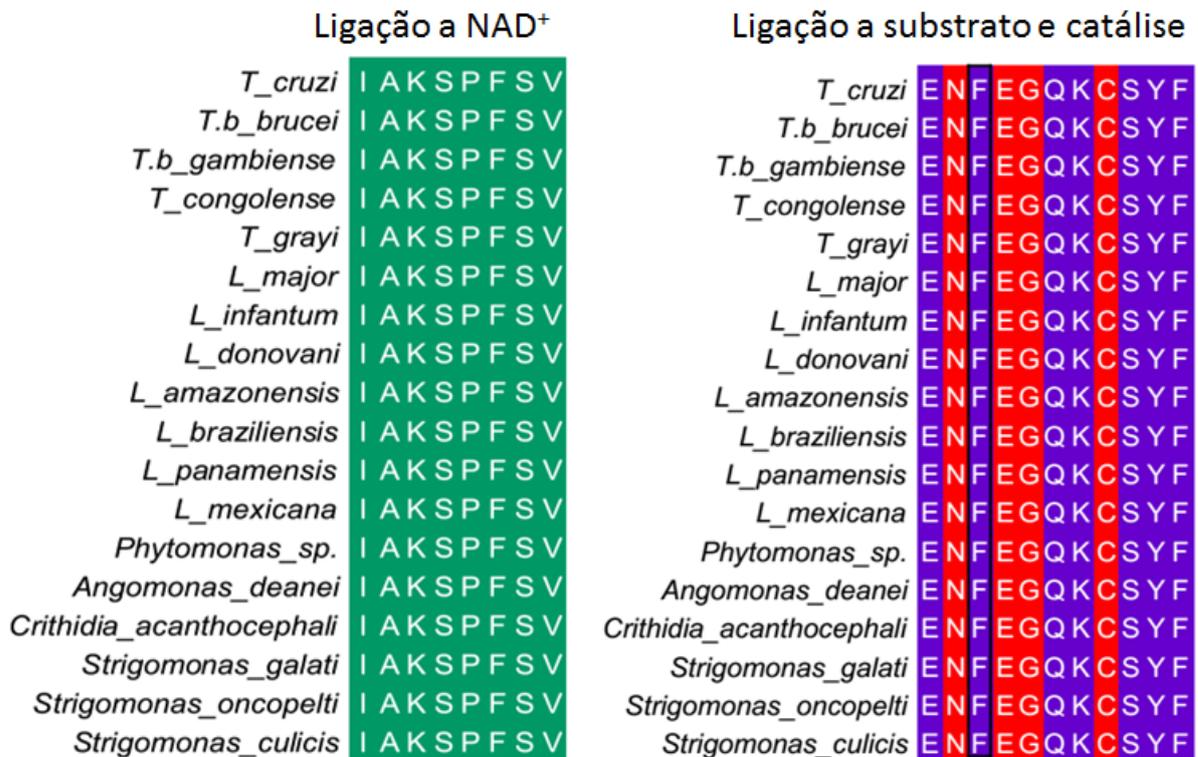
Figura 17: Região N-terminal das P5CDH dos organismos da família Trypanosomatidae



A sequência sinalizadora de direcionamento mitocondrial é caracterizada pelos motivos proteicos MLRR (barra laranja), as regiões ricas em alanina FAFAY (quadro) e pelo sítio de clivagem após uma phenilalanina altamente conservada (estrela).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18: Alinhamento múltiplo dos resíduos de ligação a  $\text{NAD}^+$ , ao substrato e catalíticos das proteínas homólogas dos organismos da família Trypanosomatidae



Resíduos de ligação a  $\text{NAD}^+$  (verde) ao substrato (magenta) e resíduos catalíticos (vermelho) conservados

Fonte: Elaborada pelo autor.

A sequência completa da *TcP5CDH*, alinhada com as proteínas homólogas com estrutura resolvida, apresenta mais de 45% de identidade com as sequências de humanos, camundongos e leveduras, e pouco mais de 30% de identidade com arqueobactérias (*Thermus thermophilus*) e bactérias (*Micobacterium tuberculosis*), como mostra a Tabela 3.

**Tabela 3: Estruturas molde utilizadas na modelagem por homologia**

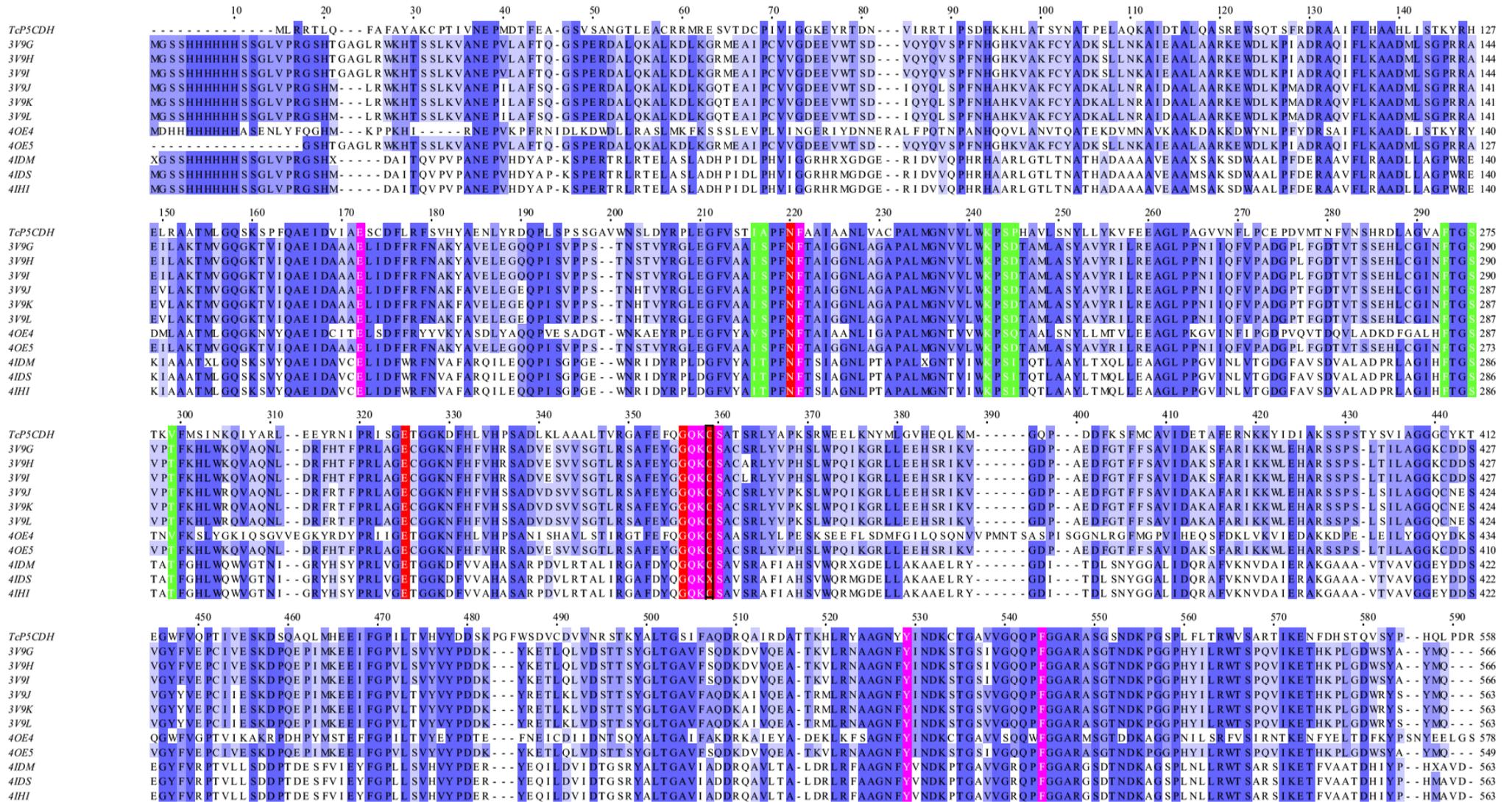
PDB	Organismo	(%) Identidade	(%) Cobertura	E- value	Resolução (Å)	Técnica	Ligantes
40E5	<i>Homo sapiens</i>	47	93	5e-167	1.95	Raios-X	Mg <sup>2+</sup>
3V9G	<i>Homo sapiens</i>	47	93	7e-167	2.5	Raios-X	-
3V9H	<i>Homo sapiens</i>	47	93	1e-166	2.4	Raios-X	-
3V9I	<i>Homo sapiens</i>	47	93	5e-166	2.85	Raios-X	-
3V9J	<i>Mus musculus</i>	47	93	1e-167	1.81	Raios-X	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
3V9K	<i>Mus musculus</i>	47	93	1e-167		Raios-X	L-Glu
3V9L	<i>Mus musculus</i>	47	93	1e-167		Raios-X	NAD <sup>+</sup>
4IHI	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43	97	3e-142	2.25	Raios-X	NAD <sup>+</sup>
4IDS	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42	97	1e-140	2.27	Raios-X	-
4IDM	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42	97	1e-139	2.5	Raios-X	-
4OE4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48	95	3e-167	2.17	Raios-X	NAD <sup>+</sup>
1UZB	<i>Thermus thermophilus</i>	33	93	9e-65	1.9	Raios-X	-
2BJA	<i>Thermus thermophilus</i>	33	93	5e-65	1.4	Raios-X	NAD <sup>+</sup>
2BHP	<i>Thermus thermophilus</i>	33	93	2e-65	1.9	Raios-X	NAD <sup>+</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Olhando-se para os resíduos de ligação a NAD<sup>+</sup>, ao substrato e os resíduos catalíticos, nota-se que não muito conservados (Figura 18). Observa-se que os resíduos da região de ligação a NAD<sup>+</sup> do *T. cruzi* assemelham-se mais aos resíduos de *Thermus thermophilus* (1UZB, 2BJA e 2BHP) e aos resíduos de *Saccharomyces cerevisiae* (4OE4). H uma

substituição da Alanina pela Serina na cadeia de *Mus musculus* e de *Homo sapiens* que pode estar relacionado ao aumento da força de interação com o NAD; da mesma forma, pode-se dizer que a substituição da Prolina por um Ácido Aspártico que, além de aumentar a interação com o substrato, deve estar relacionado a um aumento de flexibilidade, indicando um melhor acoplamento da região de ligação, o que também se observa na sequência de *T. thermophilus* com a presença de Ácido Glutâmico na mesma posição. Já os resíduos de ligação a Glutamato e os resíduos catalíticos, com exceção da estrutura 4IDS de *Mycobacterium tuberculosis*, mostram-se extremamente conservados, assim como observado no alinhamento da P5CDH de *T. cruzi* com os organismos da família *Trypanosomatidae*.

Figura 19: Alinhamento Múltiplo da Proteína P5CDH de *Trypanosoma cruzi* com proteínas homólogas resolvidas por cristalografia.



(Verde) – Resíduos do sítio de ligação ao NAD+. (Magenta) – Resíduos do sítio de ligação a Glutamina. (Vermelho) – Resíduos Catalíticos. (Azul) – Grau de conservação de aminoácidos.

**Figura 20: Alinhamento múltiplo dos resíduos de ligação a NAD<sup>+</sup>, ao substrato e catalíticos das proteínas homólogas dos organismos da família Trypanosomatidae.**

	Ligação a NAD <sup>+</sup>						Ligação a substrato e catálise												
<i>T.cruzi</i>	I	A	K	S	P	F	S	V	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
3V9G	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
3V9H	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
3V9I	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
3V9J	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
3V9K	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
3V9L	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
4OE4	V	S	K	S	Q	F	S	V	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
4OE5	I	S	K	S	D	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
4IHI	I	T	K	S	I	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
4IDS	I	T	K	S	I	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	X	S	Y	F
4IDM	I	T	K	S	I	F	S	T	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
2BHP	I	A	K	A	E	F	S	V	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
1UZB	I	A	K	A	E	F	S	V	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F
2BJA	I	A	K	A	E	F	S	V	E	N	F	E	G	Q	K	C	S	Y	F

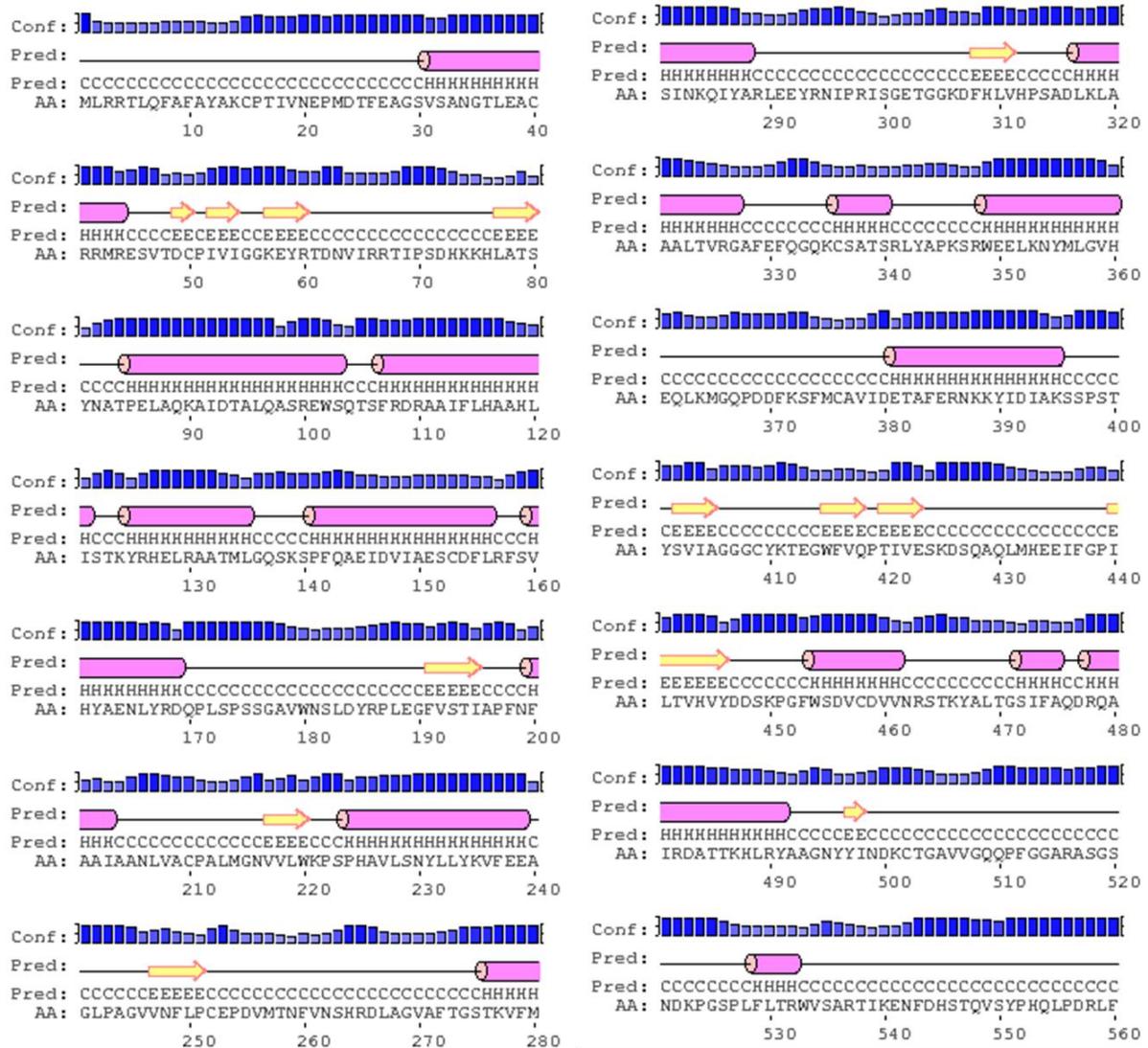
A esquerda, resíduos de ligação a NAD<sup>+</sup>. Os tons de azul expressam grau de conservação do resíduo. Resíduos catalíticos (vermelho) e dos resíduos de ligação a Glutamato (Azul).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.1.2 Análise das regiões funcionais da TcP5CDH

O servidor PSIPRED foi utilizado para predizer a estrutura secundária da P5CDH de *T. cruzi* a partir de sua estrutura primária (Figura 20). O servidor utiliza um cálculo matricial que pontua os aminoácidos da sequência em relação a sua posição específica, assim resíduos que se apresentam próximos de outros que são comuns em estruturas secundárias definidas (hélices-alfa, fitas-beta, curvas etc.) tem uma pontuação maior que aqueles aleatoriamente agrupados (JONES, 1999). Para a TcP5CDH, o PSIPRED indicou uma composição de estrutura secundária de 37,86% de hélices-alfa, 8,93% de fitas-beta e 53,21% de regiões flexíveis.

**Figura 21: Predição da Estrutura Secundária da P5CDH de *Trypanosoma cruzi***



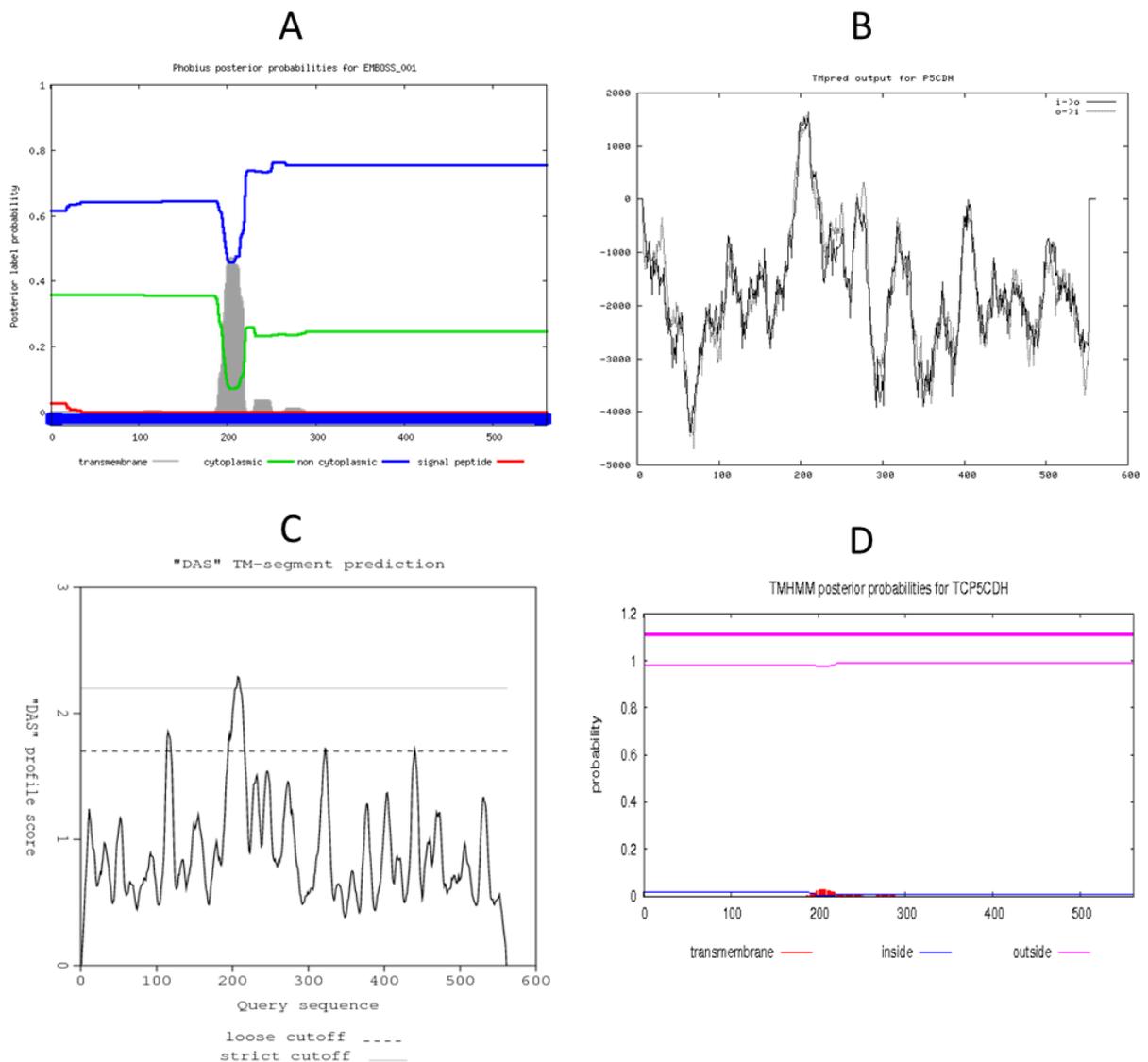
(Magenta) Hélices-alfa (H), (amarelo) Folhas-beta (E), ( ) Regiões flexíveis (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar a existência de regiões transmembranas, foram utilizados os servidores PHOBIUS, TMPRED, DAS e TMHMM. O servidor PHOBIUS se propõe a identificar peptídeos sinal e regiões com alta hidrofobicidade dividindo a sequência da proteína alvo em vários segmentos de acordo com a hidrofobicidade dos resíduos e, depois disso, remonta a proteína dando valores de probabilidade para as regiões (HOFMANN; STOFFEL, 1993). O TMPRED, por sua vez, tenta identificar regiões com potencial transmembrana comparando a sequência com seu banco de dados de domínios transmembrana e tenta prever a melhor topologia e a região onde a hélice se localiza (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004). O servidor DAS faz comparações dois a dois da sequência alvo assim com seu banco de dados

de proteínas transmembrana e aponta potenciais segmentos e seus tamanhos (CSERZO et al., 1997). Por fim, o servidor TMHMM, assim como os demais, tenta identificar peptídeos sinal e regiões transmembrana; entretanto este calcula a probabilidade (através do modelo de Markov) de cada resíduo na sequência ser parte de uma hélice-alfa e, baseado nesses valores, indica as regiões com maior propensão transmembrana e a topologia geral da proteína (KROGH et al., 2001). Na Figura 21 encontram-se os gráficos derivados das análises nos servidores.

**Figura 22: Resultados das predição de regiões transmembranas.**



.A – PHOBIUS. (Vermelho) predição da região peptídeo sinal, (verde) probabilidade de estar no citoplasma, (azul) probabilidade de não estar no citoplasma e (cinza) probabilidade de ser uma região transmembrana. B – TMPRED. (—) topologia dentro ==> fora, (...) topologia fora ==> dentro. C – DAS. Potencial de regiões transmembrana, (- - -) cutoff baixo, com valor de 1.7 indica o tamanho da sequência transmembrana, (—) cutoff estrito com valor 2.2 indica alta probabilidade de ser região transmembrana. D – TMHMM. (Vermelho) indica probabilidade de região transmembrana, (azul) probabilidade estar na membrana, (magenta) probabilidade de não estar na membrana.

Fonte: Elaborada pelo autor

O resultado dos servidores PHOBIUS (Figura 21-A), TMPRED (Figura 21-B) e DAS (Figura 21-C), mostram uma alta probabilidade da região entre os resíduos A195 e L300 possuir uma ou mais região transmembrana. De fato, o servidor TMPRED indicou uma hélice dos resíduos F198 a W220 (23 resíduos) e outra entre os resíduos L267 e L290 (24 resíduos), em uma topologia fora → dentro, dentro → fora, respectivamente.

Mantilla (2013) demonstrou que a P5CDH de *T. cruzi* possuía interação com a membrana interna da mitocôndria em três experimentos independentes e, ainda, que essa interação aumentava a sua capacidade catalítica da enzima em aproximadamente 10 vezes. Entretanto, olhando a sequência dessas regiões e comparando-as com os resultados preditos pelo servidor PSIPRED, nota-se que a região F198 a W220 é predita como uma hélice-alfa seguida de um fita-beta, entretanto, entre as duas existe uma Prolina (P211) que normalmente inviabilizar uma hélice transmembrana estável. Além disso, hélice transmembranas possuem um tamanho variável de 15 a 35 resíduos, e a estrutura secundária predita indica uma hélice-alfa de 5 resíduos seguida de uma região flexível de 11 resíduos e termina numa fita-beta de 4 resíduos. Já a segunda região indicada apresenta uma hélice-alfa de 14 resíduos sem a presença de Prolina, podendo ser de fato uma região transmembrana.

### 5.1.3 Modelagem das estruturas terciárias e quaternárias da TcP5CDH

Inicialmente a sequência primária da TcP5CDH foi processada pelo servidor BLASTp para encontrar proteínas homólogas com estruturas tridimensionais resolvidas. Para a modelagem por homologia é necessário pelo menos 30% de identidade entre a sequência alvo e a estrutura molde. Os alinhamentos realizados pelo BLASTp no PDB retornou 20 estruturas com mais de 30% de identidade e com cobertura de sequência superior a 80. Essas 20 proteínas tiveram sua estrutura avaliadas em relação a qualidade de resolução estrutural, em relação a porcentagem de homologia e se estavam ou não na presença de ligantes. Dessas 14 estruturas foram moldes foram avaliados em função %, das quais 14 estruturas foram selecionadas para a modelagem (Tabela 3).

No software MODELLER 9.16 foi realizado um alinhamento múltiplo da TcP5CDH com as 14 proteínas molde. Esse alinhamento múltiplo faz com que as sequências molde e a alvo se alinhem baseados nos seus dados estruturais obtidos pelos arquivos .pdb correspondentes e, assim, os modelos são gerados através do consenso desse alinhamento.

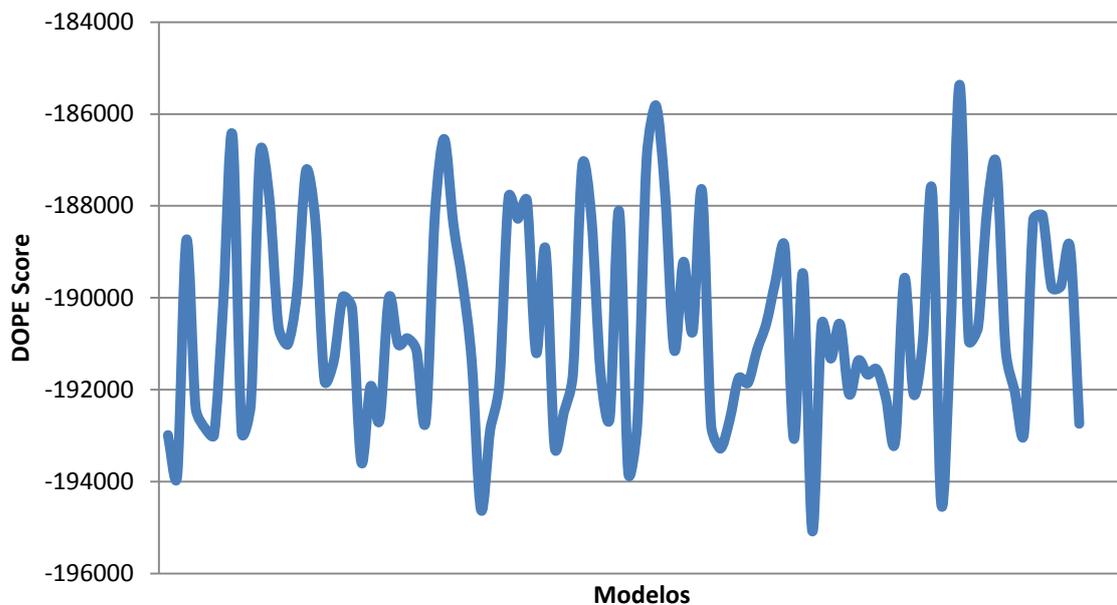
A partir do alinhamento global foram gerados 100 modelos tridimensionais. Os modelos foram avaliados de acordo com a sua Energia Proteica Otimizada Discreta (*Discrete*

*Optimized Protein Energy* - DOPE). O DOPE é um potencial estatístico dependente da distância atômica calculado à partir das estruturas de proteínas nativas, onde uma função de probabilidade em função da posição dos átomos é calculada (SHEN; SALI, 2006). Dessa forma, quanto menor o valor de DOPE do modelo, mais próximo da estrutura nativa ele está.

Cem modelos foram gerados e seus valores de DOPE encontram-se na Figura 22. Dentre os modelos gerados, os que apresentaram o menor valor de DOPE foram selecionados; estes foram os modelos 22, 48 e 71 que tiveram sua qualidade avaliada através do servidor ProSa e RAMPAGE. Contudo, apenas o modelo 71 (Figura 23) mostrou qualidade adequada.

**Figura 23: DOPE Score dos modelos gerados pelo software MODELLER 9.16.**

### **Energia Proteica Otimizada Discreta (DOPE) dos 100 modelos gerados**

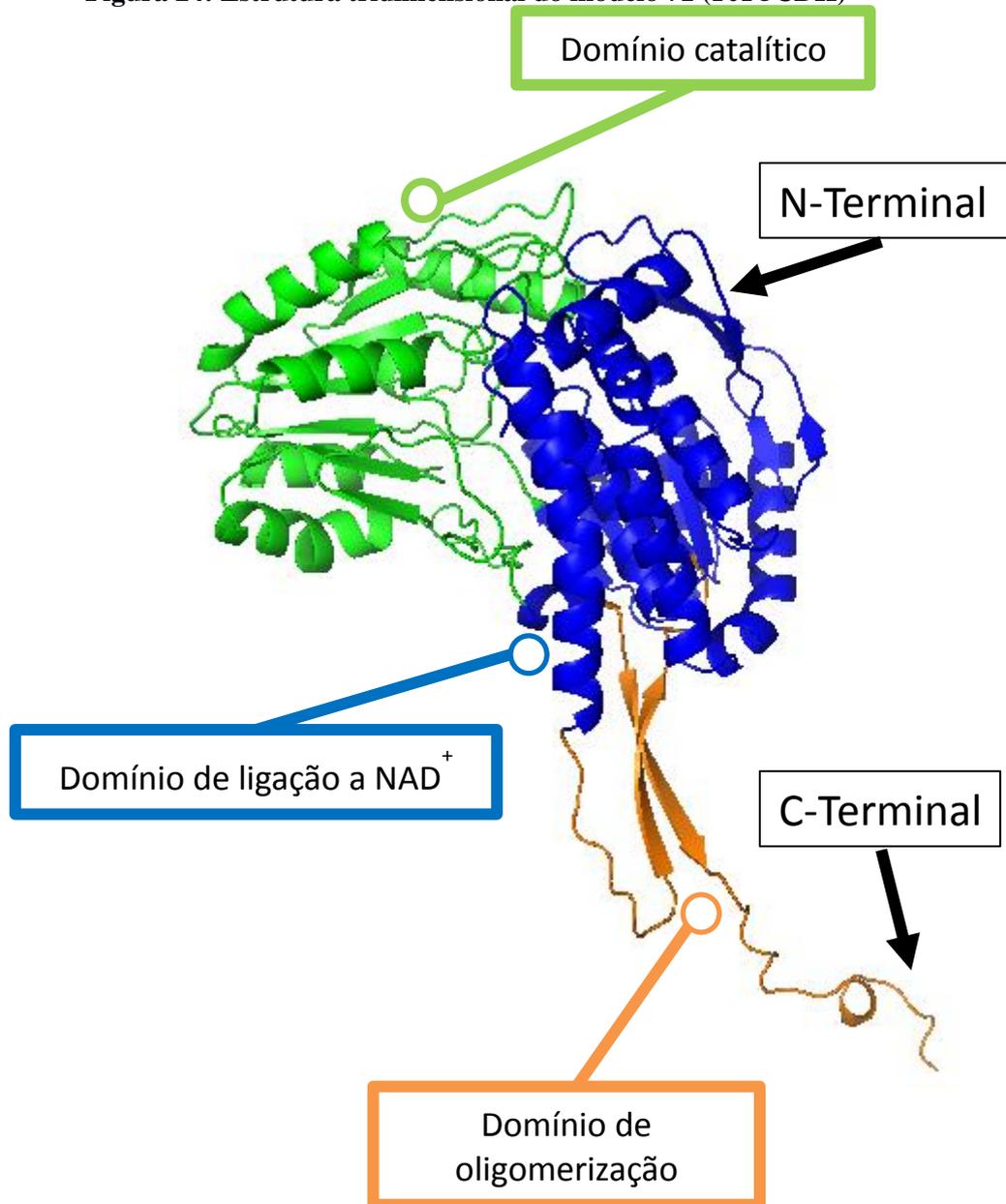


Fonte: Elaborada pelo autor.

As proteínas da família ALDH4 são enzimas que apresenta três domínios, sendo um catalítico, um de ligação a  $\text{NAD}^+$  e um sítio de oligomerização na sua porção C-terminal (PEMBERTON et al., 2014). O domínio de ligação a NAD é caracterizado pela presença de um motivo de ligação a nucleotídeos beta-alfa-beta seguida de cinco fitas-beta, chamado de enovelamento de Rossmann (HANUKOGLU, 2015). Já o domínio catalítico possui uma conformação alfa/beta apresentando sete fitas betas (duas antiparalelas e as demais paralelas) e a Cisteína catalítica na interface entre este domínio e os domínios de ligação ao NAD. O

ultimo domínio é caracterizado por uma folha beta antiparalela torcida que é responsável pela oligomerização. A Figura 23 mostra os domínios da *TcP5CDH* modelada.

**Figura 24: Estrutura tridimensional do modelo 71 (*TcP5CDH*)**



Domínios estruturais do modelo 71 de *TcP5CDH*. Domínio catalítico (verde), domínio de ligação a  $\text{NAD}^+$  (azul) e domínio de oligomerização (laranja).

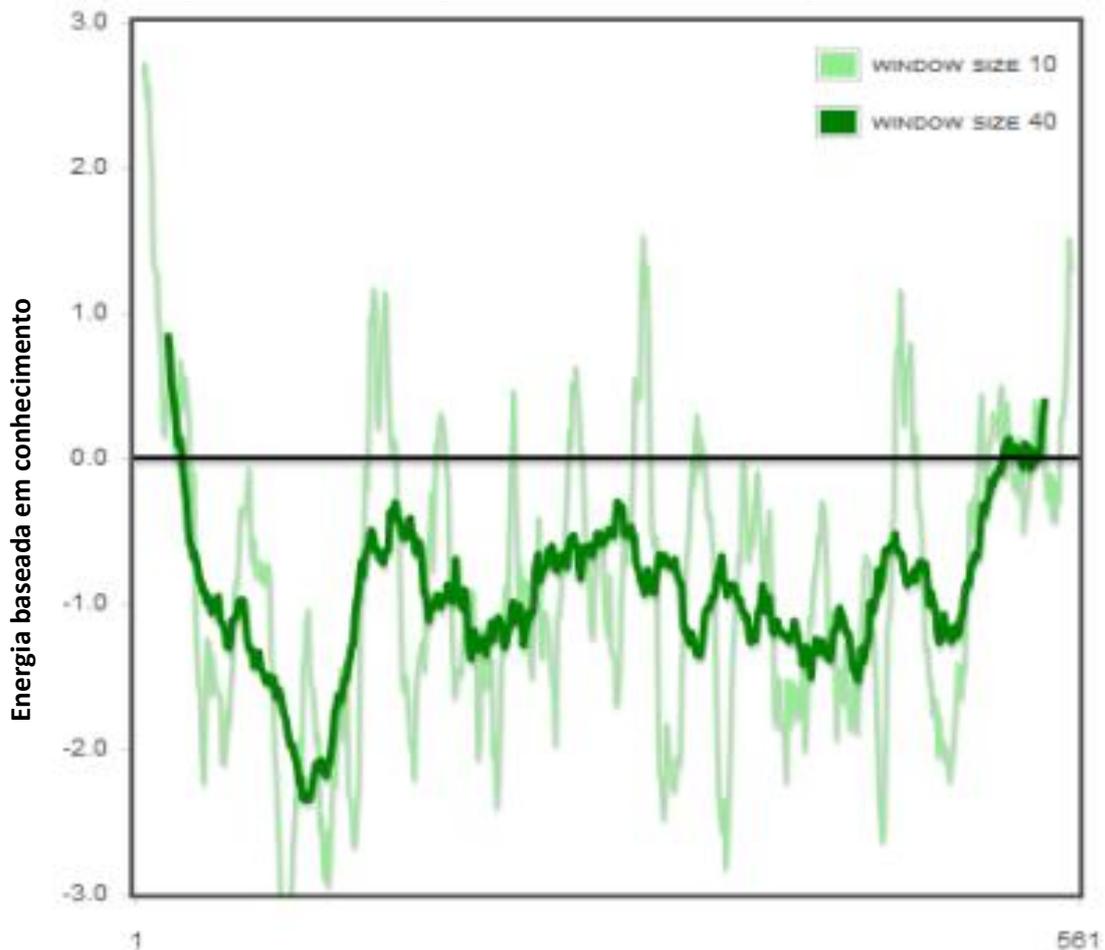
Fonte: Elaborada pelo autor.

A qualidade dos modelos foi inicialmente avaliada pelo servidor ProSa. O ProSa analisa a qualidade global e local de estruturas proteicas tridimensionais. O gráfico de qualidade local (Figura 24) do servidor ProSa mostra a energia média em função dos aminoácidos em janelas de 10 aminoácidos (verde claro) e 40 aminoácidos (verde escuro),

onde valores positivos correspondem a regiões problemáticas no modelo. O cálculo da energia local é baseado em funções de energia baseadas em conhecimento, ou seja, em dados empíricos coletados através de estudos estruturais de outras proteínas.

Nesta análise do modelo 71, nota-se que na janela de 10 aminoácidos ocorrem várias regiões de alta energia, que correspondem a regiões flexíveis na proteína, locais esses que tendem a ser mais desorganizados; entretanto, quando olha-se para a janela de 40 aminoácidos, nota-se que as regiões N-terminal e C-terminal apresentam valores de energia maiores. Isso é correspondente à sequência sinalizadora de exportação mitocondrial no N-terminal, mantida para a criação do modelo, e a porção C-terminal, região flexível presente em todos os moldes utilizados.

**Figura 25: Análise da qualidade local do modelo 71 pelo servidor ProSa.**



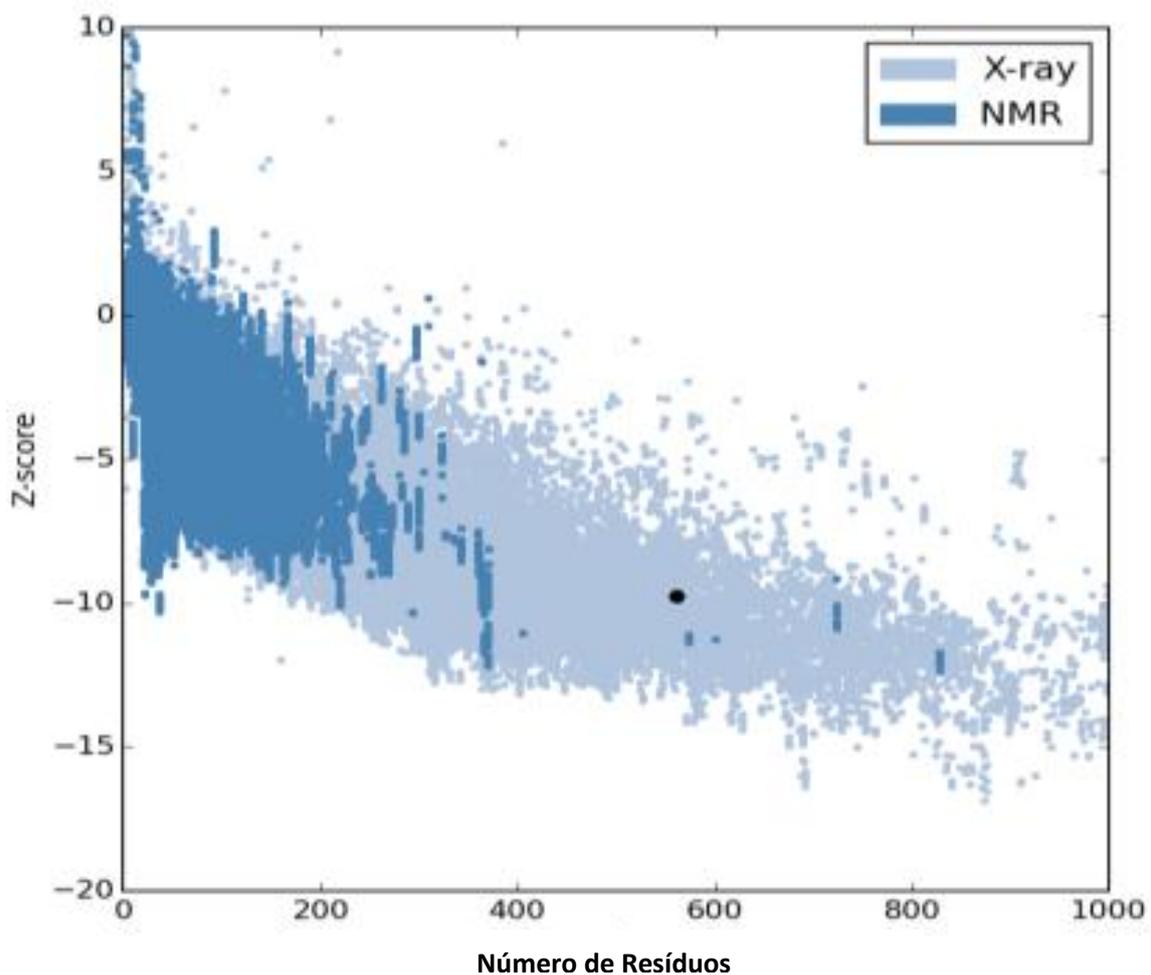
Em verde claro a energia média a cada 10 resíduos. Em verde escuro, a energia média a cada 40 resíduos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A qualidade global do modelo (Figura 25) é dada em função do Z-score, que é um parâmetro estatístico que mede o desvio padrão da média energética de uma populacional de

enovelamentos errôneos (*misfolds*) para uma estrutura nativa; em outras palavras, o z-score mede a potencialidade de um modelo estar em uma conformação nativa ou não. O resultado mostra a variação dessa energia média em função do número total de aminoácidos e, ainda, se os dados plotados estão em faixas correspondentes às estruturas resolvidas conhecidas depositadas nos bancos de dados. Note que existe uma faixa onde o Z-score pode ser encontrado. Neste caso, o Z-score do modelo 71 foi -9.76 e essa energia está dentro da faixa energética para proteínas com 550-600 aminoácidos.

**Figura 26: Análise da qualidade local do modelo 71 pelo servidor ProSa**



O Z-Score se encontra dentro da faixa de valores esperados para proteínas resolvidas por cristalografia com 560-600 resíduos.

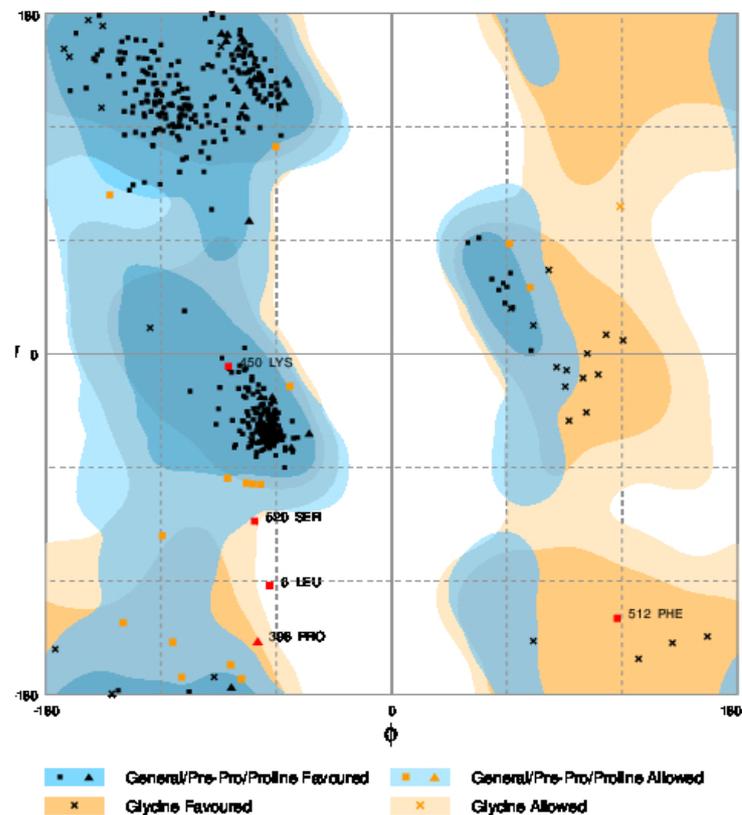
Fonte: Elaborada pelo autor.

O servidor RAMPAGE realiza a análise dos ângulos  $\phi$ ,  $\psi$  dos resíduos de forma geral e leva em conta os aminoácidos imediatamente anteriores às Prolinas (Pre-Pro) e às Glicinas, formando o gráfico de Ramachandram. Os resíduos pré-prolina, Pre-Pro, são

tratados diferentemente, pois eles apresentam uma distribuição  $\phi$ ,  $\psi$  em torno de  $-130^\circ, 80^\circ$  e tendem a ocupar essas regiões com uma preferência 40 vezes maior que nas outras. Os resíduos de Glicina e Prolina também são tratados diferentemente, pois esses aminoácidos apresentam características estereoquímicas muito distintas dos demais aminoácidos. A Glicina por não possuir  $C\beta$  permite um numero grande de combinações  $\phi$ ,  $\psi$  sem causar sobreposição estérica; inversamente, a Prolina, com seu anel imínico rígido, possui um numero muito restrito de combinações  $\phi$ ,  $\psi$  (LOVELL et al., 2003).

Assim, a Figura 26 mostra a distribuição geral de todos os resíduos do modelo 71 em relação aos ângulos  $\phi$ ,  $\psi$ .

**Figura 27: Gráfico de Ramachandran para o modelo 71 da proteína TcP5CDH.**

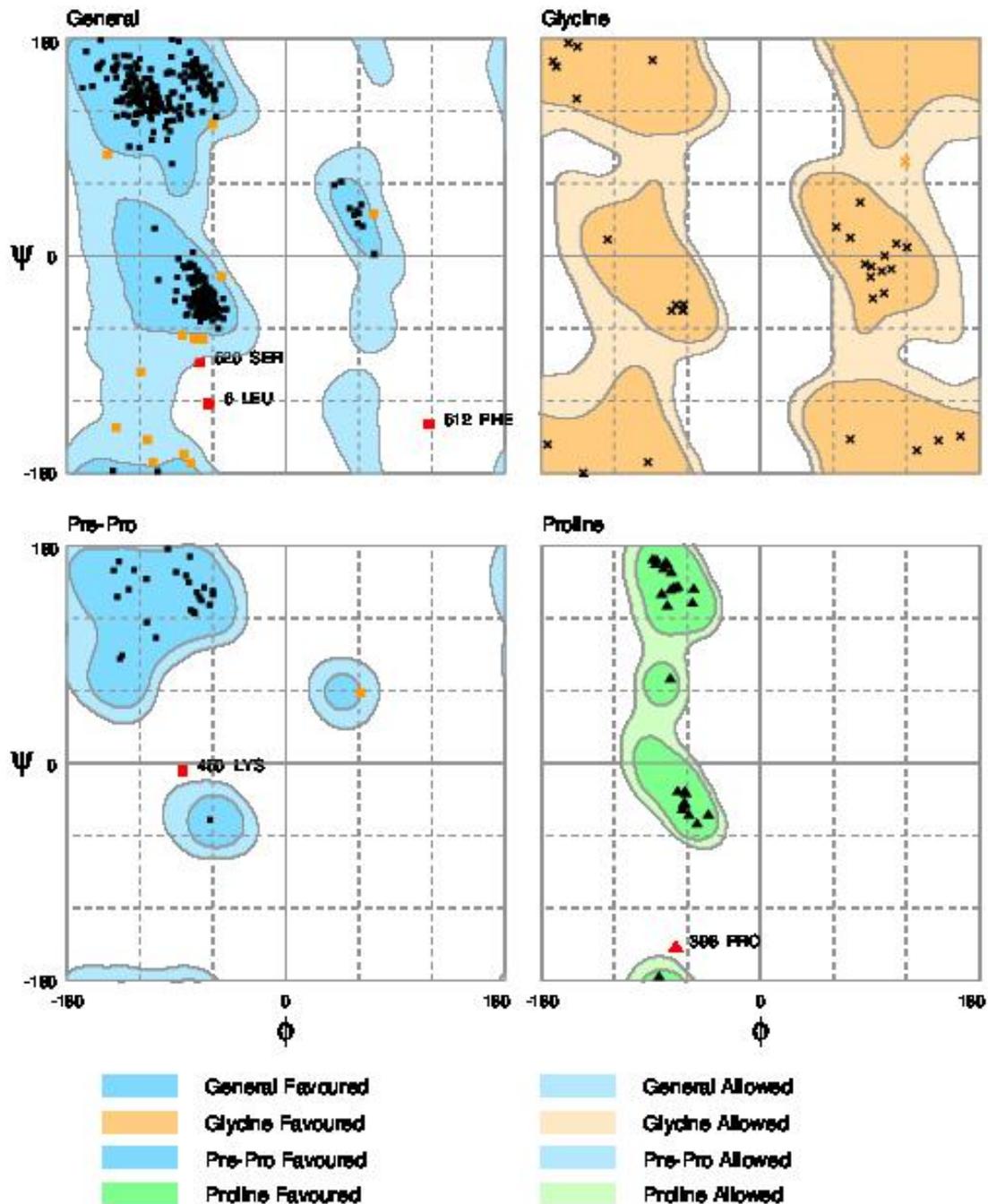


O gráfico mostra a distribuição dos aminoácidos em relação aos ângulos  $\phi, \psi$  do arranjo do modelo e as áreas em que se encontram.

Fonte: RAMPAGE.

A Figura 27-A mostra a composição da distribuição dos resíduos sem contar os resíduos de Gly (Figura 27-B), Pre-Pro (Figura 27-C) e Pro (Figura 27-D).

Figura 28: Gráfico de Ramachandran do modelo 71 da TcP5CDH em relação aos aminoácidos Pre-Pro, Pro e Gly.



**General** – Distribuição geral dos aminoácidos exceto Pro e Gly. **Glycine** – Distribuição dos resíduos de Glicina. **Pre-Pro** – Distribuição dos resíduos pre-prolina. **Pro** – distribuição dos resíduos de Prolina.

Nota-se que os resíduos L006, P398, K450, F512 e S520 encontram-se em regiões não permitidas, o que inviabilizaria o uso do modelo para outras análises (Tabela 4). Entretanto, estes resíduos se encontram em regiões flexíveis que não fazem parte de estruturas secundárias fundamentais (hélices-alfa, folhas-beta, curvas etc.) nem próximas às regiões e resíduos de sítio ativo e de ligação a substratos (Glu, NAD<sup>+</sup>). Os modelos 22 e 48

apresentavam um maior número de resíduos em regiões não permitidas e aminoácidos catalíticos ou de ligação a substrato comprometidos, assim foram excluídos como modelos da TcP5CDH.

**Tabela 4: Distribuição dos aminoácidos do gráfico de Ramachandram do modelo 71**

Região	Numero	Porcentagem (%)	Esperado (%)
Favorecida	538	96,2	98,0
Permitida	16	2,9	2,0
Não-permitida	5	0,9	0,0

O Modelo 71 foi avaliado posteriormente pelo seu RMSD em relação aos moldes utilizados. O RMSD (*Root Mean Square Distance*) é uma ferramenta de avaliação de estruturas tridimensionais em relação a sua similaridade estrutural, onde uma molécula é sobreposta a outra e as distâncias entre dois átomos correspondentes da cadeia carbônica principal (C-alpha) é analisado par a par e então a distância média entre as moléculas é calculado (Figura 28). Quanto maior a diferença entre suas posições, maior é o valor do RMSD; inversamente, um RMSD de 0 (zero) significa estruturas idênticas. Em biologia computacional, o RMSD de valor 2 ou menor é considerável aceitável (CARUGO; PONGOR, 2001).

**Figura 29: Equação da Raiz da Distância Quadrada Média (RMSD)**

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N ((x_i^a - x_i^b)^2 + (y_i^a - y_i^b)^2 + (z_i^a - z_i^b)^2)}{N}}$$

Onde  $x$ ,  $y$  e  $z$  são as coordenadas cartesianas dos átomos,  $a$  é o índice para a primeira estrutura,  $b$  é o índice para a segunda estrutura e  $N$  é o número total de átomos comparados.

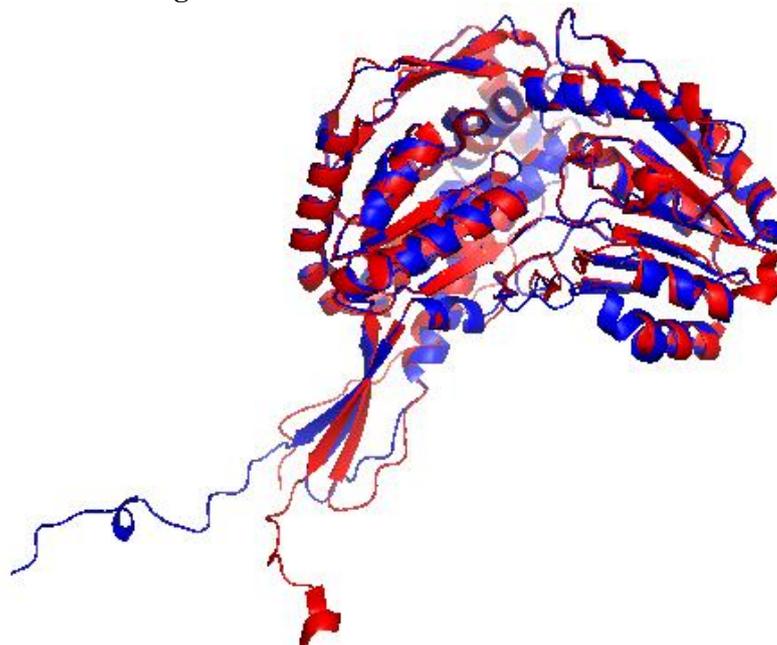
A TcP5CDH modelada foi sobreposta às proteínas molde através do programa PyMol, que alinha as estruturas e calcula automaticamente os valores de RMSD (Tabela 5).

**Tabela 5. RMSD da TcP5CDH modelada em relação às proteínas molde**

PDB	Organismo	RMSD
3V9L	<i>Mus musculus</i>	0,239
3V9H	<i>Homo sapiens</i>	0,242
3V9K	<i>Mus musculus</i>	0,252
3V9G	<i>Homo sapiens</i>	0,281
3V9J	<i>Mus musculus</i>	0,282
3V9I	<i>Homo sapiens</i>	0,389
40E5	<i>Homo sapiens</i>	0,582
4IHI	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,691
4IDM	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,716
4IDS	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,773
4OE4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,890
1UZB	<i>Thermus thermophilus</i>	1,020
2BJA	<i>Thermus thermophilus</i>	1,031
2BHP	<i>Thermus thermophilus</i>	1,042

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se que o RMSD foi, em todas as comparações, menor que 1,050 e que as estruturas de *M. musculus* e *H. sapiens* apresentaram os menores valores de RMSD, mostrando que o modelo da TcP5CDH apresenta alta qualidade estrutural para estudos com os modelos de hospedeiros do *T. cruzi*. A Figura 29 mostra o RMSD do modelo 71 com o molde 3V9L.

**Figura 30: RMSD do modelo 71**

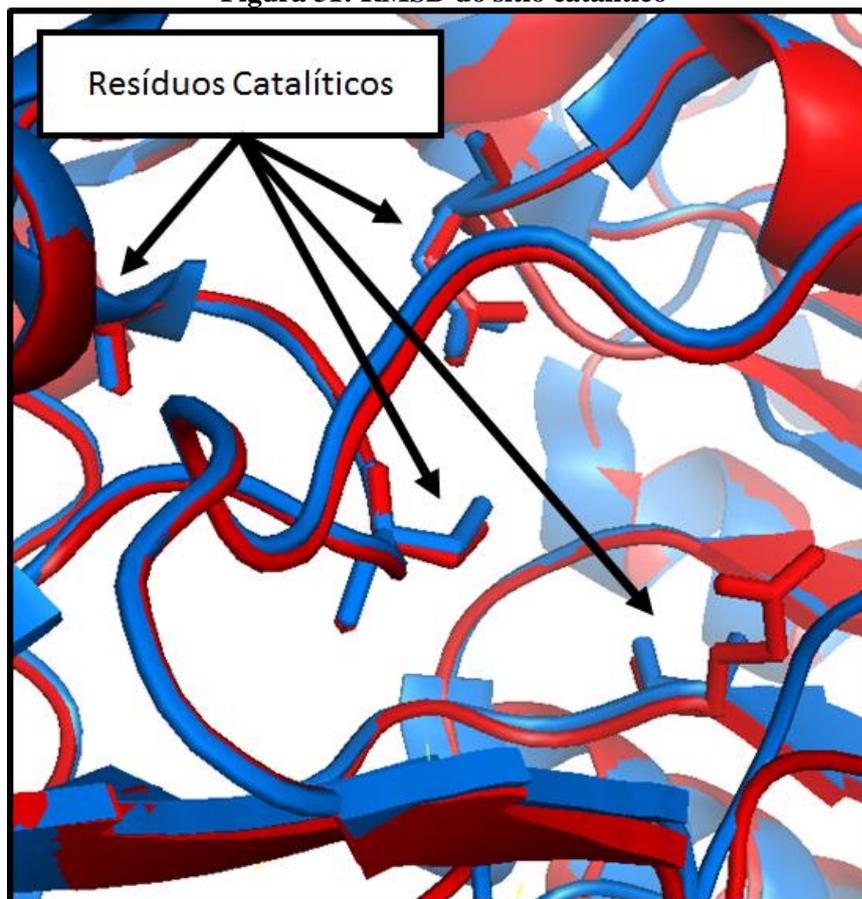
Análise de RMSD do modelo 71 (azul) com o molde 3V9L (vermelho)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se ainda, uma pequena torção na porção C-terminal, a região responsável pela oligomerização, que faz com que o alinhamento espacial do modelo 71 não se sobreponha corretamente sobre o molde. Entretanto, quando os moldes foram comparados entre si e com o modelo 71 da P5CDH de *T. cruzi*, notou-se que esta região apresentava torções de magnitudes diferentes, seja entre moldes, seja entre comparações modelo-molde, indicando uma região altamente flexível.

O RMSD dos resíduos catalíticos (Figura 30) também foi realizado, para verificar se a cavidade do sítio ativo estava corretamente modelado. Para isso, comparações entre o modelo 71 e os moldes foram realizados visualmente através do *software* PyMol. Em todas as comparações observadas, os aminoácidos se mostraram corretamente modelados levando à conclusão de que este modelo apresenta a qualidade necessária para os testes de ancoragem molecular.

**Figura 31: RMSD do sítio catalítico**



Análise do RMSD do sítio catalítico da *TcP5CDH* modelada (azul) e o molde 3V9L (vermelho)

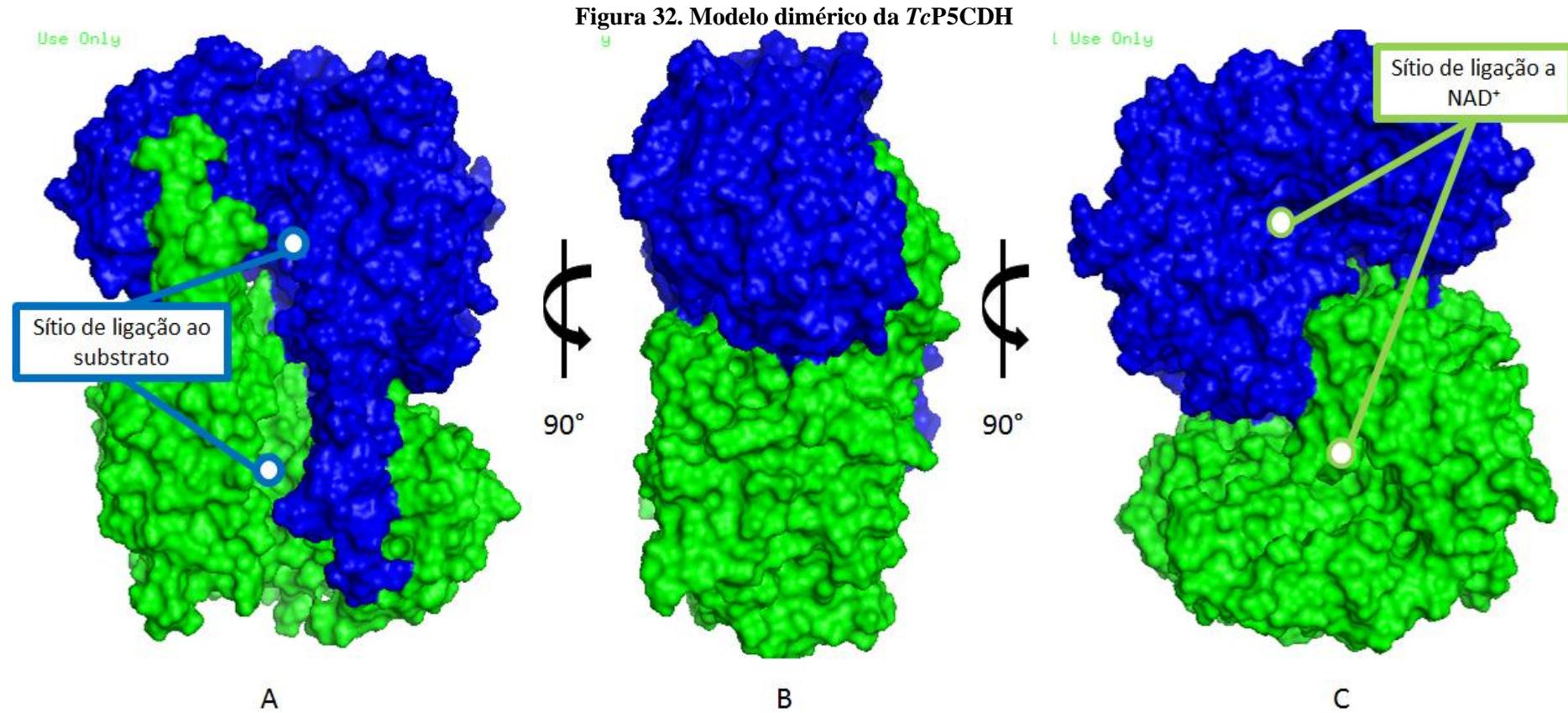
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados do ProSa, RAMPAGE e do RMSD apontam que a estrutura do modelo está muito próxima da conformação observada nos moldes resolvidos por cristalografia de

raios-x, o que significa uma alta qualidade no processo de modelagem utilizado. As energias locais e globais para a molécula mostraram-se dentro das faixas esperadas para modelos com alta qualidade e o RMSD mostra que a conformação do modelo, bem como seu sítio ativo, apresentam a conformação adequada.

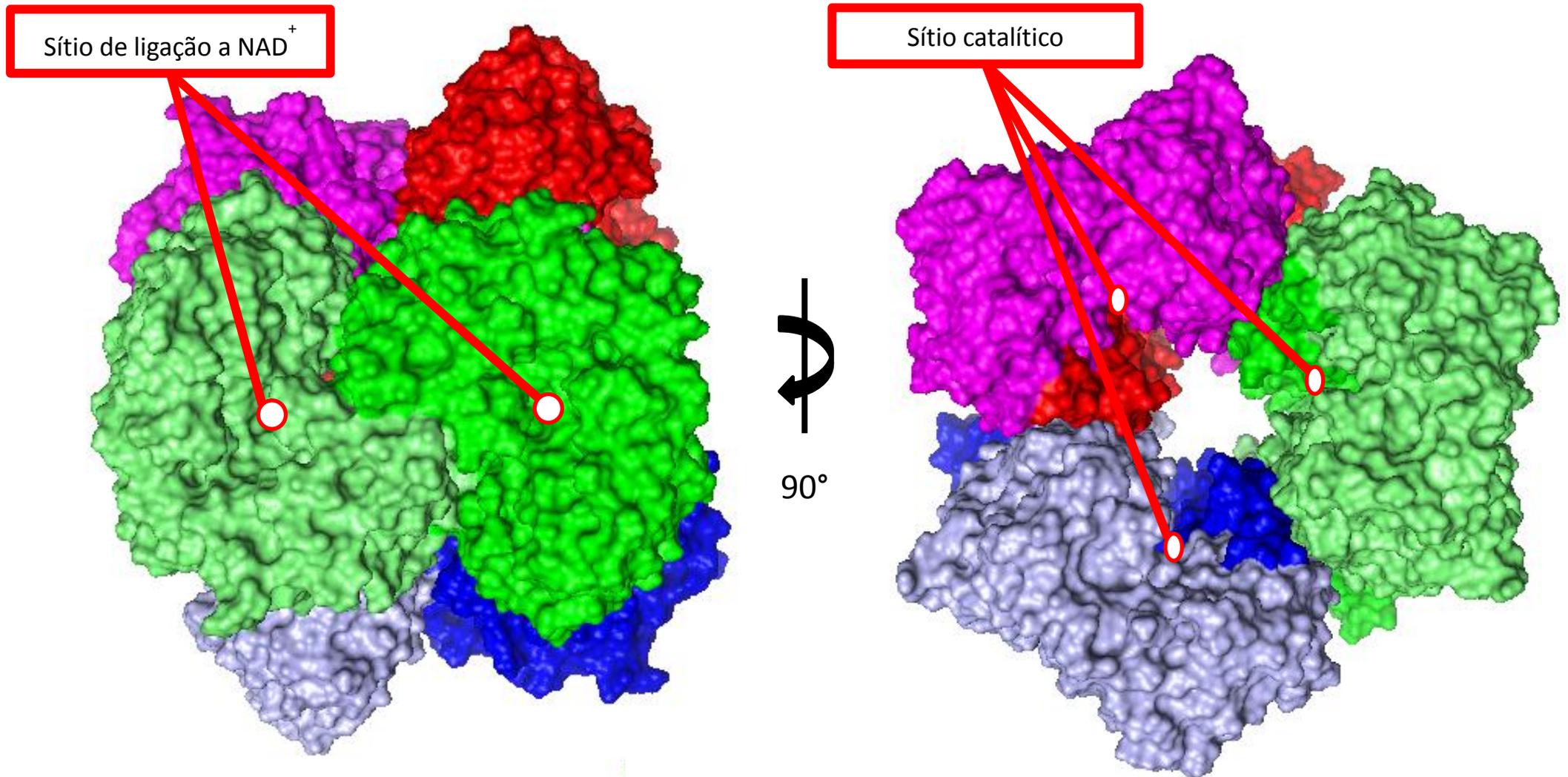
Na natureza, a Delta-1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase pode apresentar-se em estados oligoméricos diferentes, dependendo do organismo. Em humanos e camundongos, ela apresenta-se de forma dimérica; já em *S. cerevisiae*, *Thermus thermophilus* e em algumas bactérias da espécie *Bacillus sp.* ela se de forma hexamérica. Mantilla e colaboradores (2015) mostraram que a TcP5CDH possui um comportamento hexamérico, mas poderia alcançar supra estruturas octo- ou decaméricas. Dessa forma, para verificar como seria a distribuição espacial dessas formas supramoleculares, foi feita a montagem do modelo em estado dimérico e hexamérico. Para o modelo dimérico (Figura 31) foi utilizado o molde 3V9L e para o modelo hexamérico (Figura 32), o modelo utilizado foi o 4OE4 que apresenta este arranjo quaternário resolvido por cristalografia ligado a  $\text{NAD}^+$ .

No modelo dimérico, observa-se que o C-terminal da P5CDH alinha-se com o domínio catalítico através de pontes de hidrogênio entre as fitas-beta dessa região e as fitas-beta da outra, como descrito na literatura (LUO, SING; TANNER, 2013; PEMBERTON et al., 2014). Essa interação entre o domínio de oligomerização e o domínio catalítico não restringe a região flexível responsável pela ligação ao ácido glutâmico-semialdeído (GSA) de sua movimentação e, dessa forma, não afeta diretamente a seletividade ao substrato desta proteína. Na verdade, Pemberton e Tanner (2013) demonstraram que a seletividade e atividade catalítica são grandemente afetadas pelo comprimento da cadeia carbônica do substrato semialdeído. Em seus experimentos, eles cristalizaram a ALDH4A1 humana na presença de semialdeídos de 2 a 5 carbonos e mediram a atividade enzimática; moléculas semialdeídas 5 carbonos apresenta uma atividade máxima que diminuía gradativamente com o encurtamento da cadeia, mostrando que é o substrato que faz com que a enzima seja eficiente ou não.



A - Visão dos domínios de oligomerização C-Terminal da *TcP5CDH* e os sítios de ligação ao substrato. B - Visão lateral da *TcP5CDH*. C - Visão dos domínios de ligação a NAD da *TcP5CDH*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 33: Modelo hexamérico da *TcP5CDH*

Visão lateral (a esquerda) e superior (a direita) do modelo da *TcP5CDH* na sua forma hexamérica. Em tons de azul, verde e vermelho os arranjos diméricos que formam o trímero de dímeros. Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os modelos hexaméricos, nota-se que eles são na verdade estruturas supramoleculares formados por trímeros de dímeros que se alinham lateralmente. Nas estruturas resolvidas de *T. thermophilus* e *S. cerevisiae* a região de ligação ao substrato, o ácido glutâmico semi-aldeído (GSA), é voltado para o interior da estrutura, enquanto que o sítio de ligação ao  $\text{NAD}^+$  é voltado para exterior da estrutura (INAGAKI et al., 2006; PEMBERTON et al, 2014).

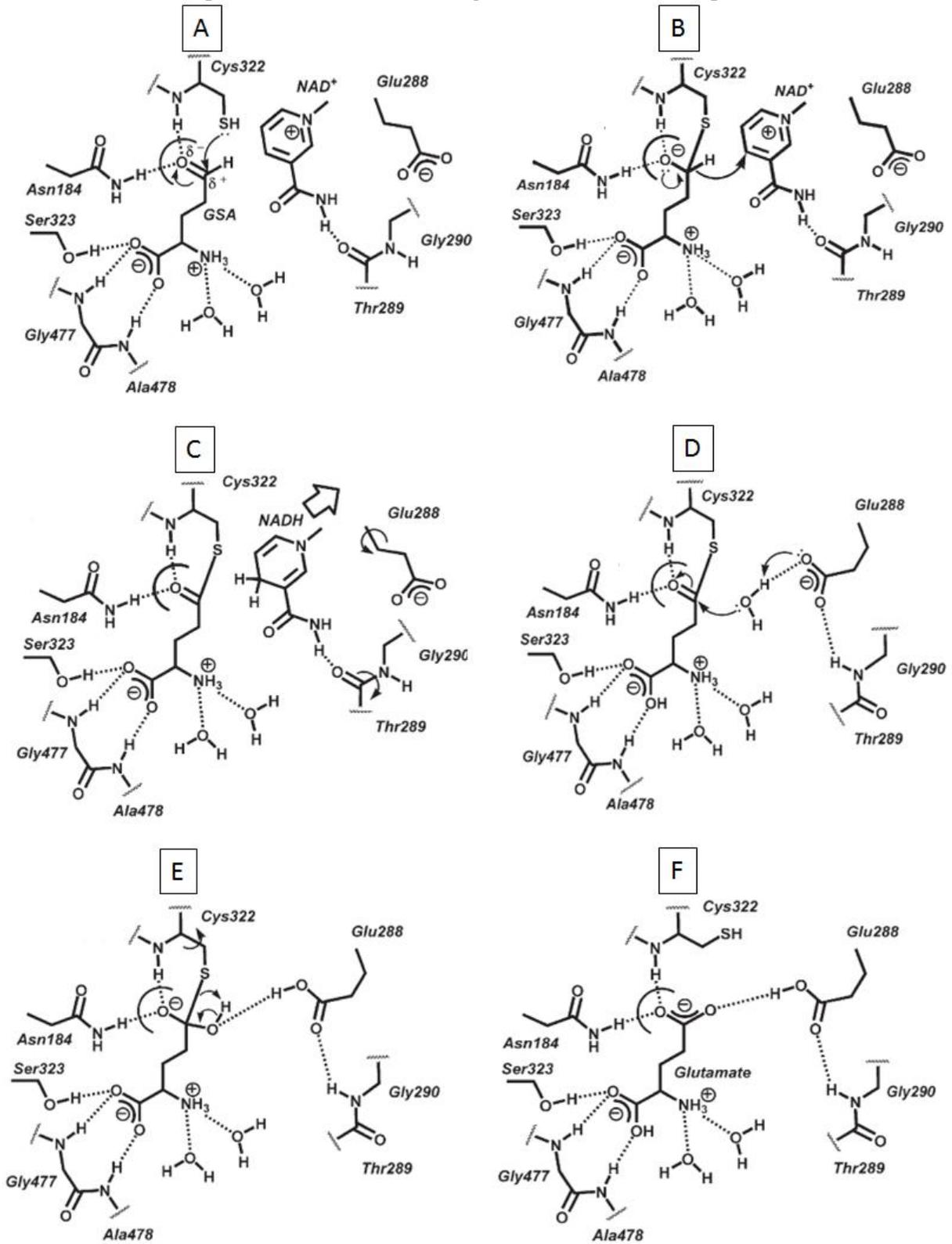
#### 5.1.4 Ancoragem Molecular

O mecanismo de reação mais aceito para as ALDH consiste no ataque nucleofílico do resíduo Cys catalítico ao carbono semialdeído gerando um intermediário que é posteriormente hidrolisado gerando a redução de uma coenzima e a liberação do produto (INAGAKI et al., 2006). Para a P5CDH, o resíduo de Cys catalítico realiza o ataque nucleofílico ao grupo semialdeído do GSA formando o complexo P5CDH-GSA. Em seguida, o hidrogênio do carbono semialdeído é transferido para o  $\text{NAD}^+$  reduzindo-o a NADH e liberando-o. Na sequência, uma molécula de água, orientada por um resíduo de glutamato catalítico, faz um ataque nucleofílico no carbono semialdeído formando o grupo carboxílico do Glutamato, gerando o complexo P5CDH-Glutamato. Por fim, ocorre a hidrólise da ligação covalente com a cisteína catalítica havendo a liberação do produto, o L-glutamato (Figura 33).

Para que esta reação ocorra, a entrada dos ligantes deve ocorrer na conformação correta. Portanto, o posicionamento deste ligante em relação ao resíduo Cys<sup>336</sup> da *TcP5CDH* é fundamental para a ação da enzima. Assim, a orientação das moléculas de L-Glu, GSA e NAD necessitam estar corretamente direcionadas para que ocorra a reação de redução do  $\text{NAD}^+$  a NADH e a formação do L-Glutamato pelo GSA.

Para verificar se o modelo 71 apresentava os sítios de ligação e reação configurados de forma adequada e, ainda, para se ter uma idéia da posição do inibidor Dissulfiram no sítio ativo da enzima, foi realizado a ancoragem molecular. Sabe-se que a carbamilação é o principal fator de inibição das ALDHs pelo dissulfiram, ocorrendo a ligação covalente do DDTC (e derivados) na cadeia lateral do resíduo catalítico (KOPPAKA et al., 2012), assim, existe a noção prévia de que o ataque nucleofílico da cisteína catalítica se dá no carbono do grupo  $-(\text{C}=\text{S})-\text{SH}$  do DDTC.

**Figura 34: Mecanismo de reação das Aldeído Desidrogenase**



A – Ataque nucleofílico da cisteína catalítica ao GSA. B – Redução do NAD a NADH. C – Saída no NADH. D - Ataque nucleofílico de uma molécula de água ao carbono semialdeído. E – Hidrólise da ligação covalente desfazendo o complexo P5CDH-Glutamato. F – Liberação do Glutamato.

Adaptado de Inagaki et al., (2006).

Assim, para a ancoragem molecular, foram utilizados como ligantes as moléculas de L-glutamato, NAD, ácido glutâmico semialdeído (GSA) e o Dissulfiram (DDTC); como receptor foi utilizado o modelo 71 (Seção 3.1.4). Com o auxílio do programa Autodock Vina, foram gerados 100 poses para cada ligante, assumindo o receptor como um objeto rígido. As 10 melhores poses de cada ligante (Tabela 6) foram comparadas com as estruturas resolvidas 3V9K (ligada à molécula de NAD) e 3V9L (ligada à molécula de Glutamato) para avaliação visual das conformações.

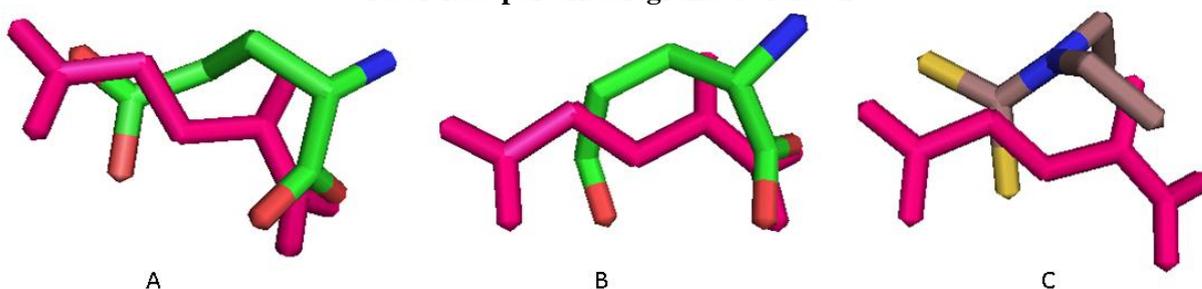
**Tabela 6. Valores de energia das 10 melhores poses dos ligantes L-Glutamato, NAD e Dissulfiram**

Pose	Energia de Afinidade (kcal/mol)			
	NAD <sup>+</sup>	L-Glutamato	Dissulfiram	GSA
1	-8,2	-4,8	-2,9	-4,6
2	-8,0	-4,4	-2,8	-4,1
3	-7,8	-4,4	-2,8	-4,1
4	-7,6	-4,3	-2,8	-4,1
5	-7,3	-4,3	-2,8	-4,0
6	-6,8	-4,1	-2,7	-3,8
7	-6,6	-3,8	-2,4	-3,8
8	-6,1	-3,7	-2,4	-3,7
9	-6,0	-3,7	-1,7	-3,7
10	-5,4	-3,7	-1,6	-3,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 34 é mostrado as melhores poses para os ligantes Glutamato, GSA e DDTC comparados à molécula de Glutamato presente na estrutura resolvida 3V9K. Nota-se desta ancoragem molecular que, das moléculas calculadas de glutamato e o GSA, as poses que apresentaram as melhores posições no espaço tridimensional foram as que apresentaram a menor energia de afinidade, ou seja, as moléculas de pose 1 com -8,2 kcal/mol e -4,8 kcal/mol respectivamente. Já para o dissulfiram, a pose que apresentava a melhor posição espacial, levando-se em conta o mecanismo de inibição, foi a pose de número 6 com -2,7 kcal/mol.

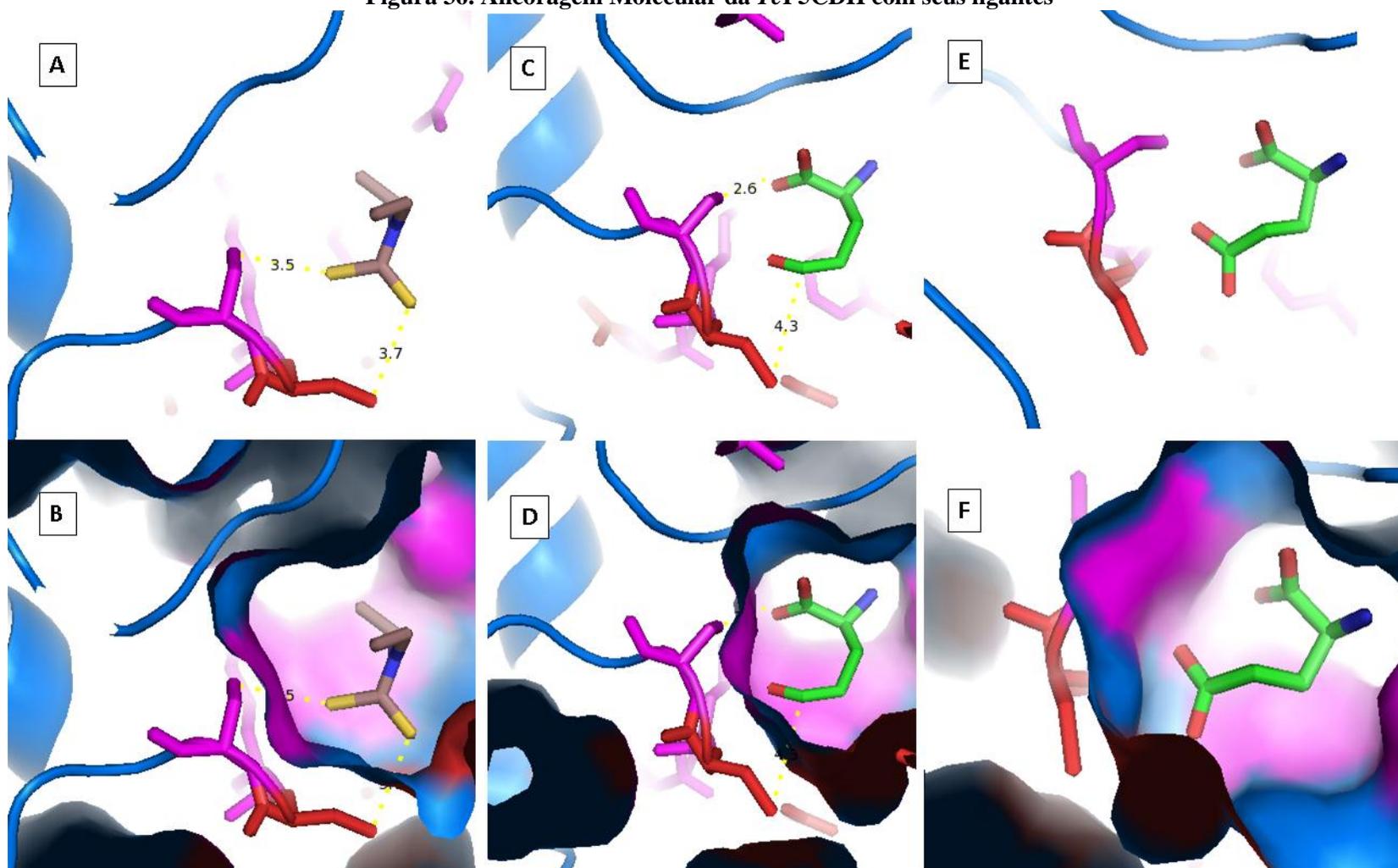
**Figura 35. Comparação visual entre as melhores moléculas ligantes com o L-Glu de estruturas resolvidas por cristalografia de raios-x**



Molécula de L-Glutamato das estruturas resolvidas por cristalografia de raios-x (magenta) comparada com as moléculas calculadas por ancoragem molecular de: A – L-glutamato. B – Ácido glutâmico semialdeído (GSA) e C – Dissulfiram(DDTC)

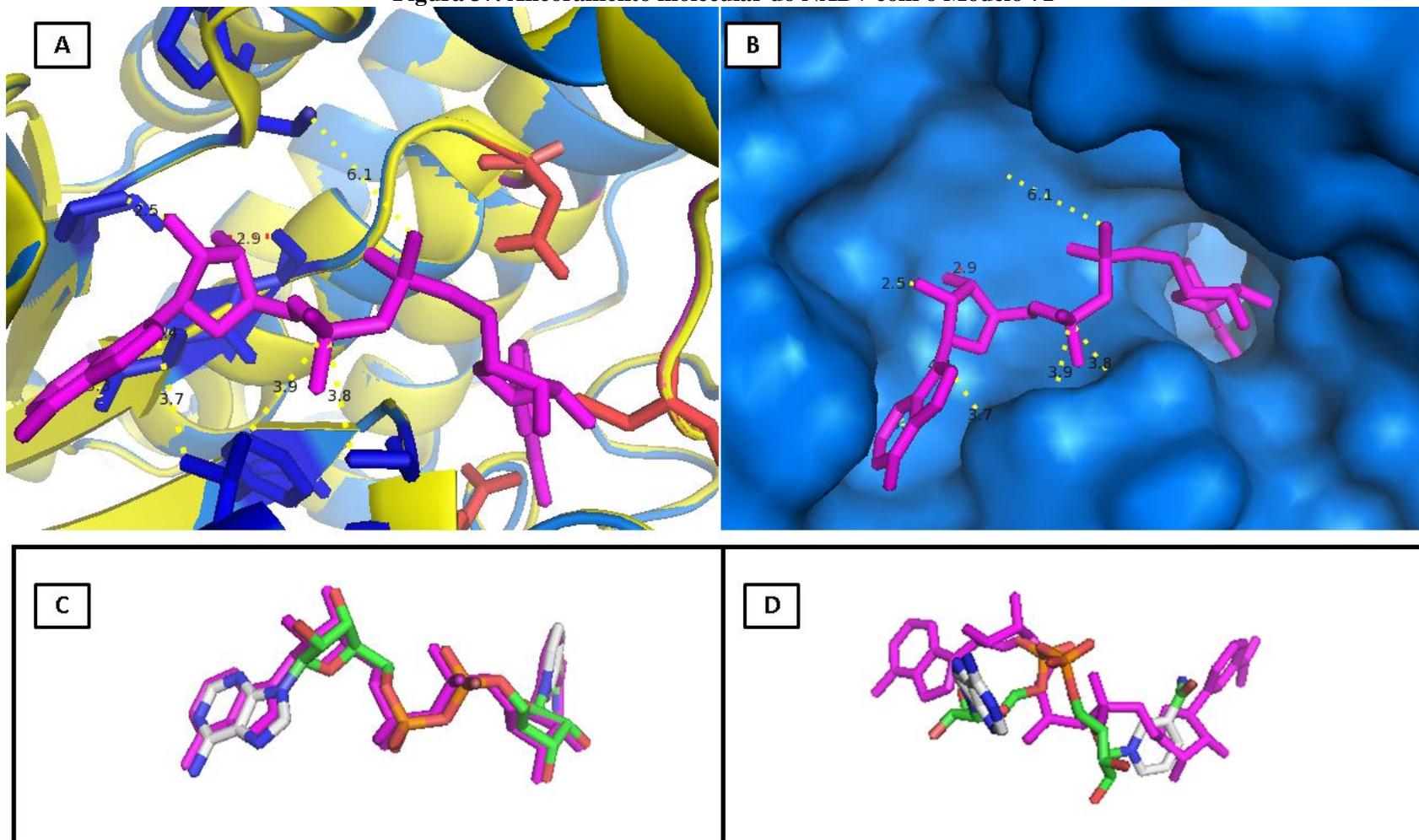
Na Figura 35 é mostrada a ancoragem molecular das melhores poses dos ligantes acima citados com o modelo 71. Quando essas moléculas são observadas no sítio ativo da P5CDH, podemos perceber que elas se encaixam devidamente no bolsão catalítico sem ferir o espaço de outros resíduos, corroborando com os dados do RMSD do sítio ativo observados na Figura 30. Já a ancoragem da molécula de NAD mostrou-se um pouco mais complicada, pois a pesar do sítio de ligação ao NAD estar corretamente construído (Figura 36-A e 36-B), o procedimento não permitiu o surgimento de uma pose semelhante à encontrada na estrutura molde 3V9L. Para contornar este problema, realizou-se uma ancoragem molecular utilizando-se o ligante e o receptor como corpos rígidos, e observou-se a qualidade do encaixe.

Figura 36. Ancoragem Molecular da TcP5CDH com seus ligantes



A e B – Visão do ancoramento do dissulfiram no modelo de representação cartoon e de superfície. C e D – Visão do ancoramento molecular do GSA no modelo de representação cartoon e de superfície. E e F – Visão do ancoramento do L-Glutamato no modelo de representação cartoon e de superfície. Os resíduos de ligação ao substrato (magenta) e os resíduos catalíticos (vermelho) são mostrados, com destaque para o resíduo catalítico Cys<sup>336</sup>. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 37. Ancoramento molecular do NAD<sup>+</sup> com o Modelo 71



A – Molécula de NAD<sup>+</sup> (magenta) alinhada ao modelo 71 (azul) sobreposto ao molde 3V9L (amarelo). Os resíduos catalíticos (vermelho) e de ligação ao NAD (azul) estão destacados. B – Molécula de NAD<sup>+</sup> na cavidade de ligação do modelo 71. C – Comparação entre a molécula de NAD<sup>+</sup> calculada como corpo rígido (colorido) em relação ao NAD da estrutura resolvida 3V9L. D - omparação entre a molécula de NAD<sup>+</sup> calculada como corpo flexível (colorido) em relação ao NAD da estrutura resolvida 3V9L.

Fonte: Elaborado pelo autor.

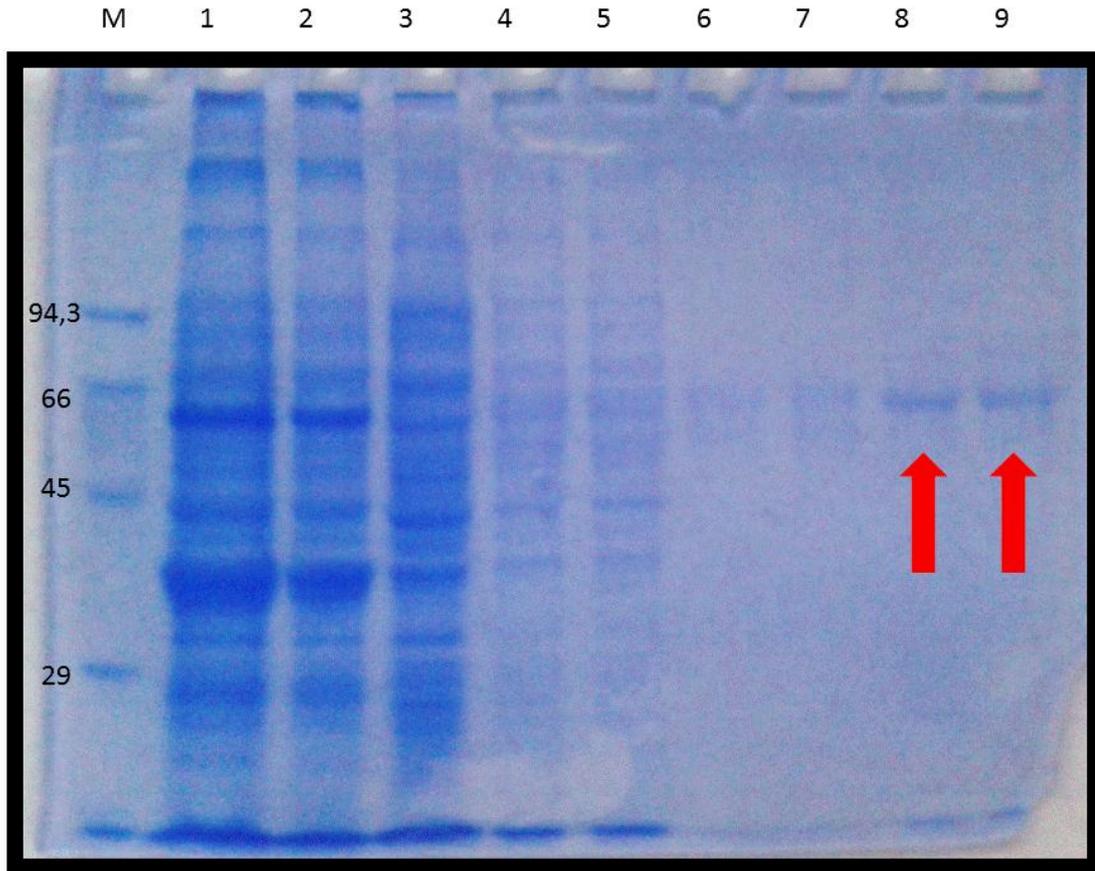
O NAD<sup>+</sup> rígido (Figura 36-C) apresentou uma energia muito positiva (27,3 kcal/mol) em relação à melhor molécula de NAD flexível (Figura 36-D) (-8,2 kcal/mol). Notou-se também que, apesar do NAD ser calculado como um corpo rígido, ainda houveram variações mínimas em relação ao NAD do molde; em contra partida, nota-se uma conformação muito diferente entre o NAD flexível e o do molde, parecendo ser uma conformação intermediária, que está tendendo à conformação ideal para a reação enzimática. Isso parece indicar que, para um alinhamento correto do NAD ao seu sítio de ligação, deve haver conformações adaptativas entre a molécula e a enzima para que este encaixe seja favorável.

Portanto, de acordo com as análises *in silico* realizadas e os experimentos de Ancoragem Molecular, é possível dizer que o modelo 71 apresenta as qualidades estruturais necessárias para estudos de design de fármacos e também para realização de uma busca virtual (*virtual screening*) em bancos de dados de moléculas para encontrar novos quimioterápicos.

## 5.2 Preparação da proteína recombinante *TcP5CDH*

Células de *E. Coli* da cepa CodonPlus, transformadas com a construção recombinante *TcP5CDH/pET28a(+)*, como descrito na Seção 3.2.1, foram inoculadas em 1 litro de meio de cultura LB e induzidas a expressar a proteína P5CDH de *Trypanosoma cruzi* a 20 °C com adição de IPTG por um período de 20 horas. A purificação por afinidade foi realizada em seguida e resultado pode ser visualizado em gel SDS-PAGE 10% como mostra a Figura 37, onde se nota que a proteína se encontra em fração solúvel.

**Figura 38: Expressão e purificação por IMAC analisado em gel SDS-PAGE 10%.**

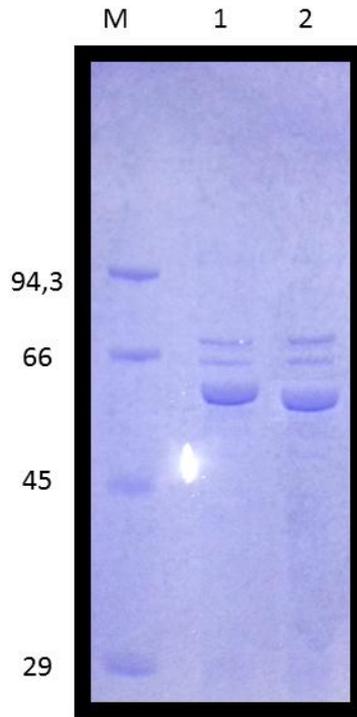


M - marcador de padrão molecular. 1 – pellet. 2 – fração solúvel. 3 – Eluato da primeira passagem. 4 – lavagem com tampão de lise. 5 – lavagem com 10 mM imidazol. 6 - lavagem com 30 mM Imidazol. 7 - lavagem com 60 mM imidazol. 8 – 90 mM imidazol. 9 – 300 mM imidazol Setas vermelhar – frações utilizadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A concentração da proteína eluída a 300 mM de Imidazol, medida através do equipamento Nanodrop 1000 (termo Scientific), foi de 0,188mg/mL. Em seguida a amostra foi submetida à diálise (Seção 3.2.3) e concentrada por ultracentrifugação em colunas WMCO com *cutoff* de 50 kDa até uma concentração de aproximadamente 2,0 mg/mL. Em seguida a amostra foi submetida a clivagem da cauda de histidina com a protease trombina por 14h e acompanhada com gel SDS-PAGE 10% (Seção 3.2.4). A Figura 38 mostra que o procedimento de clivagem foi bem sucedido, uma vez que a banda do material tratado com Trombina se encontra mais avançada no gel já que houve a perda da cauda de polihistidina.

**Figura 39: Lise da cauda de histidina com Trombina analisado em gel SDA-PAGE 10%.**

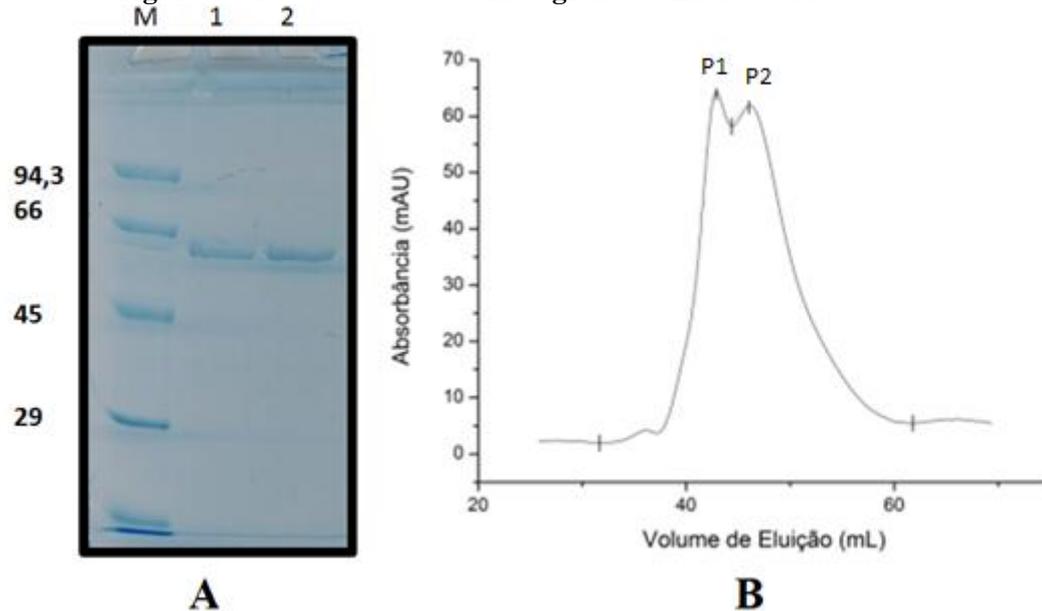


M – Padrão de peso molecular. 1 – Controle Negativo, ou seja, amostra não tratada com trombina. 2 – Amostra submetida à clivagem.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão da *TcP5CDH* mostrou-se um desafio. Apesar de a proteína ser expressa nas condições já descritas neste e outros trabalhos, o rendimento é sempre muito baixo. Verificou-se que grande parte da massa proteica fica retida no pellet e que apenas uma fração pequena permanece solúvel. Para contornar este obstáculo foram utilizados detergentes de diversas naturezas, mas não houve uma recuperação quantitativa significativa. Como a *TcP5CDH* apresenta interações com a membrana mitocondrial, como descrito por Mantilla et al. (2013; 2015) acredita-se que, outro organismo para a expressão possa ser mais bem empregado, embora a *Escherichia coli* seja um modelo de expressão versátil e relativamente mais barato que outros modelos.

Em seguida, foi realizada a purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando-se a coluna Superdex 200 HR 16/600 (GE) com tampão de Diálise 1 (Seção 3.2.5). A amostra, após ser injetada no sistema, foi separada em dois picos, P1 e P2, como mostra o espectrograma da Figura 39-B. Esses picos foram eluídos nos volumes de 42,0 ml e 46,0 mL respectivamente, e alíquotas dos pontos máximos desses picos foram coletadas e usados em uma eletroforese em gel de poliacrilamida, que foi executada com o objetivo de verificar se os picos eram de fato pertencentes à *TcP5CDH* recombinante (Figura 39-A).

**Figura 40: Resultados da Cromatografia de Exclusão Molecular**

Exclusão molecular da proteína *TcP5CDH*. A – Gel SDS-PAGE 10% dos picos de eluição: M – marcador de peso molecular (kDa), 1 – pico 1. 2 – pico 2. B – Espectrograma de eluição da *TcP5CDH* com destaque para os picos P1 e P2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a corrida da amostra, foi realizada a cromatografia de padrões moleculares do kit de Pesos Moleculares de Proteínas Padrão da GE Healthcare Life Systems. Essa cromatografia foi realizada nas mesmas condições da amostra com intuito de estimar a massa molecular e raio hidrodinâmico dos picos. A Tabela 7 mostra as características das proteínas padrão utilizadas e o volume de eluição, obtido após a cromatografia, e o valor de  $K_{av}$  calculado, que foi utilizado para os cálculos da massa molecular e raio hidrodinâmico da amostra.

**Tabela 7: Padrões Moleculares para Calibração de Colunas de Cromatografia de Exclusão Molecular**

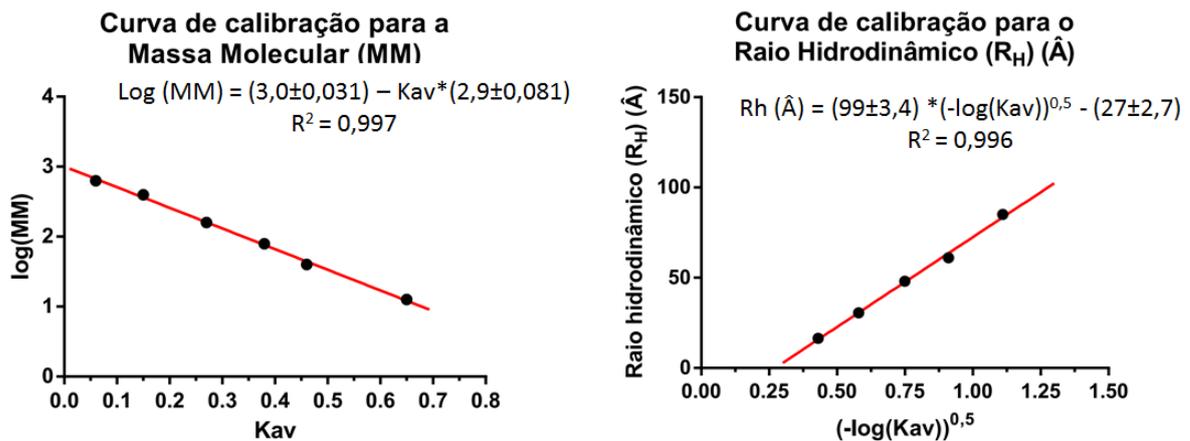
Padrão	MM (kDa)	Rh (Å)	Ve (mL)	$K_{av}$ *
Ribonuclease A	13,7	16,4	92,59	0,649533308
Ovalbumina	44	30,5	77,79	0,460299194
Canalbumina	75	-	71,74	0,382943358
Aldolase	158	48,1	62,72	0,267612837
Ferritina	440	61	53,22	0,146144994
Tiroglobulina	669	85	46,32	0,057920982
Dextran Azul	2000	-	**41,79	-

\* $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ , \*\* $V_0 = V_e$  da Dextran Azul

Fonte: Elaborada pelo autor.

A regressão linear para o cálculo da massa e raio hidrodinâmico foram realizados apresentando um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,997 e 0,996 respectivamente (Figura 40). O coeficiente de determinação representa a estatística de quanto dos valores  $y$  são explicados pela equação da reta e, quanto mais próximo  $R^2$  estiver de 1, melhor é a correlação da equação obtida com os dados.

**Figura 41: Curva de Calibração para a Massa Molecular (MM).**



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, com as equações de regressão, foram calculadas as massas moleculares aparentes e o raio hidrodinâmico dos picos identificados (Tabela 8). P1, eluído a 42 mL, apresentou uma massa aparente de 1009,59 kDa o que corresponde a um raio hidrodinâmico de aproximadamente 116,20 nm. Já o outro pico, P2, que foi eluído a 46 mL, apresentou uma massa de 715,31 kDa e um raio hidrodinâmico de 98,83 nm.

**Tabela 8. Resultados estimados à partir da Cromatografia de Exclusão Molecular**

Pico	Volume de Eluição (mL)	Kav	Massa Molecular MM (kDa)	Raio Hidrodinâmico $R_H$ (Å)
1	42,0	0,002685079	1009,59	116,20
2	46,0	0,053829434	715,31	98,83

Para verificar se os picos eram agregados proteicos ou estruturas supramoleculares, foram realizados testes de atividade com a colaboração do Dr. Brian Mantilla do Laboratório de Parasitologia do ICB-USP. Como descrito por Mantilla e colaboradores (2015), o primeiro pico apresentava uma atividade muito reduzida em relação ao segundo pico e, dessa forma, o

Pico 2 foi utilizado para os testes de Espalhamento Dinâmico da Luz e Dicroísmo Celular, enquanto o Pico 1 foi descartado por ser um agregado proteico.

Tendo em vista que a massa molecular do monômero da *TcP5CDH* é aproximadamente 60 kDa, a massa molecular do Pico 2 é um oligômero de aproximadamente 12 subunidades, o que equivale a dois hexâmeros. Dessa forma, é possível supor que o raio hidrodinâmico de um único hexâmero se encontra por volta de 4,94 nm.

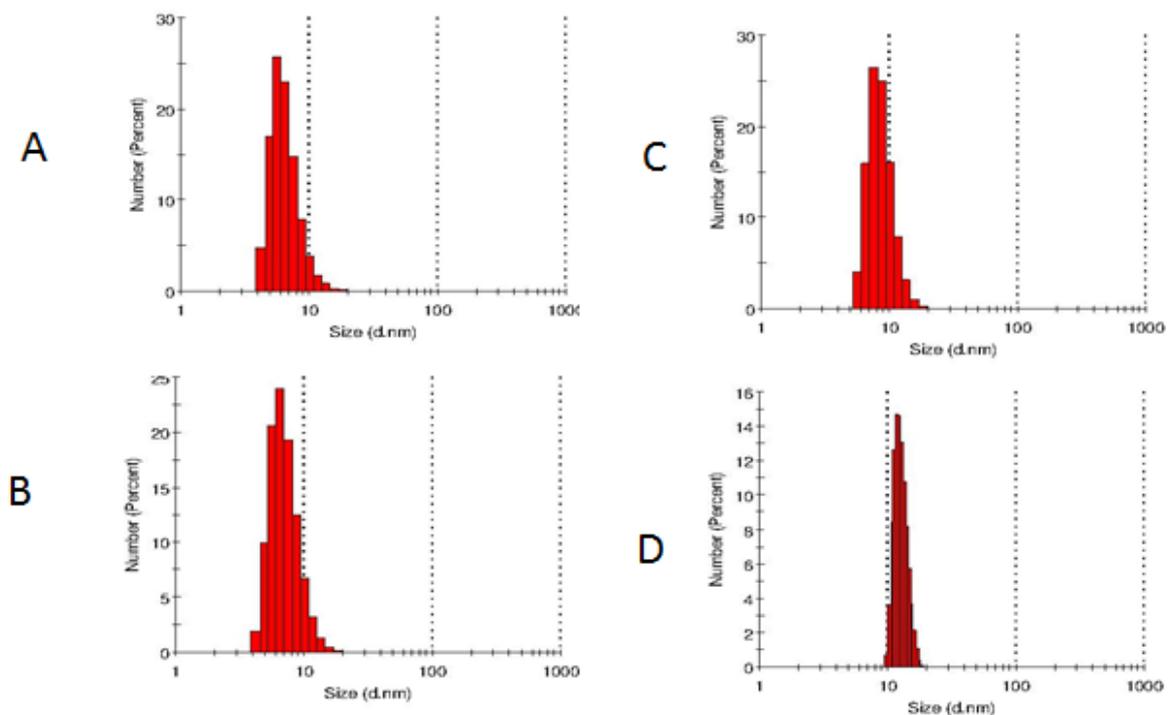
### 5.3 Caracterização Biofísica da proteína recombinante *TcP5CDH*

#### 5.3.1 Espalhamento Dinâmico da Luz

A técnica de DLS foi utilizada para verificação da homogeneidade das soluções com a proteína de estudo e comparação com os resultados obtidos na cromatografia de exclusão molecular. A proteína foi analisada a 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2,0 mg/mL e sua massa molecular aparente e seu raio hidrodinâmico foram estimados.

A Figura 41 mostra a frequência das partículas em relação ao seu tamanho (diâmetro em nm, (d.nm)). Nota-se que a distribuição das partículas nessa relação assemelha-se a uma gauseana, e que a medida que a concentração da amostra é aumentada, a média da distribuição é deslocada para a direita, indicando um aumento no tamanho das partículas.

**Figura 42: Distribuição das partículas em relação ao seu diâmetro hidrodinâmico**



A – amostra a 0.5 mg/mL. B – Amostra a 1.0 mg/mL. C – Amostra a 1.5 mg/mL. D – Amostra a 2.0 mg/ mL

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Tabela 9 observa-se a variação da massa e do raio hidrodinâmico para cada amostra. Percebe-se que a composição das partículas em suspensão gradativamente é alterada, passando de uma mistura de oligômeros menores para uma mistura de partículas cada vez maiores, como notado na Figura 39. Além disso, nota-se que a polidispersividade das partículas diminui com o aumento da concentração e que o valor médio do raio hidrodinâmico é próximo ao observado na cromatografia de exclusão molecular.

**Tabela 9. Informações hidrodinâmicas da P5CDH obtidas pelo DLS**

Concentração (mg/mL)	Massa Molecular (kDa)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Estado oligomérico em unidades monoméricas			Polidispersividade (%)
0,5	223,4 (±103,9)	5,5	1,99	3,72	5,46	38,7
1,0	246,4 (±144,4)	6,5	1,70	4,12	6,51	34,5
1,5	312,0 (±99,8)	7,5	3,54	5,2	6,86	26,0
2,0	310,5 (±20,5)	12,5	4,83	5,18	5,52	12,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Mantilla e colaboradores (2015) demonstraram que em solução, a *TcP5CDH* tende a se comportar como um hexâmero, podendo chegar a decâmero, através de experimentos de Espalhamento de Raios-x a Baixos Ângulos (*Small Angle X-Ray Scattering*, SAXS). Nesses experimentos ele mostrou que o raio hidrodinâmico do hexâmero com raio hidrodinâmico de 6,52 nm e uma massa de 364,6 kDa. Os dados obtidos para *TcP5CDH* desse trabalho corroboram com os obtidos nos experimentos de DLS e SEC (6,25 nm de raio hidrodinâmico, massa molecular de 357,66 kDa, aproximadamente).

Durante o decorrer dos experimentos, verificou-se que a proteína P5CDH apresenta uma tendência a agregação intensa, que causaram dificuldades na preparação de amostras para processos cristalográficos. Além disso, a proteína mostrou-se sensível a mudanças de tampão e força iônica, muitas vezes precipitando nos processos de diálise.

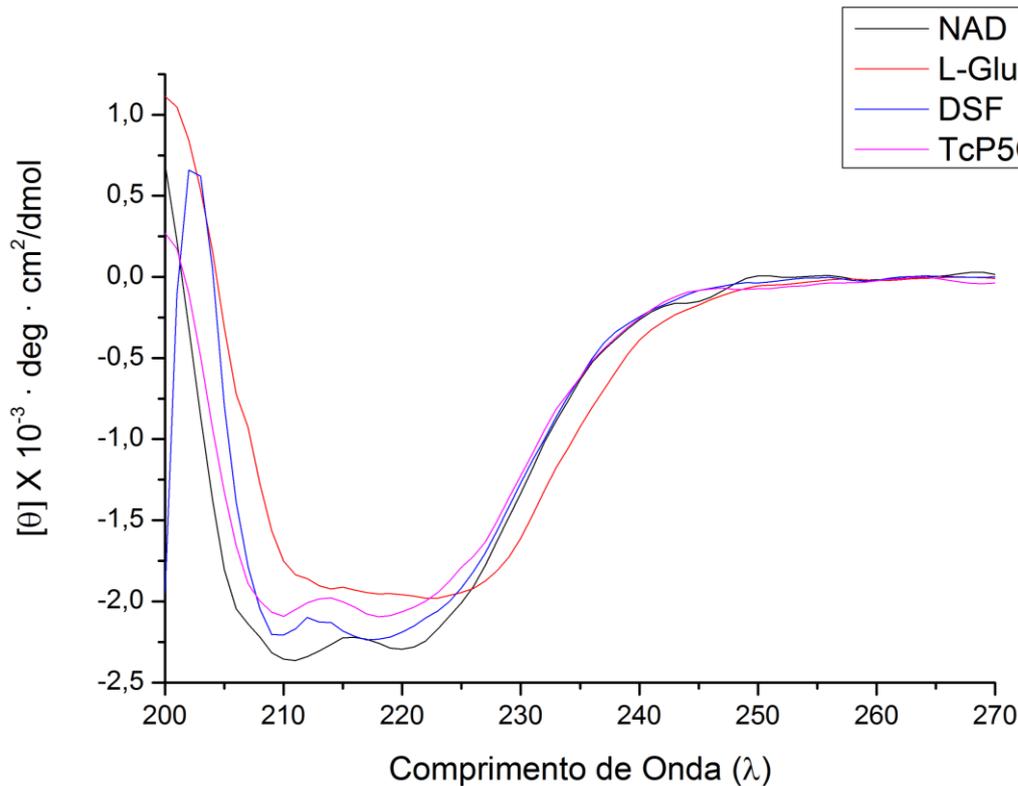
### 5.3.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Utilizando a amostra de *TcP5CDH* a uma concentração de 0,2 mg/mL (3,33 nM), foi realizada a espectroscopia de Dicroísmo Circular da proteína na ausência e presença de ligantes (100  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>, 100  $\mu$ M Disulfiram e 100  $\mu$ M L-glutamato) experimento ainda não realizado na literatura.

Na Figura 42 nota-se o pico negativo em 222 nm, devido a transição do tipo  $n-\pi^*$  na ligação peptídica, e o pico negativo em 208 nm além de uma região positiva característica de

proteínas com predominância de hélices-alfa próximo a 195 nm. No espectrograma nota-se pequenas variações nos picos de 222 e 208 nm, que podem ser relacionados à mudanças de organização estrutural induzida pelos ligantes.

**Figura 43: Espectro de Dicroísmo Circular da P5CDH de *Trypanosoma cruzi***



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar essa possibilidade, foi realizada uma Deconvolução por meio do programa CDNN em todas as variações de ligantes descrita acima para a determinação da composição da estrutura secundária (Tabela 10).

**Tabela 10. Composição de Estrutura Secundária da *TcP5CDH***

Proteína	Alfa-Hélice (%)	Folhas-Beta Antiparalela (%)	Folhas-Beta Paralela (%)	Voltas (%)	Região desordenada (%)
<b><i>TcP5CDH</i></b>	23,0	12,4	12,3	19	40,9
100 uM DSF	21,9	12,8	12,7	19,1	42,2
100 uM NAD	25,4	11,4	11,3	18,5	38,5
100 uM L-Glu	21,6	12,7	13,3	19	44,4
<b>Média</b>	<b>23,0</b>	<b>12,3</b>	<b>12,4</b>	<b>18,9</b>	<b>41,7</b>

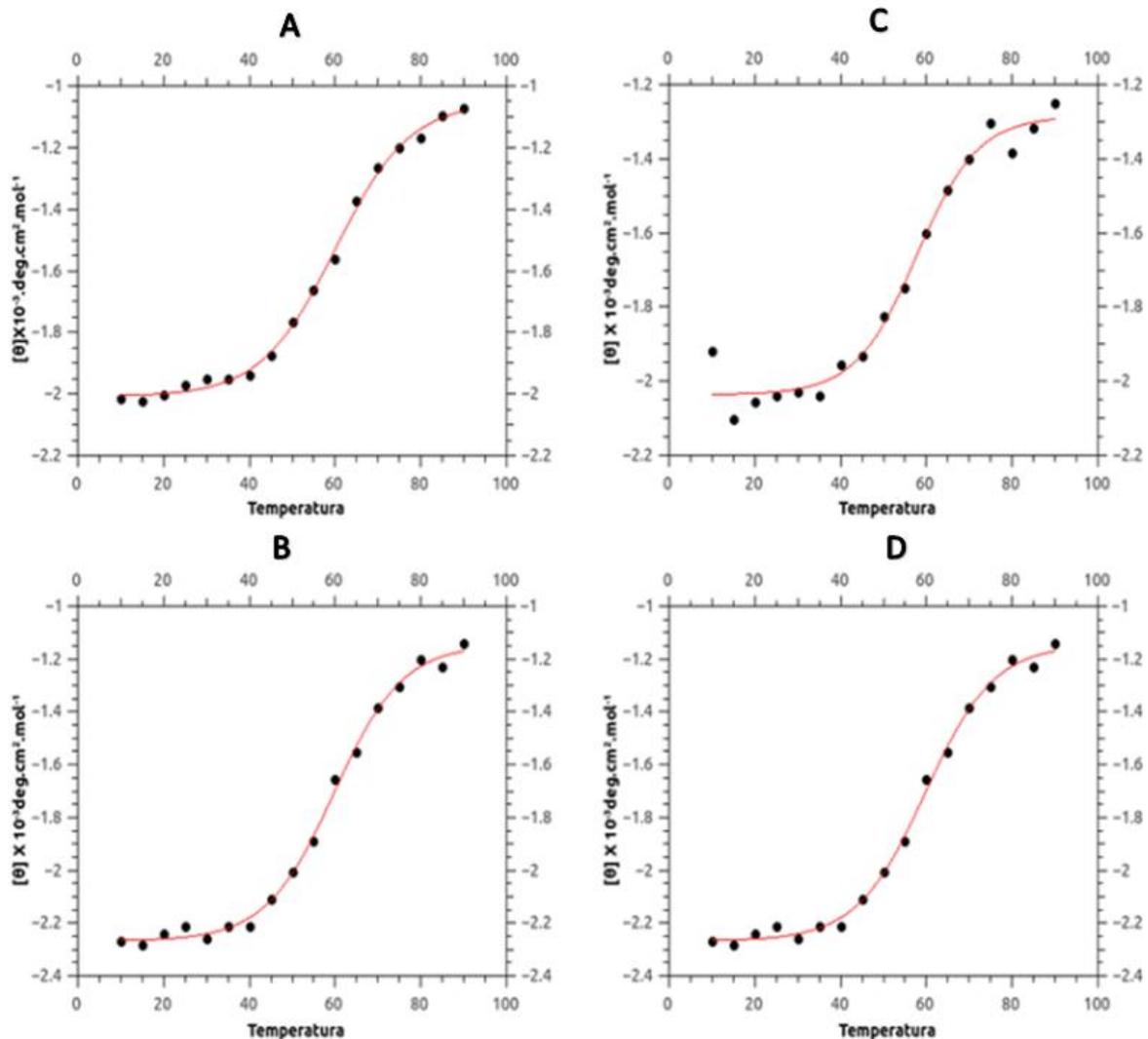
Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação à proteína *TcP5CDH*, percebe-se uma leve alteração da conformação da estrutura na presença dos ligantes: com o L-Glu e Dissulfiram há uma diminuição da quantidade de hélices-alfa e um aumento da composição de fitas-beta e das regiões

desordenadas. Em contra partida, na presença de  $\text{NAD}^+$ , ocorre um aumento na composição de hélices-alfa. Comparando os resultados obtidos das predições *in silico* da *TcP5CDH* com os resultados obtidos pelo CD, observa-se uma diferença de aproximadamente 35 a 40% na composição de hélices-alfa e folhas-beta.

Para verificar se a presença de ligantes altera a estabilidade da proteína *TcP5CDH* em relação a temperatura, foi realizada a sua desnaturação térmica na presença e ausência dos ligantes  $\text{NAD}^+$ , L-Glu e Dissulfiram. Na Figura 43 são mostra os gráficos da desnaturação térmica. Neles são observados uma curva sigmóide característica que foi avaliada através da equação de Boltzman, onde o ponto de inflexão da curva é o ponto de  $T_M$ .

**Figura 44. Espectros da desnaturação térmica da *TcP5CDH* na presença e ausência de  $\text{NAD}^+$ , Dissulfiram e L-glutamato**

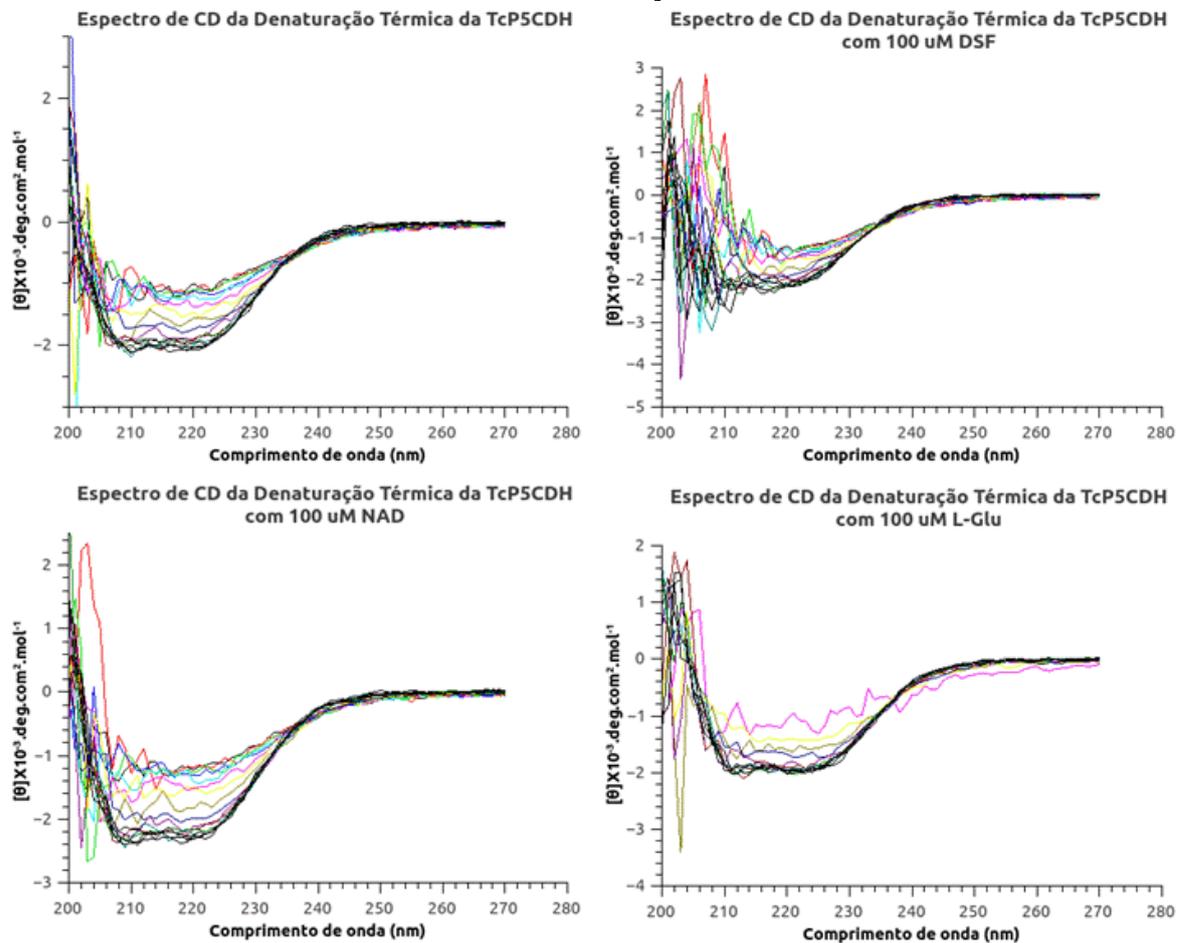


A – *TcP5CDH* pura. B – Proteína em presença de 100  $\mu\text{M}$  de Dissulfiram. C – Proteína em presença de 100  $\mu\text{M}$  de L-Glutamato. D – Proteína em presença de 100  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 44 mostra o espectro de CD em relação à temperatura. Nota-se que a medida em que a temperatura é aumentada, menor é a absorção da luz circularmente polarizada, devido ao desnaturamento térmico provocado. Na presença de Dissulfiram o ruído abaixo de 215 nm é muito alto, sendo possivelmente uma interferência da própria molécula. Já para o Glutamato, nota-se que seu espectro varia menos acentuadamente que os outros ligantes, embora na sua presença a variação do espectro seja mais acentuada. O NAD apresenta um espectro semelhante à proteína pura, apresentando apenas um ruído mais acentuado em comprimentos de onda abaixo de 210 nm.

**Figura 45. Espectro de Dicroísmo Circular da TcP5CDH na presença e ausência de ligantes no ensaio de denaturação térmica**



As linhas coloridas representam as temperaturas em que foram medidas o espectro de CD

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Tabela 11 mostra os valores de  $T_m$  e  $R^2$  encontrados para o experimento de denaturação térmica. Nota-se que a  $T_m$  da proteína sem ligantes (60,01 °C) é muito próximo da  $T_m$  do Dissulfiram (59,76 °C), indicando que talvez, não houve uma interação entre o composto com a proteína, a pesar de sua forma estar em um meio contendo um agente redutor

que, em tese, deixaria o DSF em sua forma ativa. Já as amostras contendo L-Glu e  $\text{NAD}^+$  apresentaram  $T_m$  de 57,76 e 58,18 °C, respectivamente; uma variação de aproximadamente 2 °C em relação à proteína pura, indicando que na presença destes compostos a conformação da proteína sofre algum tipo de interação com seus ligantes e diminui levemente sua resistência térmica.

**Tabela 11: Resultados do fit na equação de Boltzman**

Amostra	$T_m$	$R^2$
<i>TcP5CDH</i>	60,01	0,9976
<i>TcP5CDH+100uM DSF</i>	59,76	0,9958
<i>TcP5CDH+100uM L-glu</i>	57,76	0,9811
<i>TcP5CDH+100uM NAD</i>	58,18	0,9957

Quando observa-se a estrutura resolvida de homólogos da *TcP5CDH*, percebe-se claramente que o glutamato, bem como seu predecessor (GSA) interage com regiões flexíveis da cavidade catalítica; estas regiões ficam próximas da região de interface responsável pela oligomerização da enzima e esta perturbação pode ser a responsável pela diminuição da estabilidade térmica. O NAD, por sua vez, apresenta uma porção de sua estrutura interagindo com o sítio ativo para ser acceptor de um hidrogênio; como discutido na ancoragem molecular, esta molécula não assume uma conformação favorável para interagir com a proteína logo de início. Essa adaptação na conformação para a interação correta com a enzima pode ser a responsável pela diminuição da estabilidade térmica observada.

Além disso, quando observamos os dados da deconvolução com o da denaturação térmica, pode-se observar que a interação do glutamato e do NAD alteram mais acentuadamente a composição da estrutura secundária da *TcP5CDH* do que o Dissulfiram. Essa mudança na composição estrutural mediada pela presença dos ligantes pode estar relacionada às variações de  $T_m$  aqui apresentadas.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho são apresentados os resultados de expressão e purificação da proteína Delta-1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcP5CDH), a segunda enzima da via de degradação da L-prolina. Sua caracterização biofísica foi realizada através dos ensaios de exclusão molecular, dicroísmo circular e espalhamento dinâmico da luz.

Os resultados *in silico* realizados durante a pesquisa mostram que a P5CDH sem a região sinalizadora de importação mitocondrial apresenta uma massa molecular aproximada de 60 kDa e um PI de 7,6. Na sua composição de aminoácidos existem 10 cisteínas, sendo uma catalítica e as demais não formam ligações de dissulfeto. A sequência primária da TcP5CDH apresenta seus aminoácidos de ligação ao NAD, ao substrato e os resíduos catalíticos altamente conservados entre as espécies de tripanosomatídeos e organismos homólogos.

Essa proteína apresenta uma região altamente hidrofóbica provavelmente entre os resíduos F198 e L290 que foi indicado por três programas de predição independentes; esses dados corroboram com os experimentais realizados por Mantilla (2013) que mostrou que a P5CDH de *T. cruzi* está associada à membrana interna mitocondrial.

A composição da estrutura secundária foi predita utilizando o servidor PSIPRED indicando 37,86% de hélices-alfa, 8,93% de fitas-beta e 53,21% de regiões flexíveis. Entretanto os dados experimentais de Dicroísmo Circular mostraram que a real composição é de 23% de hélices-alfa, 24,7% de folhas-beta, 18,9% de voltas e 41,7% de regiões desordenadas.

A TcP5CDH apresenta três domínios característico da família ALDH4, um catalítico, um de ligação a NAD e um responsável pela oligmerização; esses domínios apresentam o enovelamento típico como os experimentalmente demonstrados em homólogos (PEMBERTON et al., 2013; 2014; LUO, SING; TANNER, 2013). O modelo gerado por Modelagem por Homologia mostrou uma alta qualidade, tendo uma energia global dentro da faixa esperada para proteínas cristalizadas do mesmo tamanho (Z-score de -9,76) e uma energia local negativa. O gráfico de Ramachandram não apresentou resíduos fundamentais em regiões não permitidas e o RMSD do modelo apresentou valores inferiores a 1. A Ancoragem Molecular mostrou que o modelo utilizado apresenta os resíduos do sítio ativo e dos sítios de ligação a substrato devidamente estruturados, além de mostrar a possível conformação do dissulfiram na proteína. Somados, os dados computacionais mostrando que o Modelo 71 da

*TcP5CDH* apresenta qualidade adequada para estudos de *design* de fármacos e para a busca de moléculas e inibidores em bancos de dados para o tratamento da Doença de Chagas.

A amostra purificada por Cromatografia de Exclusão Molecular mostrou dois picos com volumes de eluição de 42 e 46 mL. O primeiro pico, P1, não apresentou atividade enzimática, enquanto o segundo pico, P2 o fez. P2 apresentou uma massa aparente de 713,21 kDa e um raio hidrodinâmico aparente de 9,88 nm. A massa esperada para os hexâmeros da P5CDH de *T. cruzi* é de aproximadamente 360 kDa o que significa que o pico em questão era aproximadamente um dímero de hexâmeros. O Espalhamento Dinâmico da Luz mostrou que a proteína possui um comportamento de oligomerização dependente da concentração; à partir deste experimento verificou-se uma massa molecular média de 223,4 kDa, 246,4 kDa, 312 kDa e 310,5 kDa para as amostras de concentração de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2,0 mg/mL respectivamente. Com estes experimentos foi possível estimar o raio hidrodinâmico dos oligômeros, sendo 2,74 nm para dímeros, 3,25 para tetrômeros, 3,75 para pentômeros e 6,25 para hexâmeros. Esses dados estão em concordância com os obtidos por Mantilla (2015) através de experimentos SAXS e, dessa forma, os complementam.

Com a espectroscopia de Dicroísmo Circular foram determinadas, através do ensaio da desnaturação térmica, a estabilidade térmica da *TcP5CDH* na presença de NAD, L-Glu.e Dissulfiram. Obteve-se, através da equação de Boltzman os valores de  $T_m$  de 60 °C para a proteína pura, 59,76 °C na presença de Dissulfiram, 57,76 °C na presença de L-Glu e 58,18 °C na presença de  $NAD^+$ . A variação térmica mostrou que o glutamato e o NAD diminuem a estabilidade térmica da proteína enquanto o dissulfiram aparentemente não afeta a proteína. Essas informações são resultados inéditos na literatura.

Por fim, somados aos experimentos anteriormente realizados no Grupo de Cristalografia do IFSC-USP de São Carlos e no Grupo de Parasitologia do ICB-USP de São Paulo com os aqui apresentados, o conhecimento a respeito da *TcP5CDH* e a via da prolina foram ampliados e aprofundados com sucesso.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Recomenda-se para trabalhos futuros experimentos da *TcP5CDH* com o Dissulfiram e outras moléculas de interesse, para extrair informações de caráter termodinâmicos, como por exemplo, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), além da realização de estudos de espectrometria de massas para verificar as camadas de interface proteína-proteína. Conquanto a cristalografia da *TcP5CDH* seja complexa, é relevante insistir neste método na presença e ausência de ligantes e, ainda, obter mais dados estruturais acerca desta proteína ligada a membrana para melhor entender os seus mecanismos de ação.

Lembra-se também da possibilidade dos dados apresentados neste trabalho possam ser de grande auxílio no desenho de fármacos, identificação, criação e caracterização de novas moléculas e, posteriormente, realizar testes *in vitro* e *in vivo* para determinar as suas eficiências como agentes tripanomicidas.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135-1143, 2004.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi* – host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819- 823, 2005.
- BAKER, D.H. Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. **Amino Acids**. v. 37, n. 1, p. 29-41, nov. 2008.
- BARCÁN, L. *et al.* Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. **Liver Transplantation**, v. 11, n. 9, p. 1112-1116, 2005.
- BARRETT, F. M. Changes in the concentration of free amino acids in the haemolymph of *Rhodnius prolixus* during the fifth instar. **Comparative Biochemistry and Physiology B.**, v. 48, n. 2, p. 241-250, 1974.
- BARRON, A. R.; LI, Y. Dynamic Light Scattering. **Opstax CNX**, 2014. Disponível em <<http://cnx.org/contents/P8mNrZNN@2/Dynamic-Light-Scattering>> Acesso em 17 maio 2016.
- BAZZOLI, A.; TETTAMANZI, A.G.; ZHANG, Y. Computational protein design and large-scale assessment by I-TASSER structure assembly simulations. **Journal of molecular biology**, v. 407:764–776, 2011.
- BD BIOSCIENCES. **BD TALON Metal Affinity Resins: User Manual**. [s.l.]:BD Biosciences, 2003.
- BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132-133, 2006.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering**. [s.l.]:Dover Publications, 2000.
- BITTENCOURT, A. L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 403-408, 1992.
- BITTENCOURT, A. L.; BARBOSA, H. S. Incidência da transmissão congênita da doença de Chagas em abortos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 257-259, 1972.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages?. **Parasitology Today**, v. 15, n. 1, p. 22-28, 1999.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review Microbiology**, n. 27, p. 347-382, 1973.

BURKE, B.; LEWIS, C. E. Macrophages in Parasitic Infections. In: \_\_\_\_\_ (ed.) **The Macrophage**. 2nd ed. New York:Oxford University Press, 2002. p. 253-304

BURSELL, E. et al. The supply of substrates to the flight muscle of tsetse flies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 67, n. 2, p. 296, dez. 1973.

CALDAS, R. A. et al. Incorporation of Ammonium in Amino Acids by *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol*, v. 66, n. 2, p. 213-216, 1980

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.

CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 11, p.37-49, 1984.

CARDOSO, A. V.N. *et al.*.Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 287-289, 2006.

CARUGO, O.; PONGOR, S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. **Protein science**, v. 10, n. 7, p. 1470-3, jul. 2001.

CARVALHO, L. O. P. et al. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. **International journal of experimental pathology**, v. 90, n. 1, p. 52-57, 2009.

CARVALHO, T. L.; RIBEIRO, R. D.; LOPES, R. A. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease: I. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. **Experimental Pathology**, v. 41, n. 4, p. 203-214, 1991.

CASTRO, J. A.; DIAZ DE TORANZO, E.G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease).**Biomedical and Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 19, 1988. Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em 9 jul. 2013.

CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB J.**, v.6, n.13, p. 3153-3161, 1992a

CAZZULO, J.J. Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Subcell. Biochem.**, v. 18, p. 235-357, 1992b

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease): Biology**. Atlanta: Center For Disease Control And Prevention, 2016a. Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em 13 maio 2016.

CERONI, A. et al. DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server. **Nucleic Acids Research**, v.34, Issue suppl 2, p. W177-W181, July 2006.

CHAMOND, N. et al. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. **Journal of Biology and Chemistry.**, v. 278, n. 18, p. 15484-15494, 2003.

CHAVALI A.K. et al. Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. **BMC systems biology.** v. 27; n. 6(1) p. 1, apr. 2012.

CHIRAC, P.; TORREELE, E. Global framework on essential health RED. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p.1560-1561, 2006.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-S5, 24 June 2010. Supplement.

CONTRERAS, V.T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985

CORRÊA, D.H.; RAMOS, C.H. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, May 2009.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; VIÑA, P. A. Chagas Disease: A New Worldwide Challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 24 June 2010. Supplement.

CSERZO, M. et al. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. **Protein Engineering**, v. 10, n. 6, p. 673-676, 1997.

DEUSCHLE, K. et al. A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J.*, v. 27, n. 4, p. 345-356, 2001.

DI NOIA, J. M.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. The *Trypanosoma cruzi* Mucin Coat: Structure, regulation of the expression and relevance in the host-parasite relationship. In: KELLY, J. M. (ed.). **Molecular Pathogenesis of Chagas' Disease**. Georgetown: Landes Bioscience, 2003. Cap. 3, p. 30-55.

DIAS, J. C. P.; BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 139-147, 1984.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008.

DOCAMPO, R.; LUKESŠ, J. Trypanosomes and the solution to a 50-year mitochondrial calcium mystery. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 31-37, 2012.

DVORAK, J. A.; SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*: interactions with mouse peritoneal macrophages. **Experimental Parasitology**, n. 32, p. 289-300, 1972.

ELANGO, R.; BALL, R.O.; PENCHARZ, P.B. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 19-27, maio 2009.

FEASEY, N. *et al.*. Neglected Tropical Diseases. **British Medical Bulletin**, n. 93, p. 179-200, 2010.

FERGUSON, M. A. J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1295-1302, 1997.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734-747, 2012.

FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. 2013. Disponível no site <<https://agencia.fiocruz.br/doenca-de-chagas>>. Acesso: 28 mar. 2016.

FIRKINS, J.L. *et al.* Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, Suppl 1, P. E31-E51, 2006.

FUENTES, B. R.; MATURANA A. M.; DE LA CRUZ, M. R. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. **Revista Chilena de Infectología**, v.29, n.1, p. 82-86, 2012.

GARG, N. J. Global Health: Neglected Diseases and Access to Medicine. **Infectious Diseases Clinics of North America**, n. 25, p. 639-651, 2011.

GE HEALTHCARE. **Affinity Chromatography: Principles and Methods**. [s.l.]GE Healthcare, 2007.

GOLDBURG, W. I. Dynamic Light Scattering. **American Journal Physics**, v. 67, p. 1152, 1999.

GRANT, I. H. *et al.* Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 10, p. 849-851, 1989.

GREENFIELD, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, Dec. 2006.

HANSFORD, R. G; SACKTOR, B. The control of the oxidation of proline by isolated flight muscle mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 245, n. 5, p. 991-994, 1970

HANUKOGLU, I. Proteopedia: Rossmann Fold: A Beta-AlphaBeta Fold at Dinucleotide Binding Sites. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 206-209, May-Jun, 2015.

HARGROVE, J. W. Amino acid metabolism during flight in tsetse flies. **J. Insect Physiol.**, v. 22, n. 2, p. 309-313, 1976

HARINGTON, J. S. Studies of aminoacids of *Rhodinus prolixus* I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology*, v. 51, p. 309-318, 1961.

HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. Experimental transmission of *Trypanosoma cruzi* through the genitalia of albino mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 713-717, 2001.

HOFMANN, K.; STOFFEL, W. TMBASE - A database of membrane spanning protein segments. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 374, p. 166, 1993.

HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

HOTEZ, P. J.; BROWN, A. S. Neglected Tropical Diseases Vaccines. **Biologicals**, n. 37, p. 160-164, 2009.

INAGAKI, E. et al. Crystal structure of *Thermus thermophilus* Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **Journal of Molecular Biology**, v. 362, n. 3, p. 490-501, 2006.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, p. 195-202, 1999.

KACZANOWSKI, S.; ZIELENKIEWICZ, P. Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures? **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 125, p. 643-50, 2010.

KALL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L.A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 5, p. 1027-1036, May 2004.

KEGG: KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. **Arginine and Proline Metabolism**. Disponível em <[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?tcr00330](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?tcr00330)> Acesso em: 15 de Julho de 2016

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, Aug. 2005.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 2, p. 210-23, abr. 1999.

KILBURG; D.; GALLICCHIO, E. Recent Advances in Computational Models for the Study of Protein-Peptide Interactions. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 105, p. 27-57, 2016.

KOPPAKA, V. et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 520-539, 2012.

KRANACOVA, K. et al. *Euglena gracilis* and Trypanosomatids possess common patterns in predicted mitochondrial targeting presequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 75, n.3-4, p.119-129, 2012.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, January 2001.

KUN, H. *et al.* Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 11, p. 1534-1540, 2009.

LI et al. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 43-53, maio 2009.

LOVELL, S. C. Structure validation by C $\alpha$  geometry: phi, psi and C $\beta$  deviation. **Proteins: Structure, Function E Genetics**, v. 50, p. 437-450, 2002.

LUO M.; SINGH, R. K., TANNER, J.J. Structural Determinants of Oligomerization of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase: Identification of hexamerization hot spots. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 17, p. 3106-3120, 2013

MAGDALENO, A. et al. The involvement of glutamate metabolism in resistance to thermal, nutritional, and oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*. **Enzyme Research**, 2011.

MALVERN INSTRUMENTS, LTD. **Zetasizer nano series: user manual**. United Kingdom: Malvern Instruments Limited, 2004.

MANTILLA, B. S. **Caracterização funcional e papel fisiológico da Delta-1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*: uma enzima do metabolismo de prolina**. 2013. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MANTILLA, B. S. et al. Role of  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase Supports Mitochondrial Metabolism and Host-Cell Invasion of *Trypanosoma Cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 12, p.7767-7790, 2015.

MARCIANO, D. et al. Functional characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 166, n. 2, p. 172-182, 2009

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Chagas' heart disease. In: YUSUF, S. *et al.* (ed.). **Evidence-Based Cardiology**. 3. ed. [s.l.]: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 51, p. 823-841.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á. V. L.. Chagas' heart disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 72, n. 3, p. 247-280, 1999.

MARTINS, R.M. et al. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 3023-3032, 2009.

MARTINS, E. M. **Doença de Chagas: Situação epidemiológica atual**. [Brasília]:Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. Disponível em: <  
<http://www.fiocruz.br/pidc/media/Doenca%20de%20Chagas%202010.pdf>> Acesso em: 10 ago. 2016

MATSUDA, N.M. *et al.*. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MENG, X. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MILLER, G. et al. Unravelling delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26482-26492, 2009

MORELLO, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part C: Comparative Pharmacology**, v. 90, n. 1, p. 1-12, 1988.

MORENO, S. N. et al. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1535-1540, 1994.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Invasion of Mammalian Cells by *Trypanosoma cruzi*. In: KELLY, J. M. (ed.). **Molecular Pathogenesis of Chagas' Disease**. Georgetown:Landes Bioscience, 2003. p. 72-82.

MORETTI, E. *et al.*. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 53-55, 2005.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. In: KUKOL, A. (ed.). **Molecular Modeling of Proteins**. [s.l.]:Humana Press, 2008. (Methods Molecular Biology 443). Cap. 4. p. 365-382.

NAGAJYOTHI, F *et al.*. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-643, May 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, D. P. *et al.*. Doença de Chagas. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia Humana**. 11. ed. Rio de Janeiro: Anatheu, 2005. Cap. 11, p.85-108.

NJAGI, E. N. *et al.* Proline transport by tsetse fly *Glossina morsitans* flight muscle mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, v. 102, n. 3, p. 579-584, 1992

NÓBREGA, A. A. *et al.*. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653-655, abr. 2009 Disponível em: <<http://www.cdc.gov/EID/content/15/4/653.htm>>. Acesso em 14 dez. 2015.

NOMURA, M; TAKAGI, H. Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 101, n. 34, p. 12616-12621, 2004

PAES, L.S. *et al.* The uniqueness of the *trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to target new drugs against chagas disease. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 20, p. 2074=99, jul. 2011.

PAES, L.S. *et al.* Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**. v. 8, n. 7, p. e69419, jul. 2013.

PEMBERTON, T.A. *et al.* Structural studies of yeast  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): active site flexibility and oligomeric state. **Biochemistry**, v. 53, n. 8, p. 1350-9, fev. 2014.

PEMBERTON, T.A.; TANNER, J.J. Structural basis of substrate selectivity of  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): Semialdehyde chain length. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 538, n. 1, p. 34-40, 2013.

PENNA, G. **Doenças Negligenciadas no Brasil**. [Brasília]:Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/388993/>> Acesso em: 10 ago. 2016

PEREIRA, C. A. *et al.* Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. **FEBS Letters**, v. 27789, n. 554, p. 201-205, 2003.

PEREIRA, C. A. *et al.* Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. **FEBS Letters**, v. 26400, n. 526, p. 111-114, 2002.

PETSKO, G.A.; RINGE, D. **Protein structure and function**. [s. l.]:New Science Press, 2004.

PRATA, A.; KÖBERLE, F.; PUIGBÓ, J. J. Chagas' heart disease. **Cardiology**, v. 52, n. 1-2, p. 79-96, 1968.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, set. 2001.

PUBCHEM. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em 10 ago. 2016

RASSI JR, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883-889, 2000.

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

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Diseases of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

REY, L. et al. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIARTE, A. *et al.*. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience, 1989–1996. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 561-567, 1999.

RIBEIRO, M. *et al.*. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental parasitology**, v. 162, p. 1-6, Mar. 2016.

ROCHE. **The Complete Guide for Protease Inhibitors**. Mannheim: Roche, 2004.

ROHLOFF, P; RODRIGUES, C. O; DOCAMPO, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid influx and changes in intracellular calcium. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, v. 126, p. 219-230, 2003.

ROHLOFF, P; RODRIGUES, C. O; DOCAMPO, R. Alcidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Jornal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p.52270-52281, 2004

SARTOR, M. **Dynamic Light Scattering: to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution**. San Diego: University of California San Diego, [s. d.].

Disponível em:

<<http://216.92.172.113/courses/phys39/light%20scattering/DLS%20LabView%20UCSD.pdf>

> Acesso em: 17 maio 2016

SAYÉ, M. *et al.* Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species through a novel D,L-proline transporter. **PLOS One**, v. 9, n. 3, 2014

SCHENKMAN, S. et al. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1117-25, jun. 1991.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitology Today**, v. 9, n. 6, p. 218-222, 1993.

SCHIMITZ, K. S. **An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules**. [s.l.]: Academic Press, Inc. 1990.

SCHRAUZER, G.N. Selenium and cancer: a review. **Bioinorganic Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 275-281, 1976.

SEILER, J.P. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and the chinese hamster. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 339-347, 1976.

SHEN, M.Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein science**, v. 15, n. 11, p. 2507-24, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351-357, 1991.

SILBER, A. M. *et al.* Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 441-446, 2002

SILBER, A. M. *et al.* Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Chem. Parasitol.**, v. 168, n. 1, p. 102-108, 2009

SINGH, S. *et al.* Aldehyde dehydrogenase in cellular response to oxydative eletrophilic stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 56, p. 89-101. 2013.

SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 17-36, 1999.

SOUZA, W. A. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology** p.1-18, 2010.

SRIVASTAVA, D. *et al.* The three-dimensional structural basis of type II hyperprolinemia. **Journal of molecular biology**, v. 420; n. 3 p. 176-89, 2012.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 55, n. 3, p. 443-7, dez. 1976.

TAN, H.; ANDREWS, N. W. Don't bother to knock—the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 10, p. 427-428, 2002.

TANNER, J. J. Structural biology of proline catabolism. **Amino acids**, v. 35, n. 4, p. 719-30 2008.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*- induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 3, p. 1017-1022, 1994.

TARLETON, R. L.; ZHANG; L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitology today**. v. 15, n. 3, p. 94-9, mar. 1999.

TAVARES, M. C. H. *et al.* The male reproductive organs in experimental Chagas' disease: III. Plasma testosterone and accessory sex glands in the acute phase of the disease. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 3, p. 243-246, 1994.

TEIXEIRA, A. R.; HECHT, M. M.; GUIMARO, M. C.; SOUSA, A. O.; NITZ, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical microbiology reviews**. v. 24, n. 3, p. 592-630, jul. 2011.

TONELLI, R. R. *et al.* L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 733-741, 2004.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5, p. 472-481, 2001.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA. **Structural analysis and verification server**. Disponível em <<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>>. Acesso em 23 jan. 2015

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

VRAY, B. Macrophages in parasitic infections. In: BURK, B.; LEWIS, C. E. (ed.). **The Macrophage**. 2nd. New York: Oxford University Press, 2002. p.253-304.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases**. [s.l.]: WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Geneva:WHO, 2012. (Technical Report Series ; n. 975).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests**. Geneva:WHO, 2007.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; JAEGER, L.A.; JOHNSON, G.A.; KIM, S.W.; KNABE, D.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E.; YIN, Y.L. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. **Livestock science**, v.112, n. 1, p. 8-22, out. 2007.

WU, G. Amino acids: metabolism, function and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, p. 1-17, 2009.

WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction and health. **Advances in Nutrition**, v. 1, p. 31-37, 2010.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

YOSHIDA, N.; CAMARGO, E. P. Urotelism and Ammonotelism in Trypanosomatids. **Journal of Bacteriology**, v. 136, n. 3, p. 1184-1186, 1978

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1, jan. 2008. Disponível em <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-9-40>> Acesso em 14 dez. 2015.

## APÊNDICE A: MATERIAL COMPLEMENTAR

### 1. Modelagem por Homologia

Para a modelagem da *TcP5CDH* utilizando-se múltiplos moldes, foi seguido como base o tutorial *Advanced Modeling* disponível no site da Salilab (<https://salilab.org/modeller/tutorial/>). Os *scripts* foram empregados na ordem indicada abaixo. Em resumo, os *scripts* são programas escritos em linguagem de programação Python onde cada um realiza um processo específico e os arquivos apresentam a extensão *.py*. Neste trabalho 4 *scripts* foram utilizados, onde sua função era a criação de um alinhamento consenso dos moldes, alinhamento da estrutura alvo com o alinhamento consenso, geração e avaliação os modelos da *TcP5CDH*.

- **SCRIPT 1:** Lê todas as sequências dos arquivos PDB e gera um alinhamento inicial. Usa-se esse *script* mais uma vez para gerar o cálculo de qualidade inicial.
- **SCRIPT 2:** Alinha a sequência alvo com a sequência gerada no primeiro *script*.
- **SCRIPT 3:** Gera os modelos
- **SCRIPT 4:** Gera arquivos de análise dos modelos criados e os pontua em função do *DOPE score*

Os *script*s utilizados são exibidos integralmente abaixo:

#### SCRIPT 1

```

from modeller import *

log.verbose()
env = environ()
env.io.atom_files_directory = './:../atom_files/'

aln = alignment(env)
for (code, chain) in (('3V9G', 'A'), ('3V9J', 'A'), ('3V9H', 'A'),
('3V9I', 'A'), ('4IDM', 'A'), ('4IDS', 'A'), ('4IHI', 'A'), ('4OE4',
'A'), ('4OE5', 'A')):
    mdl = model(env, file=code, model_segment=('FIRST:'+chain,
'LAST:'+chain))
    aln.append_model(mdl, atom_files=code, align_codes=code+chain)

for (weights, write_fit, whole) in (((1., 0., 0., 0., 1., 0.), False,
True), ((1., 0.5, 1., 1., 1., 0.), False, True), ((1., 1., 1., 1., 1.,
0.), True, False)):
    aln.salign(rms_cutoff=3.5, normalize_pp_scores=False,
rr_file='$ (LIB)/asl.sim.mat', overhang=30,
gap_penalties_1d=(-450, -50),
gap_penalties_3d=(0, 3), gap_gap_score=0,
gap_residue_score=0,
dendrogram_file='fm00495.tree',
alignment_type='tree', # If 'progresive', the tree is not
# computed and all structues will
be
# aligned sequentially to the first

```

```

        feature_weights=weights, # For a multiple sequence
alignment only
                                # the first feature needs to be
non-zero
                                improve_alignment=True, fit=True, write_fit=write_fit,
                                write_whole_pdb=whole, output='ALIGNMENT QUALITY')

aln.write(file='fm00495.pap', alignment_format='PAP')
aln.write(file='fm00495.ali', alignment_format='PIR')

aln.salign(rms_cutoff=1.0, normalize_pp_scores=False,
           rr_file='$(LIB)/asl.sim.mat', overhang=30,
           gap_penalties_1d=(-450, -50), gap_penalties_3d=(0, 3),
           gap_gap_score=0, gap_residue_score=0,
dendrogram_file='lis3A.tree',
           alignment_type='progressive', feature_weights=[0]*6,
           improve_alignment=False, fit=False, write_fit=True,
           write_whole_pdb=False, output='QUALITY')

```

## SCRIPT 2

```

from modeller import *

log.verbose()
env = environ()

env.libs.topology.read(file='$(LIB)/top_heav.lib')

# Read aligned structure(s):
aln = alignment(env)
aln.append(file='fm00495.ali', align_codes='all')
aln_block = len(aln)

# Read aligned sequence(s):
aln.append(file='P5CDH.ali', align_codes='P5CDH')

# Structure sensitive variable gap penalty sequence-sequence alignment:
aln.salign(output='', max_gap_length=20,
           gap_function=True, # to use structure-dependent gap penalty
           alignment_type='PAIRWISE', align_block=aln_block,
           feature_weights=(1., 0., 0., 0., 0., 0.), overhang=0,
           gap_penalties_1d=(-450, 0),
           gap_penalties_2d=(0.35, 1.2, 0.9, 1.2, 0.6, 8.6, 1.2, 0., 0.),
           similarity_flag=True)

aln.write(file='P5CDH-mult.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='P5CDH-mult.pap', alignment_format='PAP')

```

## SCRIPT 3

```

from modeller import *
from modeller.automodel import *

env = environ()
a = automodel(env, alnfile='P5CDH-mult.ali',

knowns=('3V9GA', '3V9HA', '3V9IA', '3V9JA', '4IDSA', '4IDMA', '4IHIA', '4OE4A', '4O
E5A'), sequence='P5CDH')

```

```
a.starting_model = 1
a.ending_model = 100
a.make()
```

#### SCRIPT 4

```
from modeller import *
from modeller.scripts import complete_pdb

log.verbose() # request verbose output
env = environ()
env.libs.topology.read(file='${LIB}/top_heav.lib') # read topology
env.libs.parameters.read(file='${LIB}/par.lib') # read parameters

# Cria um Contador que vai trocar o numero do string
for i in range (1,101): # Numero de Modelos Que Tu Tem

    # Essa parte cria o nome certo do arquivo, pq o arquivo 9 nÃ£o Ã© o
string '9' e sim o string '009'
    # Entao aqui eu soh to colocando zeros onde precisa
    numero=str(i)
    if i < 10:
        nome='00'+numero
    else:
        if i < 100:
            nome='0'+numero
        else:
            nome='100'

    # Aqui ele cria o string que vai chamar o arquivo certo
    nomedomodelo='P5CDH.B99990'+nome+'.pdb'

    #read model file
    mdl = complete_pdb(env, nomedomodelo)

    # Assess all atoms with DOPE:
    s = selection(mdl)
    # Aqui ele cria o string com o nome do arquivo que salva
    nomequesalva='P5CDH'+nome+'.profile'

    s.assess_dope(output='ENERGY_PROFILE NO_REPORT', file=nomequesalva,
        normalize_profile=True, smoothing_window=15)
```

## 2. Ancoragem Molecular

Seguindo os procedimentos do tutorial (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012<sup>1</sup>), foram realizados os cálculos de ancoragem molecular. Os espaços de análise foram especificados após a determinação da raiz de giro de cada uma das moléculas. Uma vez tendo essas raízes determinadas, foram desenhados as delimitações do espaço de cálculo dos ligantes utilizando-se o programa AUTODOCK VINA, instalado como *plugin* do programa PyMol. Inicialmente os espaços de análise foram desenhados em torno das moléculas de NAD<sup>+</sup> e L-Glu de

<sup>1</sup> HUEY, R.; MORRIS, G.; FORLI, S. **Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial**. California: The Scripps Research Institute, 2012.

moléculas resolvidas e então aplicadas ao procedimento de ancoragem molecular. Abaixo encontram-se os arquivos do espaço de análise para cada uma das moléculas ligantes.

<b>Glumato</b>	<b>Ácido Glutâmico Semialdeído (GSA)</b>
receptor = P5CDH.pdbqt ligand = Glutamato.pdbqt  center_x = 22.23 center_y = 54.75 center_z = 72.09  size_x = 9 size_y = 6 size_z = 4  num_modes = 100 energy_range = 3 out = Model_GLU_3.pdbqt log = log_GLU_3.txt	receptor = P5CDH.pdbqt ligand = GSA.pdbqt  center_x = 22.23 center_y = 54.75 center_z = 72.09  size_x = 9 size_y = 6 size_z = 4  num_modes = 100 energy_range = 3 out = Model_GSA.pdbqt log = log_GSA.txt
<b>Dissulfiram</b>	<b>NAD<sup>+</sup></b>
receptor = P5CDH.pdbqt ligand = Dissulfiram.pdbqt  center_x = 20.33 center_y = 53.23 center_z = 72.74  size_x = 6 size_y = 6 size_z = 4  num_modes = 100 energy_range = 5 out = Model_Dissulfiram.pdbqt log = log_dissulfiram.txt	receptor = P5CDH.pdbqt ligand = NAD_1.pdbqt  center_x = 14 center_y = 47.75 center_z = 73.59  size_x = 18 size_y = 17 size_z = 15  num_modes = 100 energy_range = 3 out = Model_NAD.pdbqt log = log_NAD.txt

*num\_modes* é o número de poses que serão geradas durante o cálculo; *energy\_range* é o máximo de variação de energia permitida entre a pose de menor energia e as demais; *out* é o comando que gerará o arquivo .pdbqt com os resultados das poses para análise visual; *log* é o comando que gera o arquivo de resultados, com os valores de energia das poses calculadas.