



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

**CARACTERIZAÇÃO *in silico* DA FAMÍLIA DE FERREDOXINAS DO PARASITO
Trichomonas vaginalis E SUA INTERAÇÃO COM O METRONIDAZOL**

GEOVANA IMAD PACHECO

MACAÉ

Dezembro de 2022



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

GEOVANA IMAD PACHECO

**CARACTERIZAÇÃO *in silico* DA FAMÍLIA DE FERREDOXINAS DO PARASITO
Trichomonas vaginalis E SUA INTERAÇÃO COM O METRONIDAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia do Centro Multidisciplinar UFRJ – Campus Macaé como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: José Luciano Nepomuceno-Silva

Coorientador: Vitor Won-Held Rabelo

MACAÉ

Dezembro de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

P116

Pacheco, Geovana Imad

Caracterização in silico da família de Ferredoxinas do Parasito *Trichomonas vaginalis* e sua interação com o Metronidazol / Geovana Imad Pacheco - Macaé, 2022.

81 f.

Orientador(a): José Luciano Nepomuceno-Silva.

Coorientador(a): Vitor Won-Held Rabelo.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Metronidazol. 3. Ferredoxinas.
4. Modelagem Molecular. I. Nepomuceno-Silva, José Luciano orient.
II. Rabelo, Vitor Won-Held, coorient. III. Título.

CDD 615

GEOVANA IMAD PACHECO

CARACTERIZAÇÃO *in silico* DA FAMÍLIA DE FERREDOXINAS DO PARASITO
Trichomonas vaginalis E SUA INTERAÇÃO COM O METRONIDAZOL

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado como requisito para obtenção do título
de farmacêutico.

Macaé, 15 de dezembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno-Silva

UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/5911558459115933>

Profa. Dra. Ana Carolina da Silva Carvalho

UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4637564126071086>

Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro

UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/5103876509322346>

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me ajudado até aqui sempre me dando forças para alcançar meus objetivos e superar as dificuldades.

Aos meus pais, José Elias e Léia, pelo apoio, pelo amor e por sempre acreditarem na minha capacidade e nunca desistirem de mim. Toda a minha gratidão a eles por me sempre investirem e incentivarem meus estudos, me ensinando, com humildade e honestidade, a ser uma pessoa cada vez melhor.

Às minhas amigas, Carol Oliveira, Isabella Passaline, Mayara Souza e Nayara Cecche, por compartilharem comigo todas as emoções vividas na universidade. Obrigada por sempre estarem lá quando eu precisei, por todos os conselhos, pela confiança, carinho, pelos momentos alegres e principalmente pela amizade que vocês me deram durante todos esses anos.

Ao meu namorado, Lucas, pela paciência, compreensão e credibilidade. Obrigada pelo companheirismo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, José Luciano Nepomuceno da Silva, mais conhecido como Zé, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e por sempre me auxiliar quando eu precisei, contribuindo para a minha formação acadêmica. Obrigada por sempre ter sido paciente comigo.

À minha orientadora, Paula Abreu, por ter me aceitado como sua aluna tão rapidamente, mesmo já tendo muitos alunos. Obrigada pela dedicação do seu tempo e por sempre me aconselhar e colaborar seja em relação ao trabalho ou a faculdade.

Ao meu coorientador Vitor Rabelo que esteve disposto a tirar as minhas dúvidas a qualquer momento, sendo sempre muito paciente e atencioso. Obrigada por aceitar o compromisso de me ensinar e ajudar com esse trabalho.

À todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a minha formação acadêmica e para a conclusão deste trabalho.

Aos professores da banca por terem aceitado o convite.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Vista geral de *T. vaginalis* em três diferentes formas: (a) trofozoíto; (b) pseudocisto; (c) ameboides. A: axóstilo; AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recorrente com membrana ondulante; (Tv) aderido a uma célula epitelial vaginal humana (EC). **16**
- Figura 2:** Ciclo de vida do parasito *T. vaginalis*. 1: *T. vaginalis* reside no trato genital inferior feminino e na uretra e próstata masculina; 2: Proliferação do parasito através de mitose fechada e fissão binária; 3: Parasito não sobrevive bem no ambiente externo. *T. vaginalis* é transmitido através de relações sexuais entre humanos, seu único hospedeiro conhecido. **17**
- Figura 3:** Estrutura química dos 5-nitroimidazóis mais usados para o tratamento da tricomoníase. (a) metronidazol; (b) secnidazol; (c) tinidazol. **20**
- Figura 4:** Mapa esquemático das principais vias do metabolismo hidrogenossomal. Fd: ferredoxina; 1: Piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR); 2: acetato:succinato CoA transferase; 3: succinato tiokinase; 4: hidrogenase; 5: NAD(P) enzima málica; 6: NAD:ferredoxina oxidoreductase. **21**
- Figura 5:** Esquema da ativação do MTZ no hidrogenossomo. Assim que o MTZ entra no hidrogenossomo, os elétrons gerados pela PFOR são transportados pela Fd [2Fe-2S] para o medicamento e não para a hidrogenase (H), seu aceptor natural. Conseqüentemente, a redução do MTZ acontece enquanto a produção de hidrogênio molecular é interrompida. Os radicais citotóxicos formados (R-NO₂) são produtos intermediários da redução do MTZ. **22**
- Figura 6:** Estrutura da Fd1 de *T. vaginalis* (Código PDB 1L5P). As estruturas redondas em vermelho e verde representam o centro de ferro enxofre. As α -hélices estão representadas em vermelho e as folhas- β em verde. **25**
- Figura 7:** Reconstrução filogenética das proteínas da família das Fd [2Fe-2S] de organismos eucarióticos selecionados, a partir do método de *neighbor-joining*. As distâncias evolutivas foram calculadas com base na matriz JTT (*Jones, Taylor and Thornton*). Os valores de *bootstrap* para 1000 réplicas são mostrados em porcentagem, para cada nó. A árvore foi construída com deleção total de ambigüidades nas sequências pareadas, com um total de 519 posições constituindo o conjunto de dados analisados. A árvore está ilustrada em escala, com o comprimento dos ramos proporcional ao número de substituições por sítio. As Fd de Parabasalia estão destacadas nas caixas vermelhas. **41**
- Figura 8:** Reconstrução filogenética das proteínas da família das Fd [2Fe-2S] de organismos eucarióticos selecionados, a partir do método de máxima verossimilhança, com base no modelo WAG (*Whelan And Goldman*) e empregando distribuição gama para modelar as taxas de evolução entre os sítios, com permissão de sítios invariáveis. Os valores de *bootstrap* para 1000 réplicas são mostrados em porcentagem, para cada nó. A árvore foi construída com deleção parcial de lacunas, com um total de 83 posições constituindo o conjunto de dados analisados. A árvore está ilustrada em escala, com o comprimento dos ramos proporcional ao número de substituições por sítio. As Fd de Parabasalia estão destacadas nas caixas vermelhas. **42**

Figura 9: Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das Fd 1-7 de *T. vaginalis*. Os identificadores dos *loci* dos genes correspondentes no TrichDB estão entre parênteses. Asteriscos (*) indicam posições idênticas em todas as sequencias alinhadas; (:) e (.) indicam substituições conservativas em maior ou menor grau, respectivamente, nas sequências peptídicas; (-) indicam lacunas inseridas para otimizar o alinhamento. As cores no alinhamento indicam também o grau de conservação por posição ao longo do alinhamento múltiplo. As cisteínas de coordenação (CIS50, CIS56, CIS59 e CIS95 na Fd1) estão identificadas pelos pontos em vermelho. **44**

Figura 10: Análise estereoquímica dos modelos 3D das Fd de *T. vaginalis* por meio de gráficos de Ramachandran. (A) Molde Fd 1 (1L5P); (B) Modelo da Fd 2; (C) Modelo da Fd 3; (D) Modelo da Fd 4; (E) Modelo da Fd 5. Regiões mais favoráveis em vermelho; regiões adicionalmente permitidas em amarelo; regiões generosamente permitidas em bege; regiões desfavoráveis em branco. **47**

Figura 11: Análise estereoquímica dos modelos 3D (obtidos por *threading*) das Fd de *T. vaginalis* por meio de gráficos de Ramachandran. (A) Modelo da Fd 6; (B) Modelo da Fd 7. Regiões mais favoráveis em vermelho; regiões adicionalmente permitidas em amarelo; regiões generosamente permitidas em bege; regiões desfavoráveis em branco. **47**

Figura 12: Análise estereoquímica dos modelos 3D (obtidos por método de IA no programa *Alphafold2*) das Fd de *T. vaginalis* por meio de gráficos de Ramachandran. (A) Modelo da Fd 6; (B) Modelo da Fd 7. Regiões mais favoráveis em vermelho; regiões adicionalmente permitidas em amarelo; regiões generosamente permitidas em bege; regiões desfavoráveis em branco. **50**

Figura 13: Análise dos modelos 3D (obtidos por métodos comparativos) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos perfis do *score* 3D-1D. **51**

Figura 14: Análise dos modelos 3D (obtidos por método *threading*) das Fd 6 e 7 de *T. vaginalis* por meio dos Perfis do *score* 3D-1D. **51**

Figura 15: Análise dos modelos 3D (obtidos por método de IA no programa *Alphafold2*) das Fd 6 e 7 de *T. vaginalis* por meio dos Perfis do *score* 3D-1D **52**

Figura 16: Análise dos modelos 3D (obtidos por métodos comparativos) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de *score-Z* calculados no ProSA-web. (A) Molde Fd 1 (1L5P); (B) Modelo da Fd 2; (C) Modelo da Fd 3; (D) Modelo da Fd 4; (E) Modelo da Fd 5. Eixo x indica o valor de z-score e o eixo y indica a quantidade de resíduos de aminoácidos. A estrutura analisada está representada pelo ponto preto. **54**

Figura 17: Análise dos modelos 3D (obtidos por métodos comparativos) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de energia em função de cada resíduo calculados no ProSA-web. (A) Molde Fd 1 (1L5P); (B) Modelo da Fd 2; (C) Modelo da Fd 3; (D) Modelo da Fd 4; (E) Modelo da Fd 5. A linha em verde claro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento (ou janela) de 10 resíduos, enquanto a linha em verde escuro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos. **55**

Figura 18: Análise dos modelos 3D (obtidos por *threading*) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de *score-Z* (esquerda) e dos gráficos de energia em função de cada resíduo (direita) calculados no ProSA web. (A) para a Fd 6; (B) para a Fd 7. Gráfico de *score-Z*: Eixo x indica o valor de *score-z* e o eixo y indica a quantidade de resíduos de aminoácidos. A estrutura analisada está representada pelo ponto preto: A linha em verde claro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento (ou janela) de 10 resíduos, enquanto a linha em verde escuro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos. 56

Figura 19: Análise dos modelos 3D (obtidos por método de IA no programa *Alphafold2*) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de *score-Z* (esquerda) e dos gráficos de energia em função de cada resíduo (direita) calculados no ProSA web. (A) para a Fd 6; (B) para a Fd 7. Gráfico de *score-Z*: Eixo x indica o valor de *score-z* e o eixo y indica a quantidade de resíduos de aminoácidos. A estrutura analisada está representada pelo ponto preto. A linha em verde claro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento (ou janela) de 10 resíduos, enquanto a linha em verde escuro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos. 57

Figura 20: Estruturas 3D da Fd1 (código PDB 1L5P) e dos modelos das Fd 2-7 construídos. As setas apontam para a alça que envolve o centro Fe-S, sendo este representado pelas esferas laranja, para o ferro e amarela para o enxofre. As setas vermelhas indicam a regiões preditas como desordenadas. 58

Figura 21: Alinhamento das estruturas 3D da Fd1 (código PDB 1L5P) e dos modelos das Fd 2-7 de *T. vaginalis*. 59

Figura 22: Alinhamento das Fd 1-7 de *T. vaginalis* (obtidas por modelagem comparativa e pelo *AlphaFold2*) com foco no sítio ativo (centro [2Fe-2S]) e nas suas quatro cisteínas de coordenação. Fd1: Estrutura em verde; Fd2: Estrutura em azul ciano; Fd3: Estrutura em rosa; Fd4: Estrutura em amarelo; Fd5: Estrutura em rosa claro; Fd6: Estrutura em roxo; Fd7: Estrutura em azul. 61

Figura 23: Região do alinhamento múltiplo composta pelos resíduos de aminoácidos que formam a alça que cobre o centro [2Fe-2S] e suas diferenças entre as Fd 1-7. Pontos vermelhos indicam os resíduos de aminoácidos de início e fim da alça. 62

Figura 24: Mapa de potencial eletrostático das Fd 1-5 de *T. vaginalis*. (A) Molde 1L5P (Fd1); (B) Fd 2; (C) Fd 3; (D) Fd 4; (E) Fd 5.; (F) Fd 6; (G) Fd 7. Estrutura 3D mostrando as regiões α -hélices e folhas β acima e os mapas de potencial eletrostático abaixo da estrutura 3D das enzimas. Os mapas mostram as regiões positivas em azul, as regiões negativas em vermelho, e as regiões neutras em branco. A região do sítio catalítico está destacada em amarelo. A faixa de variação usada foi de -10 a 10. 63

Figura 25: Imagem mostrando o modo de ligação previsto do MTZ. Em verde as poses do MTN nas Fd. Nas imagens à esquerda, os átomos de ferro do centro [2Fe-2S] estão representados pelas esferas laranja e o átomo de Fe1 está indicado pela seta vermelha. Os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas. Nas imagens à direita, as ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em rosa (esquerda) e verde 64

escuro (direita). Resíduos com interações do tipo Van der Walls estão representados em verde claro. Parte 1

Figura 25: Imagem mostrando o modo de ligação previsto do MTZ. Em verde as poses do MTN nas Fd. Nas imagens à esquerda, os átomos de ferro do centro [2Fe-2S] estão representados pelas esferas laranja e o átomo de Fe1 está indicado pela seta vermelha. Os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas. Nas imagens à direita, as ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em rosa (esquerda) e verde escuro (direita). Resíduos com interações do tipo Van der Walls estão representados em verde claro. Parte 2 **65**

Figura 25: Imagem mostrando o modo de ligação previsto do MTZ. Em verde as poses do MTN nas Fd. Nas imagens à esquerda, os átomos de ferro do centro [2Fe-2S] estão representados pelas esferas laranja e o átomo de Fe1 está indicado pela seta vermelha. Os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas. Nas imagens à direita, as ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em rosa (esquerda) e verde escuro (direita). Resíduos com interações do tipo Van der Walls estão representados em verde claro. Parte 3 **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz de identidade/similaridade entre as Fd 1-7 de <i>T. vaginalis</i>	45
Tabela 2: Resultado da comparação de identidade e similaridade entre a Fd1 (código PDB 1L5P) e as seis demais Fd de <i>T. vaginalis</i> .	45
Tabela 3: Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran do molde e das Fd 2-7	48
Tabela 4: Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran das Fd 6 e Fd 7, obtidas por <i>threading</i> .	48
Tabela 5: Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran das Fd 6 e 7 obtidas pelo programa <i>AlphaFold2</i> .	49
Tabela 6: Percentual dos resíduos de aminoácidos do molde 1L5P (Fd1) e das Fd 2-7 de <i>T. vaginalis</i> com <i>score</i> 3D-1D maior ou igual a 0,2.	51
Tabela 7: Percentual dos resíduos de aminoácidos dos modelos obtidos por <i>threading</i> das Fd 6 e 7 de <i>T. vaginalis</i> com <i>score</i> 3D-1D maior ou igual a 0,2	52
Tabela 8: Percentual dos resíduos de aminoácidos dos modelos obtidos pelo programa <i>AlphaFold2</i> das Fd 6 e 7 de <i>T. vaginalis</i> com <i>score</i> 3D-1D maior ou igual a 0,2	52
Tabela 9: Valores de RMSD calculados a partir a sobreposição das estruturas 3D do modelo com o molde 1L5P utilizando o programa PyMOL.	59
Tabela 10: Matriz de RMDS entre as Fd 1-7 de <i>T. vaginalis</i>	60
Tabela 11: Distância entre o grupo nitro do MTZ e o átomo de Fe1 do centro [2Fe-2S] e suas respectivas energias de ligação.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Identificação das Fd 1-7 de *T. vaginalis*.

38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

3D	<i>Three Dimensional</i> , tridimensional
APBS	<i>adaptative Poisson-Bultzmann solver</i>
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fd	Ferredoxina
Fd 1	Ferredoxina 1
Fd 2	Ferredoxina 2
Fd 3	Ferredoxina 3
Fd 4	Ferredoxina 4
Fd 5	Ferredoxina 5
Fd 6	Ferredoxina 6
Fd 7	Ferredoxina 7
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IA	Inteligência artificial
IST	Infecção sexualmente transmissível
MEGA X	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis X</i>
MTZ	Metronidazol
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i> , Banco de Dados de Proteínas
PFOR	Piruvato ferredoxina oxidoreductase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> , desvio médio da raiz quadrada
RNA	Ácido ribonucleico
SPDBV	<i>Swiss PDB Viewer</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Características gerais do parasito <i>T. vaginalis</i>	16
1.2 Epidemiologia	18
1.3 Fisiopatologia da tricomoníase	18
1.4 Tratamento	19
1.5 Metabolismo hidrogenossomal	21
1.6 Ativação do metronidazol	22
1.7 Resistência aeróbica e anaeróbica	23
1.8 As Ferredoxinas	24
1.9 Características estruturais da ferredoxina 1 de <i>T. vaginalis</i>	25
1.10 Localização	26
1.11 Modelagem molecular	27
1.11.1 Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1 Identificação das proteínas pertencentes à família de ferredoxinas de <i>T. vaginalis</i>	33
4.2 Filogenia molecular	33
4.3 Construção dos modelos tridimensionais das ferredoxinas de 2-7 de <i>T. vaginalis</i>	34
4.4 Validação dos modelos obtidos para as ferredoxinas de 2-7 de <i>T. vaginalis</i> .	36
4.5 <i>Docking</i> molecular	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Identificação da família de ferredoxinas de <i>T. vaginalis</i>	38

5.2 Análises filogenéticas	39
5.3 Análise comparativa das sequências de aminoácidos das ferredoxinas de <i>T. vaginalis</i>.....	43
5.4 Predição da estrutura 3D das ferredoxinas de <i>T. vaginalis</i>.....	46
5.4.1 Análise da qualidade estereoquímica dos modelos	46
5.4.2 Análise da compatibilidade 3D-1D dos modelos	50
5.4.3 Análise da qualidade energética dos modelos.....	53
5.5 Análise das características estruturais dos modelos 3D das Fd 2-7 de <i>T. vaginalis</i>.....	58
5.6 <i>Docking</i> molecular e avaliação das interações do metronidazol com as ferredoxinas 1-7 de <i>T.vaginalis</i>	64
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

O parasito *Trichomonas vaginalis* é o agente etiológico da tricomoníase em seres humanos, uma infecção sexualmente transmissível. *T. vaginalis* possui uma organela, o hidrogenossomo, que participa do metabolismo energético do parasito e está diretamente envolvido na ativação do metronidazol (MTZ), principal pró-fármaco usado no tratamento da doença. Contudo, a emergência de cepas resistentes a esse fármaco é preocupante e pode estar associada com alterações na expressão das ferredoxinas (Fd), proteínas que participam de reações de oxirredução e possuem centros de ferro-enxofre em sua estrutura, sendo apontadas como responsáveis pela ativação do MTZ. A análise do genoma do *T. vaginalis* indica a existência de sete genes que codificam Fd, porém, a maioria dos estudos focam em uma única Fd (Fd1). O objetivo deste trabalho é investigar *in silico* as características estruturais da família de Fd de *T. vaginalis* e suas interações moleculares com o MTZ. As sequências das Fd de *T. vaginalis* foram obtidas nos bancos *NCBI* e *TrichDB*. Análises filogenéticas foram realizadas pelo método de máxima verossimilhança e *neighbor-joining*. Foram construídos modelos tridimensionais por modelagem comparativa das Fd 2, 3, 4, 5, 6 e 7, usando como molde a Fd1 de *T. vaginalis* (código PDB 1L5P), no servidor *Swiss-Model* e também pela técnica de *threading* e pelo sistema *AlphaFold2*. A validação dos modelos foi realizada a partir de análises do gráfico de *Ramachandran* no *Procheck*, *score 3D-1D* no *Verify-3D* e *score-Z* no *ProSA-web*. A interação dessas proteínas com o MTZ foi investigada por *docking* molecular com o programa *AutoDock 4.2.6*. As sequências das sete Fd codificadas pelo genoma de *T. vaginalis* foram identificadas e as análises filogenéticas mostraram que as Fd de 2 a 6 divergiram por duplicação a partir de um ancestral comum na base do Parabasalia, enquanto a Fd7 não está diretamente relacionada às demais Fd. As Fd de *T. vaginalis* apresentam graus de identidade com a Fd 1 que variam de 22% com a Fd7 a 69% com a Fd2. A distribuição dos resíduos de aminoácidos dos modelos nos gráficos de *Ramachandran* revelou que mais de 90% dos resíduos estavam em regiões favoráveis, indicando boa qualidade estereoquímica. Já a análise do *score 3D-1D* mostrou compatibilidade entre as estruturas 1D e 3D. Os modelos também apresentaram boa qualidade energética de acordo com o *score-Z*. Nas análises de *docking* molecular, o MTZ apresentou orientações e conformações diferentes, porém favoráveis nas Fd, se ligando à superfície das proteínas, próximo ao centro [2Fe-2S], porém, não houve interações diretas entre o grupo nitro do MTZ e o ferro do centro [2Fe-2S]. Relatos na literatura mostram a presença de uma alça que envolve o centro [2Fe-2S]. Dependendo do estado oxidativo do ferro, acredita-se que ela pode se deslocar, permitindo a aproximação direta entre o MTZ e o ferro do centro [2Fe-2S]. Entretanto, existem hipóteses na literatura de que essa interação aconteça por rotas de transferências de elétrons através de diferentes resíduos da proteína. Dessa maneira, estudos de dinâmica molecular com as Fd de *T. vaginalis* em complexo com o MTZ serão investigados futuramente.

Palavras-chave: Ferredoxinas, *Trichomonas vaginalis*, Metronidazol, Hidrogenossomo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do parasito *Trichomonas vaginalis*

O parasito *Trichomonas vaginalis* pertence a um grupo de flagelados classificados no táxon Parabasalia, família Trichomonadidae, e foi descrito pela primeira vez por Alfred François Donné, em 1836 (LOPES, 2018). *T. vaginalis* é um parasito eucarioto unicelular que se reproduz por fissão binária. Os trofozoítos de *T. vaginalis* apresentam quatro flagelos anteriores e um flagelo recorrente associado a uma especialização da membrana celular formando a membrana ondulante. Esse parasito é um organismo anaeróbio, mas também pode ser considerado microaerófilo, uma vez que possui meios bioquímicos que o permitem tolerar baixas quantidades de oxigênio. O metabolismo dos carboidratos apresenta uma etapa no citoplasma e outra no hidrogenossomo, sendo neste segundo a principal para a sua produção de energia (DIAZ; RIAÑO, 2008; LOPES, 2018; ROBERTS et al., 2013).

Esse parasito é comumente encontrado na forma de trofozoíto flagelado, porém existem outros dois estágios que já foram bem descritos, o pseudocisto e o ameboide (Figura 1). Estudos mostram que a forma ativa, móvel e mais infecciosa é o trofozoíto, enquanto a forma caracterizada pelo aumento da superfície de contato com as células epiteliais é a forma ameboide (BERI et al., 2020). Outros estudos mostraram a existência de pseudocistos, que são descritos como uma forma compacta, imóvel, arredondada e normalmente com flagelos internalizados, que parece estar associada à sobrevivência do parasito em condições mais inóspitas (AFZAN e SURESH, 2012; BERI et al., 2020).

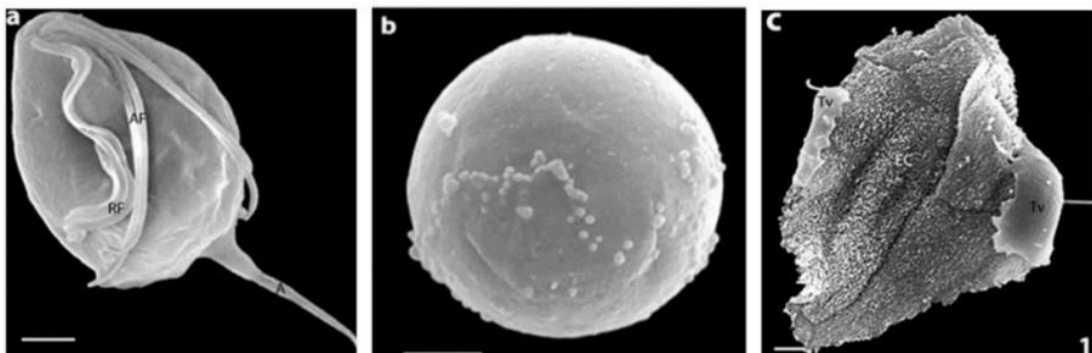


Figura 1 - Vista geral de *T. vaginalis* em três diferentes formas: (a) trofozoíto; (b) pseudocisto; (c) ameboides. A: axóstilo; AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recorrente com membrana ondulante; (Tv) aderido a uma célula epitelial vaginal humana (EC). BENCHIMOL, 2008, p.873.

Essa espécie é a causadora da tricomoníase em seres humanos, considerada a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) não viral mais comum no mundo. A tricomoníase pode estar

associada com vaginite, endometrite, uretrite, doença inflamatória pélvica atípica, eventos adversos durante a gestação e complicações no nascimento (SILVA, 2020; SWYGARD et al., 2004).

O ciclo de vida do *T. vaginalis* (Figura 2) pode ser entendido através da transmissão que ocorre pela relação sexual, levando a uma alta ocorrência de infecção na região do canal vaginal e da uretra e/ou próstata de mulheres e homens, respectivamente. O tempo de incubação do parasito pode variar entre 4 e 28 dias e, após esse período, cerca de 50% das mulheres apresentam sintomas em até seis meses, sendo os mais comuns a inflamação e irritação da mucosa genital, corrimento com odor forte e desagradável, além de dores e dificuldade ao urinar. Já os indivíduos infectados e assintomáticos, além de aumentar o risco de infecção e reinfecção dos parceiros sexuais, também correm o risco de aumentar a possibilidade de transmissão/infecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LOPES, 2018).

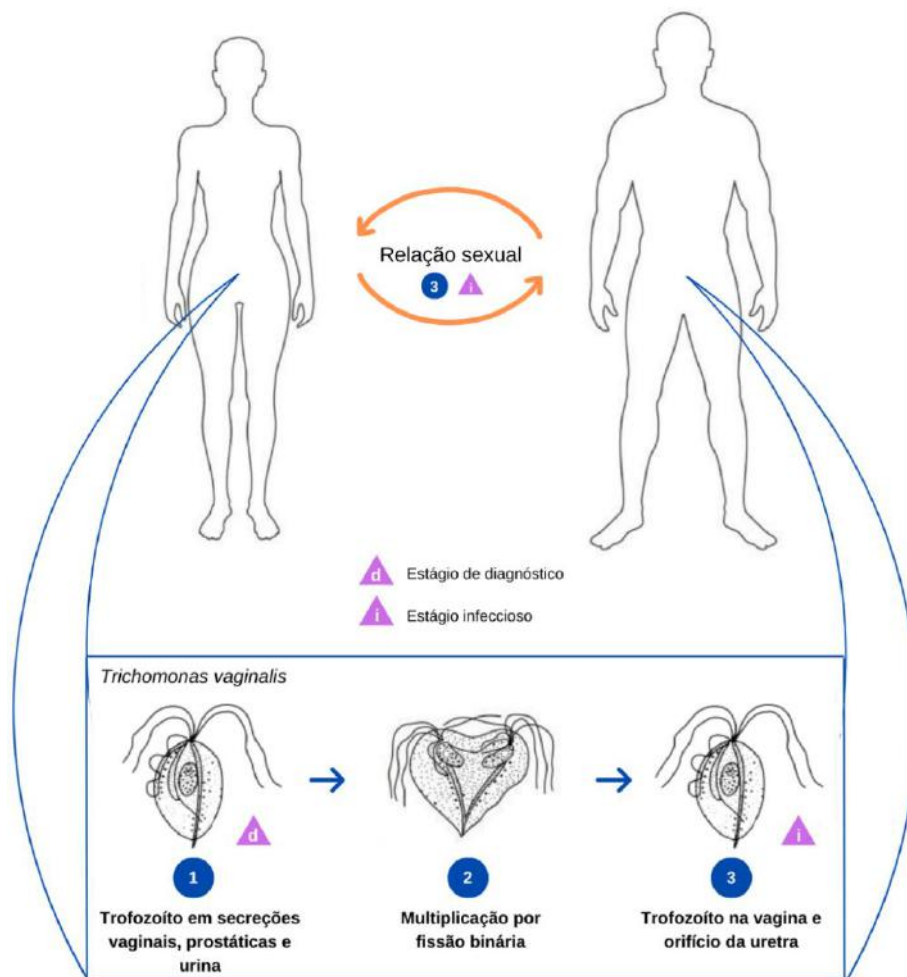


Figura 2 - Ciclo de vida do parasito *T. vaginalis*. 1: *T. vaginalis* reside no trato genital inferior feminino e na uretra e próstata masculina; 2: Proliferação do parasito através de mitose fechada e fissão binária; 3: Parasito não sobrevive bem no ambiente externo. *T vaginalis* é transmitido através de relações sexuais entre humanos, seu único hospedeiro conhecido. Adaptado de CDC – Trichomoniasis, 2022.

1.2 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 2008, que a incidência mundial da tricomoníase era cerca de 276 milhões de casos por ano, com uma prevalência de 187 milhões de indivíduos infectados (LOPES, 2018; SILVA, 2022). Mais especificamente no Brasil, a prevalência de infecção variou entre 10% e 35%, dependendo da população sob estudo. O Ministério da Saúde estima que a incidência no Brasil seja de 4,3 milhões de novos casos por ano (LEWIS, 2014; LIMA *et al.*, 2019; LOPES, 2018).

Entretanto, esses dados não refletem verdadeiramente a realidade do país, uma vez que a notificação da tricomoníase não é obrigatória e uma porcentagem considerável dos infectados são assintomáticos. Assim, o número real de casos pode ser ainda maior dos que os divulgados oficialmente (LOPES, 2018).

Já é bem estabelecida a importância do contato sexual para a transmissão da tricomoníase, sendo que a alta frequência de casos assintomáticos contribui diretamente para a disseminação da infecção (LOPES, 2018). Além disso, a tricomoníase também pode ser transmitida verticalmente, de mães infectadas para bebês (LEWIS, 2018). Posto isto, o uso de preservativos e o tratamento, tanto do indivíduo infectado sintomático quanto do parceiro, são fundamentais para evitar os casos de persistência e reinfecções parasitárias (LEWIS, 2018; LOPES, 2018).

1.3 Fisiopatologia da tricomoníase

O *T. vaginalis* é um parasito sexualmente transmissível e a infecção na mulher ocorre normalmente a partir do contato desprotegido com parceiros infectados. Esses parasitos penetram na vagina e se aderem fortemente às células epiteliais através de diversas adesinas primárias de superfície dependentes de ferro, como as AP23, AP33, AP51, AP65 e AP120. Com exceção da AP51, os genes que codificam essas proteínas são todos transcricionalmente regulados pela presença de ferro (EDWARDS *et al.*, 2016). A ejaculação promove um aumento transiente do pH vaginal, desfavorecendo a presença dos lactobacilos, que são bactérias protetoras, e assim, promovendo a infecção pelo parasito. Quando em contato com as células epiteliais, os trofozoítos tipicamente ovoides de *T. vaginalis* se diferenciam em um estágio ameboide flagelado, permitindo que o parasito aumente a área de superfície de contato com o epitélio do hospedeiro e aumentando sua citotoxicidade (GOMES *et al.*, 2021).

A contar disso, uma resposta imune com intensa infiltração de leucócitos ocorre, e a interação do *T. vaginalis* com esses leucócitos promove a formação de pseudópodes pelo

parasito, que vão favorecer a internalização e a degradação das células imunes nos vacúolos fagocíticos do parasito. Além disso, o dano ao epitélio e a citotoxicidade também são causados devido à apoptose das células epiteliais, mediada pela liberação de enzimas cisteíno-proteases, como a CP30, fator de descamação celular (*cell-detaching factor* - CDF) e glicosidases (EDWARDS et al., 2016; GOMES et al., 2021).

A infecção por *T. vaginalis* é presente quando se observa corrimento vaginal amarelo esverdeado aderente às paredes vaginais, por vezes acompanhado de pequenas bolhas, com hiperemia das paredes vaginais e ectocérvice. O pH vaginal encontra-se maior do que 4,5, podendo apresentar resultado positivo para o teste de aminas (*whiff test*), indicando a produção de aminas voláteis que causam o odor desagradável (ALVES, 2006; LINHARES et al., 2019). No entanto, outros sintomas como dispareunia, prurido ou eritema vulvar, também podem ser apresentados (SCHUMANN; PLASNER, 2022).

Em relação à ocorrência da tricomoníase durante a gravidez, vulvovaginites são queixas frequentes durante o pré-natal, e foi relatada a existência de uma associação entre a tricomoníase e o parto prematuro, o baixo peso ao nascer, a ocorrência de endometrite pós-parto e a morte neonatal. Já em homens, quando sintomático, esse parasito pode permanecer por períodos mais longos no trato urogenital gerando a uretrite, sintoma mais comum. Incluindo a esses sintomas, *T. vaginalis* também pode progredir para a próstata, induzindo uma resposta imune inflamatória e prostatite crônica, bem como pode estar associado ao câncer de próstata e infertilidade (ALVES, 2006; QUINTAS-GRANADOS, et al., 2013; SCHUMANN; PLASNER, 2022).

Além disso, uma outra preocupação é a relação bidirecional entre a infecção por *T. vaginalis* e a infecção pelo HIV. Na tricomoníase, devido as lesões provocadas na mucosa do trato urogenital e a intensa resposta imune do hospedeiro no local da infecção, ocorre um aumento na suscetibilidade a outros agentes patogênicos, principalmente o HIV, que infecta principalmente linfócitos T CD4⁺ humanos. Além disso, pessoas já infectadas com HIV também se tornam mais suscetíveis à infecção por *T. vaginalis* (BRUNI, 2018).

1.4 Tratamento

Durante décadas, o metronidazol (MTZ), 1-(β -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (Figura 3), tem sido o fármaco de escolha para o tratamento para a tricomoníase, devido ao seu baixo custo. Todavia, outros fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis também são usados, como o tinidazol e o secnidazol (Figura 3) (GOMES et al., 2021).

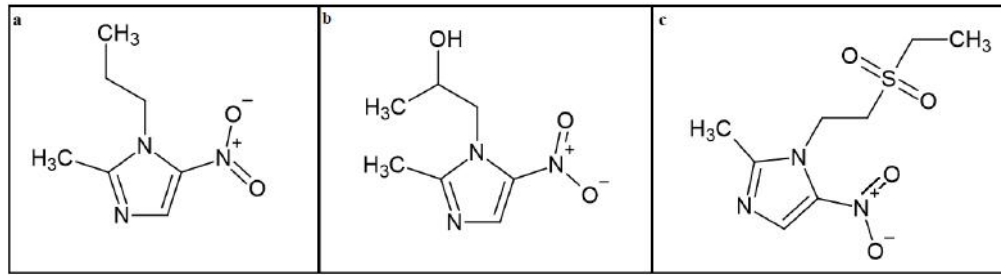


Figura 3 – Estrutura química dos 5-nitroimidazóis mais usados para o tratamento da tricomoníase. (a) metronidazol; (b) secnidazol; (c) tinidazol.

O MTZ foi sintetizado primeiramente em 1957 a partir da azomicina, uma substância descoberta em um extrato da bactéria *Streptomyces* 6670, e dessa maneira, acabou se tornando um agente muito efetivo no tratamento de infecções causada por diversos organismos de metabolismo anaeróbico, como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *T. vaginalis*, entre outros (FERNANDES *et al.*, 2021).

O MTZ é um pró-fármaco derivado nitroimidazólico da classe das substâncias antimicrobianas nitroheterocíclicas. A reatividade dos nitroimidazóis é influenciada principalmente pela sua capacidade de se aproximar de centros [2Fe-2S] presentes em enzimas que realizam reações de oxirredução, sendo essa reatividade correlacionada à sua citotoxicidade para *T. vaginalis* (VIDAKOVIC *et al.*, 2003).

O tratamento padrão para tricomoníase pode ser feito em doses de 250 mg de MTZ, via oral, duas vezes por dia, durante um período de sete dias. Em alternativa, o tratamento pode ser feito a partir da administração de dose única oral de 2 g deste medicamento. Todavia, existem outros regimes de tratamento utilizando o tinidazol 2 g ou o secnidazol 2 g por via oral, em dose única (BRAVO *et al.*, 2010; MACHADO; SOUZA, 2012; BRASIL, 2022). Dentre essas opções, o esquema terapêutico de dose única é mais empregado na saúde pública atualmente, pois muitos pacientes não completam o tratamento recomendado de sete dias. Porém, esse esquema mais prolongado é o que apresenta a melhor taxa de sucesso clínico e microbiológico (BRAVO *et al.*, 2010).

Apesar da eficácia do tratamento, o uso de 5-nitroimidazóis pode causar uma série de efeitos adversos, como erupções cutâneas, prurido, febre e urticária. Mesmo assim, essa classe de fármacos é a única atualmente aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da tricomoníase (CAVALCANTI, 2018). Além disso, a baixa adesão ao tratamento, juntamente com a existência de pacientes refratários, favorece o surgimento tanto de reinfecções, quanto da resistência ao MTZ (LEWIS, 2014). Por isso, é crucial o estudo de novos

alvos terapêuticos e fármacos para o tratamento da tricomoníase bem como a melhor compreensão dos mecanismos de resistência.

1.5 Metabolismo hidrogenossomal

Uma característica desses parasitos é que as mitocôndrias convencionais, encontradas em eucariotos de metabolismo aeróbico, são substituídas por uma outra organela com dupla membrana, chamada hidrogenossomo. A principal função do hidrogenossomo é a descarboxilação oxidativa do piruvato através de uma via que está acoplada com a produção de ATP, sendo um meio de produção de energia muito importante para esse parasito. Acetato, H_2 e CO_2 são os subprodutos do metabolismo hidrogenossomal (Figura 4) (KULDA, 1999). Apesar de possuir muitas características metabólicas distintas das mitocôndrias, os hidrogenossomos são evolutivamente relacionados à essas organelas, sendo uma forma de adaptação evolutiva à ambientes anaeróbicos, onde a produção de ATP associada ao consumo de O_2 não pode ocorrer (KULDA, 1999; MAKIUCHI; NOZAKI, 2014).

A principal enzima envolvida no metabolismo hidrogenossomal (Figura 4) é a piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR), uma enzima contendo grupamentos de ferro-enxofre e que oxida o piruvato para formar acetil-CoA. A fração CoA do acetil-CoA formado é transferida para o succinato pela enzima succinato CoA transferase formando succinil-CoA, e o acetato é então liberado como subproduto do metabolismo peroxissomal. O succinil-CoA é usado como substrato para a produção de ATP, e a enzima que catalisa essa reação é a tioquinase succinase (KULDA, 1999; ROBERTS et al., 2013).

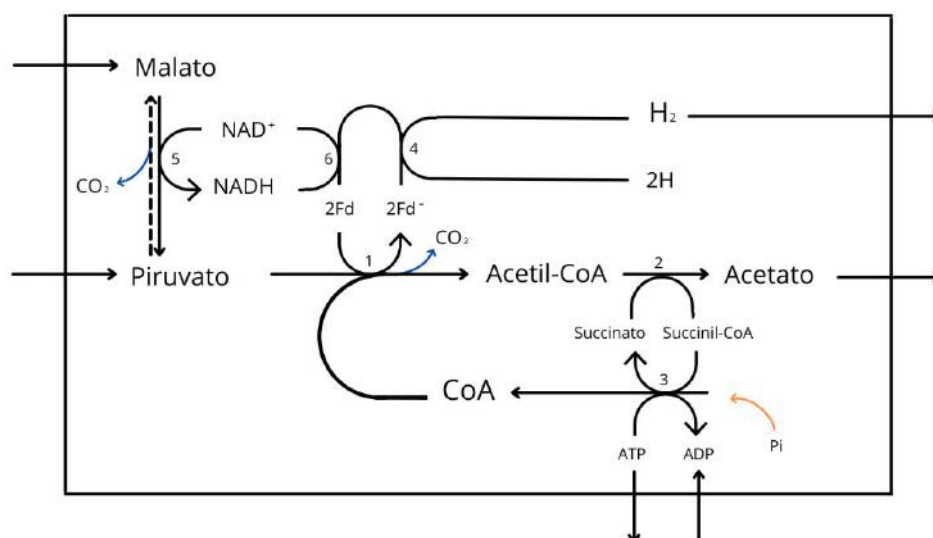


Figura 4 - Mapa esquemático das principais vias do metabolismo hidrogenossomal. Fd: ferredoxina; 1: Piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR); 2: acetato:succinato CoA transferase; 3: succinato tiokinase; 4: hidrogenase; 5: NAD(P) enzima málica; 6: NAD:ferredoxina oxidoreductase. Adaptado de KULDA, 1999.

Durante esse processo, elétrons são liberados e transportados por outra enzima, que também contém grupamentos de ferro-enzofre, a [2Fe-2S] ferredoxina (Fd), uma enzima transportadora de elétrons de baixo potencial redox, transfere o elétron para a [Fe]-hidrogenase, uma enzima terminal que acopla os elétrons aos íons hidrogênicos para formar o hidrogênio molecular, H_2 (Figura 4) (BENCHIMOL, 2008; KULDA, 1999).

Os hidrogenossomos de *T. vaginalis* também metabolizam malato em piruvato, a partir de uma reação de descarboxilação que é catalisada pela enzima málica dependente de NAD^+ . Já a reoxidação do NADH é mediada pela enzima NAD^+ ferredoxina oxidoreductase (Figura 4) (KULDA, 1999).

1.6 Relação do metabolismo hidrogenossomal e a ativação do metronidazol

A ativação do MTZ depende da sua redução metabólica dentro da célula-alvo, resultando na liberação de radicais livres citotóxicos. De modo mais exato, quando o fármaco é transportado para o hidrogenossomo, ele atua comoceptor preferencial dos elétrons transportados pela proteína Fd impedindo assim a redução da hidrogenase e a formação do hidrogênio molecular (Figura 5). Além disso, a transferência de um único elétron para o MTZ já é suficiente para formar um radical aniônico nitro altamente reativo ($\dot{N}O_2^-$), que, através de mecanismos de oxidação, podem afetar o DNA e possivelmente outras biomoléculas vitais, causando danos severos que levam à morte desse parasito (KULDA, 1999; SILVA 2002).

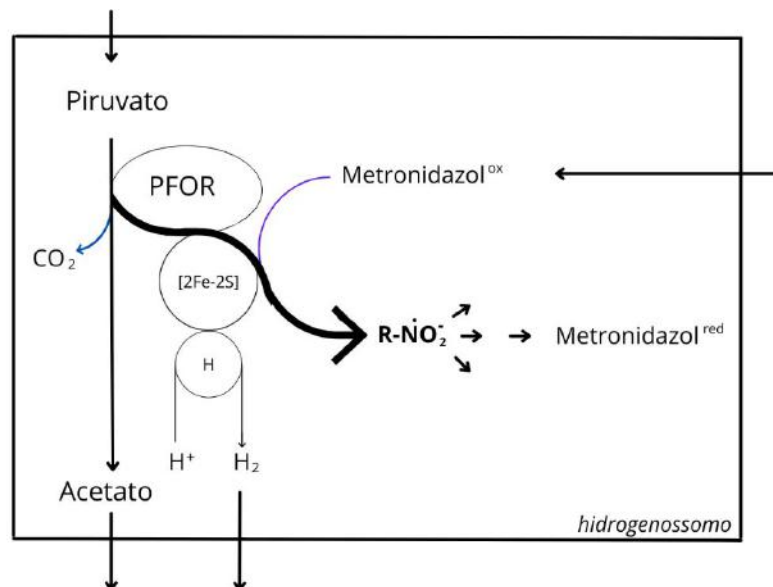


Figura 5 - Esquema da ativação do MTZ no hidrogenossomo. Assim que o MTZ entra no hidrogenossomo, os elétrons gerados pela PFOR são transportados pela Fd [2Fe-2S] para o medicamento e não para a hidrogenase (H), seu receptor natural. Conseqüentemente, a redução do MTZ acontece enquanto a produção de hidrogênio molecular é interrompida. Os radicais citotóxicos formados ($R-NO_2$) são produtos intermediários da redução do MTZ. Adaptado de KULDA, 1999.

Como resultado da oxidação do DNA por esses radicais, ocorre a liberação do fosfato de timidina, causando a ruptura e consequente dano da dupla hélice do ácido nucleico. Esse mecanismo de ação não ocorre de forma aleatória, ele depende da composição de bases do DNA e essa composição é importante porque os nitroimidazóis em geral são mais eficazes em organismos que possuem uma quantidade maior de adenina e timina (A+T) no DNA. Como o *T. vaginalis* possui um conteúdo de aproximadamente 67,3% de A+T, sua resposta ao MTZ é rápida, ocorrendo a morte dos microrganismos em cerca de 5 horas (ALVES, 2006; LASCALEA, 1998).

1.7 Mecanismos de resistência ao metronidazol

Um dos problemas do tratamento da tricomoníase consiste na emergência de parasitos resistentes ao fármaco de primeira escolha MTZ. Duas formas principais de resistência foram descritas: a resistência aeróbica, que é a forma mais comumente observada e a resistência anaeróbica (GRAVES et al., 2020; KULDA, 1999).

A resistência aeróbica acontece quando há a presença de O₂ no microambiente onde o parasito vive, de modo que o aumento na sua concentração intracelular pode interferir na ativação do MTZ. Mais especificamente, essa resistência ocorre devido a uma deficiência associada aos mecanismos de eliminação do oxigênio da via de defesa antioxidante. Enzimas pertencentes a essa via perdem parcialmente ou completamente sua atividade, aumentando os níveis intracelulares de O₂. Esse aumento intracelular pode interferir na ativação do MTZ através de dois mecanismos: possível oxidação dos radicais nitro e a competição pelo elétron livre gerado pela enzima PFOR. (GRAVES et al., 2020; KULDA, 1999).

Já a resistência anaeróbica acontece devido a eliminação da via de ativação do MTZ, evitando sua redução e assim sua ação contra o parasito. Quando se verifica entre 50-65% de redução da expressão da Fd a linhagem de *T. vaginalis* já pode ser considerado resistente (KULDA, 1999; MARQUES-SILVA et al., 2021; QUON et al., 1992).

A proteína hidrogenossomal Fd é considerada o doador de elétrons proximal do MTZ *in vivo* em *T. vaginalis*, e sua expressão diminuída é um mecanismo comum de resistência aos agentes antimicrobianos nitroimidazóis (LAND et al., 2004; QUON; D'OLIVEIRA; JOHNSON, 1992; VIDAKOVIC et al., 2003).

Em 1990, Johnson e colaboradores, clonaram e analisaram a sequência da Fd de *T. vaginalis* pela primeira vez. Posteriormente, Quon, D'Oliveira e Johnson (1992) testaram se células resistentes de *T. vaginalis* possuíam níveis reduzidos de mRNA de ferredoxina 1 (Fd1) no estado estacionário e, consistente com os níveis da proteína, verificaram que o mRNA dessa

Fd era também reduzido. Em linhagens de *T. vaginalis* resistentes ao MTZ, os níveis intracelulares reduzidos de Fd e seu mRNA são acompanhados por uma diminuição na transcrição do gene da Fd sugerindo que essa regulação na transcrição gênica tenha um papel importante no desenvolvimento da resistência. Além disso, também já foi observado que ao menos algumas cepas de *T. vaginalis* resistentes a MTZ têm pouca atividade detectável de PFOR, da enzima málica e da NADH desidrogenase, além de não expressar a Fd1 em níveis detectáveis (HRDÝ et al., 2005; QUON; D'OLIVEIRA; JOHNSON, 1992).

Por outro lado, através da técnica de substituição de genes homólogos feita por Land e colaboradores, foi possível testar o efeito da perda de um gene na suscetibilidade ao metronidazol, e esses estudos mostraram que o papel da Fd na ativação do MTZ é questionável, uma vez descoberto que o nocaute gênico dessa enzima não confere resistência ao MTZ em *T. vaginalis*, o que sugere a presença de outras Fd neste parasito (HRDÝ et al., 2005; LAND et al., 2004).

1.8 Ferredoxinas: proteínas chave para a ação antiparasitária do metronidazol

Ferredoxina é o nome utilizado para se referir a um grupo de proteínas que contém centros de ferro-enxofre, que constituem centros polimetálicos que possuem íons sulfeto e íons ferro em um arranjo geométrico bem específico. Essas proteínas, em sua maioria, são pequenas, solúveis e apresentam baixos potenciais redox, funcionando como transportadores de elétrons em diversas vias metabólicas de plantas, algas, eucariotos unicelulares, animais e bactérias. Dependendo do número e da organização desses átomos de ferro e enxofre no centro, as Fd podem ser classificadas em três famílias: [2Fe-2S], [4Fe-4S] e [3Fe-4S] (RODRIGUES, 1999; BODEK; BLUM, 2013).

A família das Fd [2Fe-2S] é composta por proteínas ácidas de aproximadamente 11 a 15 kDa que contém um centro [2Fe-2S] por molécula e podem ser encontradas em dois estados redox, o oxidado [2Fe-2S]²⁺, que é caracterizado por dois átomos de Fe⁺³, e o reduzido [2Fe-2S]¹⁺, com um átomo de Fe⁺³ e outro de Fe⁺² (BODEK; BLUM, 2013).

Além disso, podem também ser classificadas em duas subfamílias de Fd: aquelas descritas em mitocôndrias, em animais, arqueias halófilas e bactérias, comumente chamadas de adrenoxinas, e as de plantas, como a ferredoxina isolada dos cloroplastos de espinafre, por exemplo. Já as famílias de Fd [4Fe-4S] e [3Fe-4S], diferentes do primeiro grupo descrito, podem conter um ou dois centros [4Fe-4S] ou [3Fe-4S] e podem ser estabilizados nos estados de oxidação [3Fe-4S]¹⁺ e [3Fe-4S]⁰ para o tipo [3Fe-4S] e nos estados de oxidação [4Fe-4S]³⁺, [4Fe-4S]²⁺, [4Fe-4S]¹⁺ e [4Fe-4S]⁰ para o tipo [4Fe-4S] (BODEK; BLUM, 2013; HEIS, 2011;

RODRIGUES, 1999), sendo esses tipos comumente encontrados em bactérias como *Azotobacter vinelandii* e *Desulfovibrio gigas* (FUKUYAMA, et al., 1989).

A Fd mais estudada em *T. vaginalis*, a ferredoxina 1 (Fd1), pertence à família das Fd [2Fe-2S]. Seu papel na ativação do MTZ é conhecido desde 1985. Todavia, o genoma do *T. vaginalis* foi completamente sequenciado em 2007, e sua análise indicou que existam, pelo menos, sete genes distintos que codificam Fd neste parasito (CARLTON et al., 2007). Atualmente, os estudos feitos sobre a estrutura e função das Fd de *T. vaginalis* estão focados na proteína Fd1, que está localizada no hidrogenossomo (BARROS, 2013; CROSSNOE et al., 2002).

1.9 Características estruturais da Ferredoxina 1 de *T. vaginalis*

A Fd1 (código PDB 1L5P) de *T. vaginalis* é uma proteína monomérica de 93 resíduos e 9,8 kD, e sua estrutura tridimensional (3D) foi elucidada experimentalmente por Crossnoe e colaboradores, em 2002. Suas características estruturais mais proeminentes são sete folha- β , três α -hélices e o centro [2Fe-2S] (Figura 6). Este centro [2Fe-2S] está ligado aos grupos tiol presentes nas cadeias laterais de quatro resíduos de cisteína conservados (CIS38, CIS44, CIS47 e CIS78) (CROSSNOE et al., 2002; LIU; GERMANAS, 1998; WEKSBERG et al., 2007).

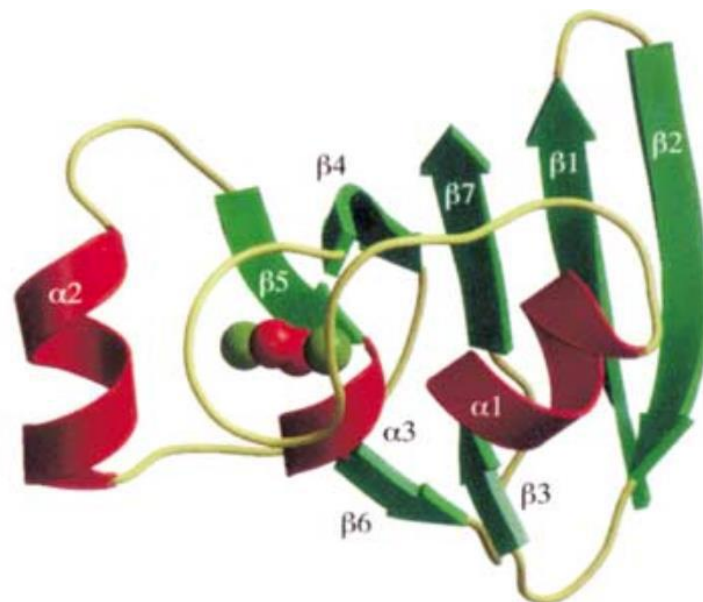


Figura 6 - Estrutura da Fd1 de *T. vaginalis* (Código PDB 1L5P). As estruturas redondas em vermelho e verde representam o centro de ferro enxofre. As α -hélices estão representadas em vermelho e as folhas- β em verde. CROSSNOE et al., 2002.

Na estrutura primária da Fd1 de *T. vaginalis*, os oito primeiros resíduos correspondem ao sinal de endereçamento para o hidrogenossoma e são clivados durante o transporte para a organela, não sendo assim encontrados na proteína madura. A estrutura elucidada da Fd1 de *T.*

vaginalis tem início na primeira cadeia em folha- β (β_1), que se estende dos resíduos 1 a 7. Então, dos resíduos de 7 a 10 se forma uma curva inversa tipo I que leva à cadeia β_2 , formada pelos resíduos de 10 a 16. Os resíduos de 17 a 20 formam uma curva inversa tipo II, e os resíduos 20 e 21 formam a cadeia β_3 , que é curta. Os resíduos de 22 a 30 formam a α_1 , uma hélice proeminente encontrada em todas as [2Fe-2S] Fd conhecidas (CROSSNOE et al., 2002).

A partir daí, a cadeia principal se estende dos resíduos 31 a 46, porém, não possui uma estrutura secundária definida, exceto pela curva tipo II, formada pelos resíduos de 34 a 37. Os resíduos de 33 a 47 formam uma alça que cobre o grupo [2Fe-2S] e possuem três dos resíduos de cisteína que coordenam o centro [2Fe-2S] (CIS38, CIS44 e CIS47). Os resíduos de 47 a 53 formam a quarta cadeia folha- β (β_4), porém, essa cadeia é torcida e por isso pode ser considerada como dois filamentos curtos, que vão dos resíduos 48 a 51 e 51 a 53. Uma característica interessante dos resíduos 55 a 59 é que eles não adotam uma estrutura secundária definida, porém os homólogos mais próximos da Fd1 de *T. vaginalis*, a putidaredoxina e adrenodoxina, possuem uma α -hélice nesta região (CROSSNOE et al., 2002).

Já os resíduos de 60 a 67 formam a α_2 e os resíduos de 67 a 70 e 71 a 74 formam mais duas curvas inversas tipo I, seguidas pela cadeia curta β_5 , formada pelos resíduos que vão de 74 a 76. A α_3 é formada pelos resíduos de 76 a 80 e a outra cadeia curta β_6 é formada pelos resíduos de 80 a 82. Já os resíduos de 83 a 86 e 86 a 89 formam mais duas curvas inversas do tipo III e II, respectivamente, e por fim, os resíduos de 89 a 93 forma a β_7 (CROSSNOE et al., 2002).

1.10 Localização celular das ferredoxinas em *T. vaginalis*

Ainda não se tem muito conhecimento sobre a localização das outras Fd de *T. vaginalis* já descobertas, pois faltam informações experimentais sobre a função e a estrutura das demais proteínas (PLUMPER; BRADLEY; JOHNSON, 2000).

O mRNA da Fd1 é encontrado no RNA extraído de polissomos livres, indicando que essas proteínas são sintetizadas no citosol e, em seguida, translocadas para o hidrogenossomo após a tradução, como ocorre com a maioria das proteínas mitocondriais (JOHNSON et al., 1990). O gene que codifica a Fd1 revela a presença de oito aminoácidos N-terminais que estão ausentes da proteína purificada. Esses aminoácidos adicionais compreendem uma sequência líder de endereçamento que é removida proteoliticamente após a translocação para o hidrogenossomo, indicando que a sequência N-terminal é necessária para a importação de proteínas para os hidrogenossomos (JOHNSON et al., 1990; LAHTI; JOHNSON, 1991; PLUMPER; BRADLEY; JOHNSON, 2000).

1.11 Modelagem molecular

Com os avanços na computação, a modelagem molecular se mostrou muito vantajosa no contexto da elucidação de estruturas moleculares, por ser uma técnica rápida e de baixo custo, em comparação com métodos experimentais disponíveis (GOUVÊA, 2021). Informações estruturais acerca de proteínas são de fundamental importância, pois, mesmo que a base de dados de estruturas determinadas experimentalmente esteja crescendo de maneira exponencial, ainda não há dados estruturais disponíveis para a maioria das proteínas consideradas como possíveis alvos terapêuticos (SILVA, 2008).

O banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) é um servidor *online* que visa promover a exploração das diversas estruturas 3D e funções de proteínas e ácidos nucleicos, visto que se trata de um repositório mundial de informações estruturais de macromoléculas biológicas. O PDB organiza as estruturas depositadas com códigos de 4 dígitos, variando entre números e letras e elas estão associadas a diversos organismos. Essas informações estruturais são normalmente obtidas por pesquisadores de todo o mundo, sendo majoritariamente através de técnicas de cristalografia e difração de raios X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), crio-microscopia eletrônica (crio-EM) e difração de nêutrons (BRITO, 2016; BERMAN, 2000; GOUVÊA, 2021; PINTO, 2020).

Entretanto, as técnicas de cristalografia e difração de raios X e RMN possuem custo elevado e, diversas vezes, no caso da difração de raio X, necessitam de uma concentração proteica elevada para a sua realização, além da dificuldade de obtenção de cristais de determinadas proteínas (RABELO, 2016). Além disso, atualmente, todas as técnicas experimentais envolvem previamente a clonagem, expressão e purificação de proteínas, demandando tempo e dinheiro, e ainda assim, muitas vezes as proteínas clonadas e expressas não se enovelam bem no sistema de expressão escolhido, dificultando a elucidação estrutural por técnicas experimentais (ARAÚJO, 2010; GUIMARÃES, 2011).

Sendo assim, a busca por ferramentas que sejam capazes de simular estruturas 3D de proteínas vem se tornando cada vez maior. Neste contexto, os métodos de modelagem comparativa, *threading* e *ab initio*, estão entre os mais empregados (VYAS et al., 2012).

1.11.1 Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas

Proteínas, ou segmentos de proteínas, muito similares entre si podem ser classificados como homólogos, indicando que possuem uma origem evolutiva comum e que, provavelmente, podem possuir estruturas e funções em comum. Sendo assim, quando existe uma alta

similaridade entre as sequências peptídicas, técnicas de modelagem comparativa podem ser usadas para gerar modelos tridimensionais de proteínas cujas estruturas 3D não são conhecidas. Essas técnicas produzem modelos das proteínas de interesse obtidos a partir de moldes já resolvidos experimentalmente e que possuam coordenadas cartesianas depositadas no PDB (RODRIGUES, 2019; SILVA, 2010).

Os modelos comparativos podem ser úteis para diversos propósitos, como a identificação de um sítio ativo e a determinação de interações moleculares diversas, ou ainda em simulações de *docking* molecular entre um ligante e uma proteína ou ainda entre duas ou mais proteínas. Geralmente, a estratégia da modelagem comparativa envolve o alinhamento das sequências de aminoácidos, bem como a construção, otimização e validação dos modelos construídos (HILLISCH; PINEDA; HILGENFELD, 2004; PACHECO, 2010).

Durante a modelagem comparativa, o objetivo do alinhamento das estruturas primárias é alinhar resíduos de aminoácidos que são estruturalmente equivalentes (homólogos), levando em conta características comuns, sendo fundamental entender que essa técnica depende da identidade e cobertura do alinhamento entre a estrutura alvo e o molde escolhido. Quanto maior o valor dessa identidade e cobertura, maior é a exatidão desses métodos (SANTOS; BICCA, 2003).

A partir do alinhamento, para a construção de um modelo 3D da sequência alvo baseada no seu molde, alguns métodos distintos podem ser empregados, sendo mais utilizados os de corpos rígidos e restrições espaciais (RODRIGUES, 2019).

Outra maneira de se construir modelos é a partir da técnica de *threading*, onde se prevê a estrutura tridimensional de uma nova proteína alinhando sua sequência primária a uma estrutura experimental semelhante presente no PDB (BATZOGLOU, 2009). Essa técnica se baseia na ideia de que existe um número limitado de enovelamento de proteínas completamente novas que aparecem, mesmo que diversas novas estruturas sejam depositadas no PDB (BATZOGLOU, 2009; SMITH et al., 1997).

A precisão do alinhamento no método de *threading* da estrutura alvo no seu molde é fundamental para a qualidade do modelo. O melhor alinhamento é gerado pela otimização da função de pontuação, que geralmente é constituída por diversos elementos relacionados à sequência e a estrutura, como o perfil da sequência, a estrutura secundária, a acessibilidade a solventes, a capacidade de contato e a interação entre pares (BATZOGLOU, 2009; SMITH et al., 1997). Sendo assim, um modelo razoavelmente bom pode ser construído se um bom protocolo de *threading* estiver disponível (BATZOGLOU, 2009).

Existe a possibilidade de se obter modelos através de métodos de inteligência artificial (IA), como aquele empregado no programa *AlphaFold 2* (WEI, 2019). Esse sistema possui uma rede neural que é adaptada especificamente para prever estruturas de proteínas, pois ele combina diversos recursos de modelos homólogos e alinhamentos múltiplos para gerar a estrutura prevista (DAVID et al., 2022; JUMPER; HASSABIS, 2022). Essas redes neurais compõe uma grande classe de algoritmos de aprendizagem de máquina, que são treinados com base nas restrições evolutivas, físicas e geométricas das estruturas de proteínas (JUMPER et al., 2021).

Os métodos de predição *ab initio* de estruturas proteicas costuma ser utilizado quando as estruturas tridimensionais homólogas à sequência alvo não são conhecidas, pois esses métodos não dependem de um conhecimento prévio da proteína que será analisada, não sendo necessário a utilização de moldes. Dessa maneira, se torna irrelevante o uso de base de dados de estruturas experimentais (ASSIS, 2020; TAMAROZZI, 2020).

Atualmente, estão à disposição da comunidade científica uma variedade de métodos que foram desenvolvidos para a construção de estruturas moleculares *ab initio*. Dentre as abordagens, o método de montagem baseado em fragmentos possui notável sucesso entre diversos autores, pois em comparação com as simulações em nível atômico, os movimentos de inserção e substituição de fragmentos contribuem para a redução da entropia da busca conformacional, mantendo a qualidade alta das estruturas locais, pois os fragmentos são extraídos diretamente das estruturas experimentais. É importante notar que os comprimentos dos fragmentos estruturais são usados de maneira diferente de acordo com o método *ab initio* empregado (XU; ZHANG, 2013).

Finalmente, para que os modelos construídos possam ser aplicados em outras análises, eles precisam apresentar uma boa qualidade. Dessa maneira, é imprescindível que passem por processos de verificação e validação, visando identificar possíveis erros, como, por exemplo, relacionados à seleção das estruturas de referência e ao alinhamento entre a sequência alvo e os moldes empregados (RODRIGUES, 2019).

A partir da estrutura 3D construída, é possível realizar o *docking* com ligantes. *Docking* molecular é um método que surgiu durante as últimas três décadas e, tradicionalmente, é empregado no planejamento de fármacos. Sua técnica é baseada em algoritmos que simulam a interação molecular e preveem o modo de ligação e a afinidade entre receptores e ligantes, onde o receptor normalmente é uma proteína, ou um oligômero proteico, e o ligante é uma molécula pequena ou outra proteína. (FAN; FU; ZHANG, 2019; BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). Essa técnica foi se descomplicando pelo crescimento na disponibilidade e capacidade dos

computadores e ao acesso mais fácil aos bancos de dados de moléculas e proteínas (MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

Os programas de *docking* buscam o melhor ajuste entre duas ou mais moléculas levando em consideração diversos parâmetros do receptor e do ligante. Como resultado, os programas retornam as orientações previstas mais prováveis, conhecidas como poses, de um ligante no sítio de ligação do alvo (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003; DIAS; AZEVEDO, 2008).

Nas estratégias pioneiras de *docking*, os algoritmos utilizados mantinham o ligante e a proteína em sua conformação inicial rígida durante todo o processo, representando um encaixe rígido (modelo de chave e fechadura) (FAN; FU; ZHANG, 2019; MORRIS; LIM-WILBY, 2008; RODRIGUES et al., 2012). Entretanto, o problema dessa abordagem é que ela não considera a flexibilidade do ligante, sendo que, na maioria das vezes, moléculas pequenas possuem grande variação conformacional, com diversos estados de baixa energia, e não considera a flexibilidade do receptor, que pode sofrer influência do ambiente em que se encontra e mudar seu estado conformacional (REZENDE, 2019; RODRIGUES et al., 2012).

Posteriormente, com os avanços nos estudos bioquímicos e farmacológicos, foi proposta a teoria do encaixe induzido e a flexibilidade também foi introduzida nas metodologias de *docking* molecular. Assim, o *docking* semiflexível é uma das metodologias mais empregadas e considerada a flexibilidade do ligante apenas, enquanto o *docking* flexível considera também a flexibilidade de parte do receptor. Desse modo, foi possível melhorar a busca conformacional no espaço químico, adequando melhor o cálculo para cada situação e considerando as propriedades físico-químicas e flexibilidade, com objetivo de encontrar os modos de ligação mais favoráveis e estáveis de um ligante no seu alvo (FAN; FU; ZHANG, 2019; MORRIS; LIM-WILBY, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o cenário da tricomoníase no Brasil e no mundo é problemático, pois a estimativa anual para essa IST é de 200 milhões de pessoas infectadas em todo mundo e cerca de 4,3 milhões de novos casos por ano no Brasil (GLEHN, 2016; LIMA, et al., 2013). Além disso, mesmo não sendo uma doença de notificação compulsória, a tricomoníase está associada a um risco 1,5 vezes maior de aquisição do HIV e estima-se que 24% das infecções pelo HIV são diretamente atribuídas a essa doença (MENEZES, 2022).

Com isso, é necessário ter atenção às interações medicamentosas entre o MTZ e antirretrovirais como o ritonavir, que podem reduzir a adesão ao tratamento (CARVALHO, et al., 2021). Este problema, juntamente com falhas terapêuticas que incluem o aparecimento de cepas resistentes ao o MTZ, fazem com que o tratamento dessa IST se torne progressivamente mais problemático. Dessa maneira, se torna cada vez mais importante o estudo desses parasitos, para melhor compreender sua fisiologia e patogênese e a busca por novos alvos moleculares e alternativas terapêuticas para o tratamento da tricomoníase (MACIEL et al., 2004).

Os avanços em pesquisas sobre genética, biologia molecular, bioquímica e bioinformática permitiram a compreensão das diversas interações e vias metabólicas fundamentais para entender a interação do MTZ com o *T. vaginalis*. Assim, proteínas associadas às vias metabólicas desse parasito e que estão envolvidas com a ativação desse fármaco, podem ser consideradas como alvos potenciais para pesquisa no desenvolvimento e aperfeiçoamento de fármacos antiparasitários, assim como para o entendimento do mecanismo moleculares de ação dos fármacos atualmente disponíveis. Nesse contexto, enquanto a Fd1 de *T. vaginalis* já vem sendo estudada como agente ativador do MTZ nos hidrogenossomos, poucos estudos foram conduzidos com as demais Fd codificadas no genoma do parasito, incluindo a possíveis interações dessas proteínas com esse fármaco (BUENO, 2013).

Atualmente, a modelagem molecular é uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento de modelos computacionais e análise de estruturas 3D de biomoléculas, permitindo a previsão de suas propriedades físicas e químicas, assim como o entendimento das relações entre estrutura e função associadas com o metabolismo dos organismos, além de reduzir custos e otimizar tempo de trabalho (SILVA, 2010).

Sendo assim, mais estudos são necessários acerca das demais Fd, e a modelagem molecular é uma ferramenta que pode ajudar a responder questões importantes sobre possíveis interações dessas Fd com o MTZ.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a família de Fd do parasito *Trichomonas vaginalis* e analisar suas interações com o fármaco MTZ usando ferramentas de modelagem molecular.

3.2 Objetivos Específicos

Gerar uma filogenia molecular a fim de obter informações sobre a história evolutiva das Fd 1-7;

Desenvolver e validar modelos 3D das 6 Fd de *T. vaginalis*, empregando técnicas de modelagem molecular;

Analisar características estruturais das Fd de *T. vaginalis*;

Investigar *in silico* a interação molecular dos modelos das Fd de *T. vaginalis* com o fármaco MTZ.

4. METODOLOGIA

4.1 Identificação das proteínas pertencentes à família de ferredoxinas de *T. vaginalis*

Inicialmente, através do número de acesso da sequência nucleotídica da Fd1, M33717, descrita por Johnson e colaboradores (1990), a sequência peptídica da Fd1, codificadas pelo genoma de *T. vaginalis* (cepa G3), foi encontrada. A partir desta, realizou-se uma busca por similaridade, empregando a ferramenta *BLASTp*, para encontrar as sequências peptídicas das outras Fd de *T. vaginalis* no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do TrichDB (<https://trichdb.org/trichdb/app>).

Foram considerados homólogos da Fd as proteínas que apresentassem cobertura de identidade ao longo de toda sequência peptídica prevista e que apresentassem conservação de resíduos fundamentais, tais como as cisteínas que estão envolvidas na coordenação do grupamento ferro-enxofre.

O alinhamento múltiplo das sequências peptídicas previstas das sete Fd de *T. vaginalis* foi feito utilizando o servidor *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), permitindo que os resíduos homólogos das diferentes sequências peptídicas se alinhem em coluna o máximo possível (SIEVERS; HIGGINS, 2018).

Para realizar os cálculos de identidade e similaridade das Fd 1-7, foi utilizado o software *BioEdit* (HALL et al., 1999) com a matriz de similaridade BLOSUM62.

4.2 Filogenia molecular

Após o alinhamento de sequências peptídicas, foi realizada uma filogenia molecular e as árvores filogenéticas foram geradas através dos algoritmos de *neighbor-joining* e de máxima verossimilhança.

O algoritmo de *neighbor-joining*, ou agrupamento de vizinhos, consiste em um método simples, baseado em distâncias (uma medida da similaridade entre as sequências) e usado o princípio de evolução mínima (SAITOU; NEI, 1987). Assim, uma matriz de distâncias é computada a partir do alinhamento múltiplo e serve como base para determinação progressiva de quais sequências são mais próximas evolutivamente que as demais. A construção da árvore obedece a suposição de que quanto menor a distância (e maior a similaridade), mais próximas na filogenia as sequências estarão (NEI; KUMAR, 2000). O método de *neighbor-joining* foi executado conforme implementado pelo programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X - MEGA X* (v. 10.0.5; KUMAR et al., 2018). As distâncias evolutivas para composição da matriz foram calculadas usando o método de correção de Poisson e as lacunas ou *gaps* no

alinhamento foram tratadas utilizando a opção de deleção par a par (*pairwise deletion*). Na árvore resultante, representada em escala, o comprimento de cada ramo é proporcional ao número de substituições de resíduos de aminoácidos por sítio. Para validação estatística, foram analisadas 1.000 replicatas de reamostragens por *bootstrap* e o maior percentual de vezes em que um mesmo grupo de sequências era agrupado nas replicatas é representado na base de cada nó na árvore final. Pela dificuldade em determinar com segurança uma sequência para ser usada como grupo externo, a árvore foi construída de forma não enraizada.

O algoritmo de máxima verossimilhança usa uma abordagem baseada em critérios probabilísticos, que busca reconstruir uma filogenia baseando-se em um modelo de evolução dos dados moleculares (no caso, sequências peptídicas). O algoritmo em questão busca, supondo que os genes evoluíram de acordo com o modelo pré-estabelecido, encontrar a árvore filogenética mais provável que possa refletir as relações evolutivas entre as sequências analisadas (NEI; KUMAR, 2000; SANTIBANEZ et al., 2019). Neste trabalho, o modelo evolutivo que se mostrou mais adequado aos dados foi o WAG (Whelan And Goldman), com taxa de substituições entre sítios ditada pela distribuição gama com sítios invariantes (G+I). Foi empregada ainda a deleção parcial de sítios com dados ausentes. Assim como o método de *neighbor-joinig*, na filogenia construída por máxima verossimilhança, também foram analisadas 1.000 replicatas de reamostragens por *bootstrap* e o maior percentual de vezes em que um mesmo grupo de sequências era agrupado nas replicatas é representado na base de cada nó na árvore final, não enraizada. Esse método foi também executado conforme implementado pelo programa *MEGA X* (v. 10.0.5; KUMAR et al., 2018).

Para a confecção de uma filogenia molecular das Fd, visando identificar as relações evolutivas das sete Fd encontradas no genoma de *T. vaginalis*, foram selecionadas sequências homólogas de Fd obtidas de animais (*Homo sapiens*, *Danio rerio* [peixe-zebra] e *Drosophila melanogaster*), da alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, do vegetal modelo *Arabidopsis thaliana*, do parasito tripanossomatídeo *Trypanosoma brucei*, do parasito apicomplexa *Toxoplasma gondii*. Além disso, foram usadas as sequências das sete Fd encontradas no genoma do parasito *Tritrichomonas foetus*, evolutivamente próximo de *T. vaginalis*, e da única Fd codificada no genoma do parasito *Giardia intestinalis*, que assim como *T. vaginalis* e *T. foetus*, pertence ao táxon Metamonada, de eucariotos unicelulares anaeróbios.

4.3 Construção dos modelos tridimensionais das ferredoxinas de 2-7 de *T. vaginalis*

Para realizar a construção dos modelos tridimensionais das Fd 2, 3, 4 e 5 foi utilizado o método de modelagem comparativa com o servidor *Swiss-Model* (<https://swissmodel.>

expasy.org/). A estrutura cristalográfica da Fd1 (código PDB 1L5P; resolução 2,20 Å) foi selecionada como molde para todas as Fd de *T. vaginalis*.

Nesse servidor, os modelos são gerados a partir do alinhamento com o molde, empregando o método de corpos rígidos para a construção das regiões estruturalmente conservadas, e o método *de novo* para as regiões não conservadas, quando são usadas informações provenientes de bancos de estruturas determinadas empiricamente, sem utilizar informação do molde (LIMA; MODA; ROMANELLO, 2020; RABELO, 2016; PACHECO, 2010).

Considerando a menor identidade entre a Fd 1 com a Fd 6 e 7, também foram construídos modelos dessas Fd a partir da técnica de *threading*, utilizando o servidor I-TASSER (ZHANG, 2008). Esse servidor utiliza uma metodologia intermediária entre a modelagem comparativa e *ab initio*, conhecida como *threading*. Esse método é utilizado para sequências de proteínas que apresentam identidade muito baixa ou não possuem uma proteína homóloga no banco de dados, a partir disso, são construídos modelos baseados em estruturas resolvidas no PDB e fornecido um valor de *C-score* para cada modelo gerado. Esse *C-score* pode variar de -5 a 2, indicando o índice de confiabilidade da qualidade daquele modelo (ASSIS, 2020; WU; SKOLNICK; ZHANG, 2007; ZHANG, 2008).

Além disso, foi utilizado também os modelos das Fd 6 e 7 gerados pelo programa *AlphaFold2* e disponibilizados no *Protein Structure Database* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Neste, as estruturas 3D são preditas através de algoritmos e procedimentos de treinamento com base nas restrições evolutivas, físicas e geométricas de proteínas a partir de modelos de redes neurais (JUMPER, et al., 2021).

Em seguida, a estrutura do centro [2Fe-2S] foi adicionada a cada um dos modelos gerados pelos diferentes métodos, através do alinhamento com a Fd1 no programa *Swiss PDB Viewer* 4.1.0 (SPDBV) e posteriormente foram submetidos a ciclos de minimização de energia utilizando o mesmo programa.

Visto que o hidrogenossomo possui um gradiente de pH transmembrana, onde o interior dessa organela é mais alcalino em relação ao citosol (BENCHIMOL, 1999), o estado de protonação dos resíduos de aminoácidos carregados foram analisados em pH 8,0 com o programa PROPKA 3.1 no servidor PDB2PQR (JURRUS, et al., 2018). A função *AddH* do programa *Chimera* 1.16 foi utilizada para adicionar os hidrogênios dos resíduos dos modelos de acordo com o estado de protonação predito (PETTERSEN, et al., 2004). Os mapas de potencial eletrostático foram calculados usando o programa *adaptive Poisson-Boltzmann solver* (APBS), também disponível no servidor PDB2PQR (JURRUS, et al., 2018).

4.4 Validação dos modelos obtidos para as ferredoxinas 2-7 de *T.vaginalis*

Após a predição dos modelos 3D das seis proteínas, a qualidade estrutural foi avaliada por meio dos seguintes programas *Verify3D* (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), *Procheck* (LASKOWSKI, et al., 1996) e *ProSA-web* (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). A etapa de validação é fundamental para a determinação da qualidade do modelo gerado e otimizado, independentemente do método preditivo empregado (RODRIGUES, 2019; SILVA, 2010).

4.5 Docking molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados para avaliar o modo de ligação do MTZ com os modelos das Fd de *T. vaginalis*. Em geral, o primeiro passo é a validação do *docking* a partir do *redocking*, onde o ligante é extraído de sua estrutura determinada experimentalmente disponível no PDB e então é recolocado no sítio de modo que seja possível avaliar a capacidade preditiva do método (GOUVÊA, 2018). Todavia, até o momento, não há disponível no PDB estruturas de Fd ou proteínas homólogas em complexo com o MTZ ou moléculas análogas para realizar essa etapa.

A estrutura 3D do MTZ foi construída e submetida a análise conformacional a partir do método de mecânica molecular, utilizando o campo de força *Merck Molecular Force Field* (MMFF), seguida por etapas de otimização de geometria e energia, utilizando o método semiempírico RM1 e o método *ab initio* Hartree-Fock 6-31G*, no *software* Spartan'10 (Wavefunction, Inc. Spartan versão 10, 2010). Os cálculos foram realizados nos computadores do Laboratório Integrado de Biologia Computacional e Pesquisa em Ciências Farmacêuticas (NUPEM/UFRJ).

O *docking* molecular foi realizado utilizando o programa *AutoDock* 4.2.6 e a interface gráfica *AutoDockTools* 1.5.7 (MORRIS, et al., 2009). Primeiramente, o MTZ foi preparado no *AutoDockTools* a partir da adição de hidrogênios, mantendo suas ligações torcionáveis flexíveis. As Fd 1-7 de *T. vaginalis* também foram preparadas no mesmo programa a partir da adição hidrogênios polares e cargas *Gasteiger*, mantendo a estrutura rígida. A carga dos átomos de ferro e dos átomos de enxofre do centro de ferro-enxofre [2Fe-2S] foram definidas manualmente como +2 e -2, respectivamente, no arquivo *pdbqt*.

A caixa utilizada para o cálculo do *docking* possuía as dimensões de 50×50×50 pontos, com espaçamento entre os pontos de 0,375Å, e foi centralizada no átomo de ferro 1 (Fe1) do centro [2Fe-2S] das Fd. Os mapas de grade foram calculados usando o *AutoGrid4*. O algoritmo

de busca empregado foi o algoritmo genético Lamarckiano e foram solicitadas 50 conformações do ligante. Os demais parâmetros para os cálculos de *docking* foram mantidos com os valores padrões do programa.

A pose dos ligantes que apresentou menor energia de ligação foi selecionada e as interações proteína-ligante foram analisadas utilizando os programas Pymol v. 0.99 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC) e *Discovery Studio Visualizer* v. 21.1.0 (Accelrys Software Inc., 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação da família de ferredoxinas de *T. vaginalis*

A Fd1 de *T. vaginalis* foi isolada e categorizada pela primeira vez em 1984 por Gorrell e colaboradores, e em 2002, sua estrutura 3D foi elucidada por Crossnoe e colaboradores, sendo depositada no PDB com o código de acesso 1L5P (CROSSNOE et al., 2002; GORRELL.; YARLETT; MÜLLER, 1984). Com o genoma de *T. vaginalis* completamente sequenciado, foi encontrada a existência de mais seis genes que codificam Fd que, atualmente, não são tão estudadas quanto a Fd1 (BARROS, 2013; CARLTON et al., 2007; CROSSNOE et al., 2002). Portanto, as Fd encontradas no genoma desse parasito foram identificadas por meio de buscas de similaridade tipo *Blast* nos bancos de dados do *NCBI* e do *Trich DB* e seus códigos de acesso no *NCBI* e identificadores de *locus* no *TrichDB* estão apontados no Quadro 1.

Quadro 1 - Identificação das Fd 1-7 de *T. vaginalis*.

<i>Ferredoxina</i>	<i>Nº de acesso (NCBI)</i>	<i>Identificadores de Locus (TrichDB)</i>	<i>Resíduos de aminoácidos</i>
Fd1	XP_001324407.1	TVAG_003900	101
Fd2	XP_001299482.1	TVAG_399860	103
Fd3	XP_001321028.1	TVAG_213140	100
Fd4	XP_001330370.1	TVAG_292710	107
Fd5	XP_001318378.1	TVAG_068150	107
Fd6	XP_001304206.1	TVAG_251200	110
Fd7	EAX87148.1	TVAG_078730	125

Matsubara e Saeki mostraram a diversidade estrutural e funcional de diversas Fd presente em diferentes organismos. Em particular, eles relataram que Fd [2Fe-2S] de variadas espécies de plantas, algas eucarióticas e cianobactérias possuem cerca de 93 a 99 resíduos de aminoácidos (FUKUYAMA, 2004; MATSUBARA; SAEKI, 1992). Todavia, Campbell e colaboradores mostraram que existem Fd [2Fe-2S] que possuem cerca de 103 a 128 resíduos de aminoácidos (CAMPBELL; BENNETT; SILBERG, 2019), assim como observado para as Fd de *T. vaginalis*.

Já em comparação com Fd de bactérias, como exemplo o *Bacillus thermoprotezytieus*, que possui uma Fd com 81 resíduos de aminoácidos e um centro [4Fe-4S] (FUKUYAMA, et al., 1988), é possível observar que as Fd 1-7 de *T. vaginalis* são consideravelmente maiores, principalmente a Fd 7, que possui 125 resíduos de aminoácidos.

Todas as sete Fd codificadas pelo genoma de *T. vaginalis* compartilham maior similaridade com membros da família das Fd [2Fe-2S]. Assim, é razoável supor que essas proteínas possuem centros [2Fe-2S] associados em sua estrutura.

5.2 Análises filogenéticas

Dentro do estudo da evolução, é necessário a procura por homologies entre as espécies, e especialmente no caso da filogenia molecular, por homologia entre proteínas específicas de espécies distintas, resultantes de uma herança ancestral comum (ZAFALON, 2009). São considerados parálogos aqueles genes (e as proteínas por ele codificadas) homólogos identificados em um mesmo organismo, normalmente derivado de fenômenos de duplicação gênica na linhagem que deu origem ao táxon sob estudo. Ao longo da evolução dessas cópias parálogas, é comum que muitas delas assumam novas funções na fisiologia celular. Já os genes (ou proteínas) considerados ortólogos, são os homólogos de um mesmo gene encontrados em organismos distintos (KOONIN, 2005).

Empregando ferramentas de filogenia molecular aplicadas às famílias gênicas provenientes de diversas espécies, é possível distinguir parálogos de ortólogos, inferindo assim eventos de duplicação gênica que levam a formação de novos genes nas linhagens de organismos vivos, eventos de perdas gênicas, transferências gênicas horizontais, dentre outros fenômenos que afetam os genomas no curso da evolução. A reconstrução filogenética é um processo complexo que envolve diversas etapas, sendo a seleção das sequências gênicas (ou de proteínas) a serem analisados e a confecção de um alinhamento múltiplo as primeiras delas. Dessa maneira, se torna imprescindível a seleção racional dos organismos a serem estudados e

elaboração de um alinhamento preciso, garantindo maior confiabilidade à reconstrução filogenética (BRAUN; JUNQUEIRA; VERLI, 2014).

Análises filogenéticas foram realizadas para avaliar informações sobre a herança ancestral comum das Fd 1-7. Foram construídas árvores pelos métodos de *neighbor-joining* (Figura 7) e máxima verossimilhança (Figura 8). No geral, consideramos robustos e válidos os agrupamentos de sequências que se repetiram em ambas as análises e com valor elevado de *bootstrapping* (> 50). As análises revelaram relações importantes no que se refere a evolução das Fd encontradas em *T. vaginalis* e no parasito evolutivamente relacionado *Tritrichomonas foetus*, cujo genoma já foi também sequenciado (BENCHIMOL et al., 2017; DA̧BROWSKA et al., 2020).

Em um panorama geral, ambas as análises revelam que as Fd eucarióticas se dividem em dois grandes grupos (Figuras 7 e 8). O primeiro que contém as Fd de parabasalia (*T. vaginalis* e *T. foetus*) e também as de animais, leveduras e eucariotos unicelulares não fotossintetizantes, e alguns poucos membros das Fd de vegetais (*Arabidopsis thaliana*) e algas (*Chlamydomonas reinhardtii*). O segundo grupo contém majoritariamente as Fd de vegetais e algas. O segundo ramo que abriga todas as demais Fd de *C. reinhardtii* e *A. thaliana*. Possivelmente, todas essas Fd são de cloroplastos, uma vez que as Fd também desempenham papel importante na fotossíntese (MARTINS, 2011). É interessante notar que há, nesse ramo, uma Fd de *Toxoplasma gondii*, que apesar de ser um parasito, possui um plastídeo não fotossintetizante, o apicoplasto, que usa uma Fd no seu metabolismo (HENKEL, 2022).

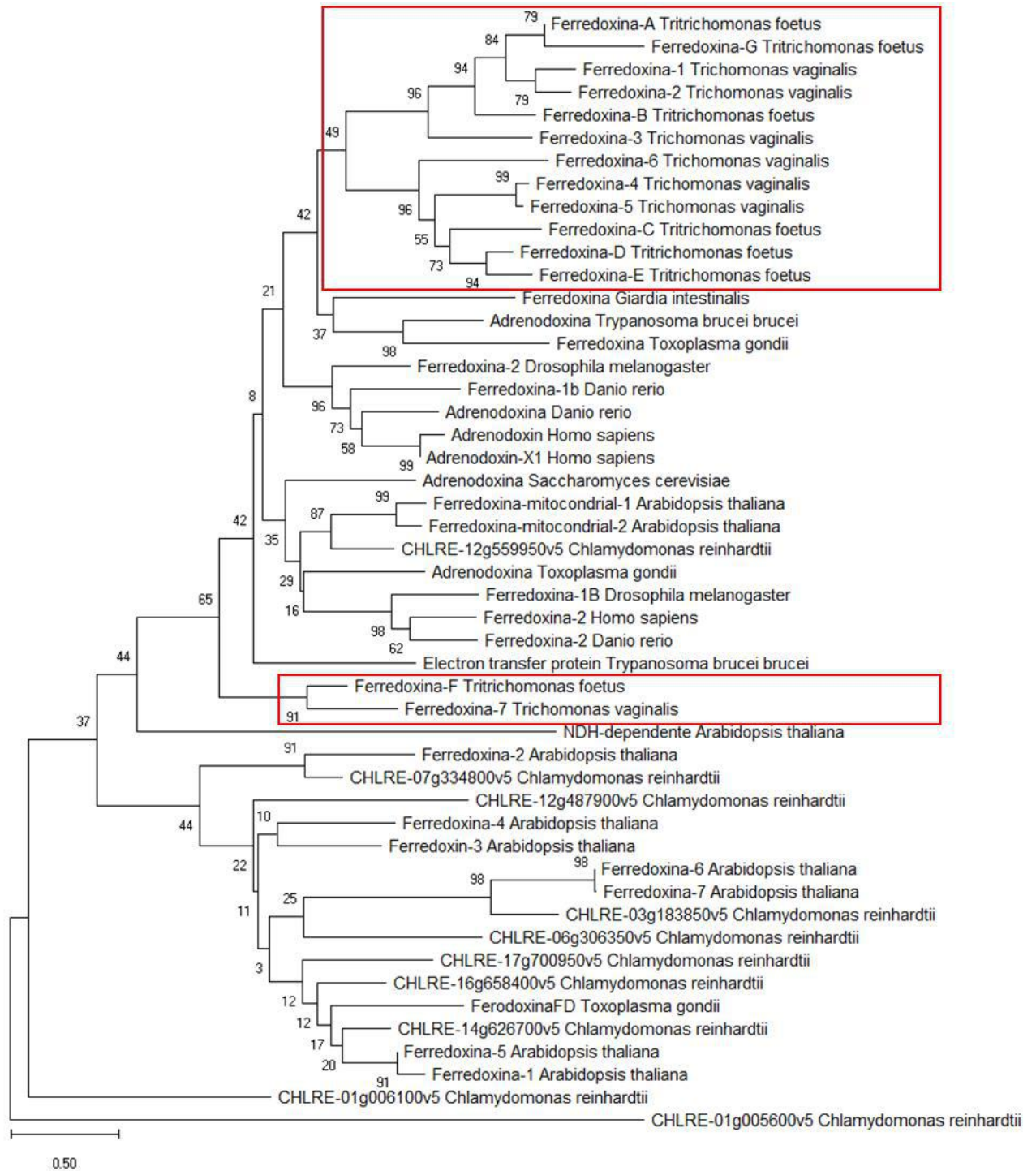


Figura 7 - Reconstrução filogenética das proteínas da família das Fd [2Fe-2S] de organismos eucarióticos selecionados, a partir do método de *neighbor-joining*. As distâncias evolutivas foram calculadas com base na matriz JTT (*Jones, Taylor and Thornton*). Os valores de *bootstrap* para 1000 réplicas são mostrados em porcentagem, para cada nó. A árvore foi construída com deleção total de ambiguidades nas sequências pareadas, com um total de 519 posições constituindo o conjunto de dados analisados. A árvore está ilustrada em escala, com o comprimento dos ramos proporcional ao número de substituições por sítio. As Fd de Parabasalia estão destacadas nas caixas vermelhas.

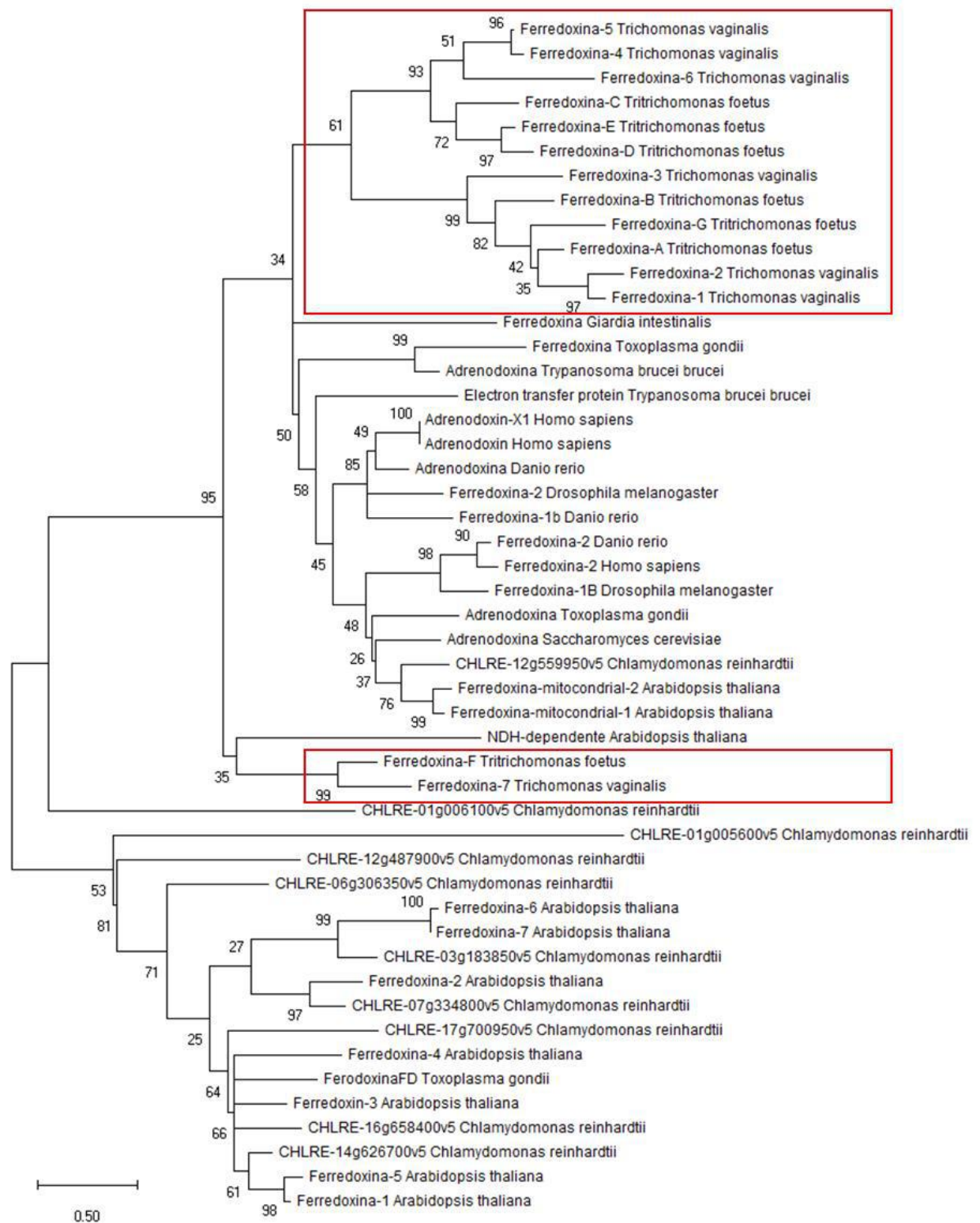


Figura 8 - Reconstrução filogenética das proteínas da família das Fd [2Fe-2S] de organismos eucarióticos selecionados, a partir do método de máxima verossimilhança, com base no modelo WAG (*Whelan And Goldman*) e empregando distribuição gama para modelar as taxas de evolução entre os sítios, com permissão de sítios invariáveis. Os valores de *bootstrap* para 1000 réplicas são mostrados em porcentagem, para cada nó. A árvore foi construída com deleção parcial de lacunas, com um total de 83 posições constituindo o conjunto de dados analisados. A árvore está ilustrada em escala, com o comprimento dos ramos proporcional ao número de substituições por sítio. As Fd de *Parabasalia* estão destacadas nas caixas vermelhas.

As Fd 1-6 de *T. vaginalis* e as Fd A, B, C, D, E e G de *T. foetus* parecem ter divergido a partir de um ancestral comum durante a evolução na linhagem Parabasalia. Isso se deve à, inicialmente, uma duplicação que gera um ramo contendo as Fd 1, 2, e 3 de *T. vaginalis* e as Fd A, G e B de *T. foetus*, e outro ramo contendo as Fd 4 5 e 6 de *T. vaginalis* e as Fd E, D e C de *T. foetus* (Figuras 7 e 8). Entretanto, não há uma correspondência direta de paralogia entre as seis Fd de cada organismo e duplicações independentes parecem ter ocorrido em cada uma das duas linhagens de parasitos. Assim, é possível observar uma proximidade maior entre as Fd 1 e 2 de *T. vaginalis*, bem como entre as Fd 4 e 5 desse mesmo organismo, indicando que a duplicação que originou esses parálogos ocorreu recentemente na evolução e especificamente na linhagem de *T. vaginalis*. O mesmo pode ser observado para as Fd A e G e as Fd D e E de *T. foetus*.

Nesse mesmo ramo das filogenias, ainda, é possível observar que a Fd 3 de *T. vaginalis* possui um ancestral comum mais próximo das Fd 1 e 2, enquanto a Fd 6 possui um ancestral comum mais próximo das Fd 4 e 5 (Figuras 7 e 8).

Além disso, a Fd 7 de *T. vaginalis* e a Fd F de *T. foetus* são ortólogos bastante claros nesses dois parasitos, compartilhando um ancestral comum na base dos Parabasalia e não estando diretamente associados ao ramo das demais Fd de Parabasalia (Figuras 7 e 8). Em ambas as reconstruções filogenéticas, o ramo contendo Fd 7 de *T. vaginalis* e a Fd F de *T. foetus* surge na base do grupo das Fd “não vegetais”. Assim, esse ramo parece conter Fd exclusivas da linhagem Parabasalia, havendo divergido a partir de uma duplicação do mesmo gene Fd eucariótico ancestral que originou as demais Fd “não vegetais”. Pelo padrão bastante distinto de divergência dessas duas Fd, é possível que tenham evoluído para desempenhar funções celulares particulares dessa linhagem de organismos.

Com isso, pode-se sugerir que as Fd de Metamonada (*Giardia intestinalis*, *T. foetus* e *T. vaginalis*) divergem no mesmo ramo das Fd de animais (adrenodoxinas), Fd de fungos e Fd mitocondriais de vegetais. Como já foi verificado que a Fd 1 de *T. vaginalis* apresenta localização nos hidrogenossomos (ZIMORSKI et al., 2013), é provável que todas as Fds desse grupo sejam proteínas localizadas em mitocôndrias e organelas evolutivamente relacionadas, como hidrogenossomos e mitossomos.

5.3 Análise comparativa das sequências de aminoácidos das ferredoxinas de *T. vaginalis*

Em 2002, Crossnoe e colaboradores depositaram no PDB a estrutura da Fd1 de *T. vaginalis* ligada ao seu centro de Fe-S (CROSSNOE et al., 2002). Contudo, as demais Fd (2-7) desse organismo ainda não possuem suas estruturas elucidadas experimentalmente. A

comparação entre as sequências de aminoácidos dessas proteínas permitiu observar regiões mais conservadas entre as sete Fd de *T. vaginalis*, principalmente as cisteínas CIS50, CIS56, CIS59 e CIS95 (Figura 9). O centro de ferro-enzofre é coordenado com a proteína através dos grupos sulfidríla presentes nesses quatro resíduos de cisteína conservados, sendo que três dessas cisteínas fazem parte de uma alça que envolve o centro de ferro-enzofre (WEKSBERG et al., 2007).

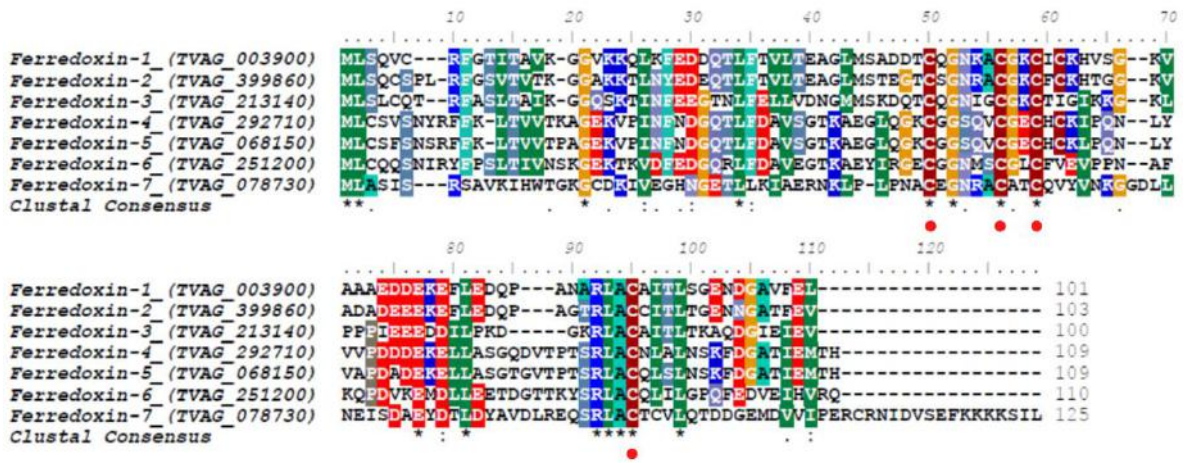


Figura 9 - Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das Fd 1-7 de *T. vaginalis*. Os identificadores dos *loci* dos genes correspondentes no TrichDB estão entre parênteses. Asteriscos (*) indicam posições idênticas em todas as sequências alinhadas; (:), (.) e (-) indicam substituições conservativas em maior ou menor grau, respectivamente, nas sequências peptídicas; (-) indicam lacunas inseridas para otimizar o alinhamento. As cores no alinhamento indicam também o grau de conservação por posição ao longo do alinhamento múltiplo. As cisteínas de coordenação (CIS50, CIS56, CIS59 e CIS95 na Fd1) estão identificadas pelos pontos em vermelho.

De modo geral, o alinhamento múltiplo mostrou certo grau de semelhança que existe entre elas, principalmente entre as Fd 1-5, as quais apresentaram identidades variando de 31,8 a 68,9% (Tabela 1). É importante notar que as semelhanças observadas na matriz refletem as relações evolutivas apresentadas anteriormente nas reconstruções filogenéticas (Figuras 7 e 8).

Tabela 1 - Matriz de identidade/similaridade entre as Fd 1-7 de *T. vaginalis*.

	Fd 1	Fd 2	Fd 3	Fd 4	Fd 5	Fd 6	Fd 7
Fd 1	100/100	68,9/80,5	43,1/56,8	32,7/44,5	31,8/44,5	25,4/39,0	22,2/35,7
Fd 2		100/100	45,6/56,3	32,7/47,2	32,7/47,2	29,0/42,7	19,5/32,0
Fd 3			100/100	27,2/40,0	26,3/40,0	27,2/41,8	19,6/29,9
Fd 4				100/100	90,8/92,6	46,3/60,0	21,7/32,5
Fd 5					100/100	48,1/61,8	19,5/29,6
Fd 6						100/100	20,1/31,7
Fd 7							100/100

Para a construção de modelos através da modelagem comparativa, é necessário que ambas as sequências, do molde e do modelo, apresentem um certo grau de identidade, que geralmente são considerados bons quando acima de 25% (PACHECO, 2010). Comparando a Fd1 com as outras proteínas, observou-se identidade de, no mínimo 30% para a Fd 2, Fd 3, Fd 4 e Fd 5, com similaridade superior a 42% (Tabela 2). Entretanto, para a Fd 6 e Fd 7, notou-se uma identidade inferior, sendo 25% para a Fd 6 e 22% para a Fd 7, apesar da similaridade ser maior que 30% (Tabela 2), corroborando com a divergência evolutiva observada nas análises filogenéticas.

Tabela 2 - Resultado da comparação de identidade e similaridade entre a Fd1 (código PDB 1L5P) e as seis demais Fd de *T. vaginalis*

<i>Ferredoxinas</i>	<i>Identidade</i>	<i>Similaridade</i>
1L5P (Fd1)	100%	100%
Fd2	69%	80,5%
Fd3	43%	57%
Fd4	33%	44%
Fd5	31%	42,2%
Fd6	25%	38%
Fd7	22%	36%

5.4 Predição da estrutura 3D das ferredoxinas de *T. vaginalis*

Considerando a identidade entre a Fd 1 e as outras Fd de *T. vaginalis*, os modelos das Fd 2, Fd 3, Fd 4 e Fd 5 foram construídos empregando a modelagem comparativa, utilizando a Fd 1 como molde. Porém, em função da baixa identidade dessa proteína com a Fd 6 e Fd 7, as técnicas de *threading* e de IA também foram utilizadas para a construção de modelos para essas duas Fd. Após construção, os modelos foram otimizados e submetidos às etapas de validação para análise de sua qualidade.

5.4.1 Análise da qualidade estereoquímica dos modelos

Primeiramente, foi analisada a qualidade estereoquímica dos modelos a partir da análise dos gráficos de Ramachandran gerados no programa Procheck. Neste, são avaliadas as combinações dos ângulos phi (ϕ) versus psi (ψ) para todos os carbonos alfa dos resíduos de aminoácidos das estruturas 3D analisadas. Dessa maneira, os aspectos estereoquímicos, bem como os parâmetros da cadeia principal e lateral de cada resíduo podem ser determinados. Os valores de tais combinações são distribuídos em quatro regiões em um gráfico de coordenadas cartesianas: regiões de combinações mais favoráveis, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e desfavoráveis (proibidas). Resíduos em regiões não-permitidas provavelmente possuem átomos que colidem estereoquimicamente (LASKOWSKI et al., 1996; SILVA, 2010). Um modelo é considerado satisfatório quando apresenta uma qualidade boa, em que mais de 90% dos resíduos estão em regiões consideradas favoráveis (LASKOWSKI et al., 1996).

A análise do molde Fd 1 (1L5P) revelou 91,5% dos resíduos em regiões favoráveis e 0% em regiões não permitidas, enquanto os modelos Fd 2-5 apresentaram, respectivamente, 94,9%, 94,5%, 92,5% e 93,6% dos resíduos em regiões favoráveis, e, 0%, 0%, 1,2% e 1,3% em regiões não permitidas (Tabela 3). Os modelos da Fd 4 e Fd 5 foram os únicos que apresentaram o resíduo ASN65 nas regiões não permitidas. Todavia, esse resíduo de aminoácido não está diretamente ligado com a função de transporte de elétrons da enzima e nem está perto do centro [2Fe-2S] (Figura 10).

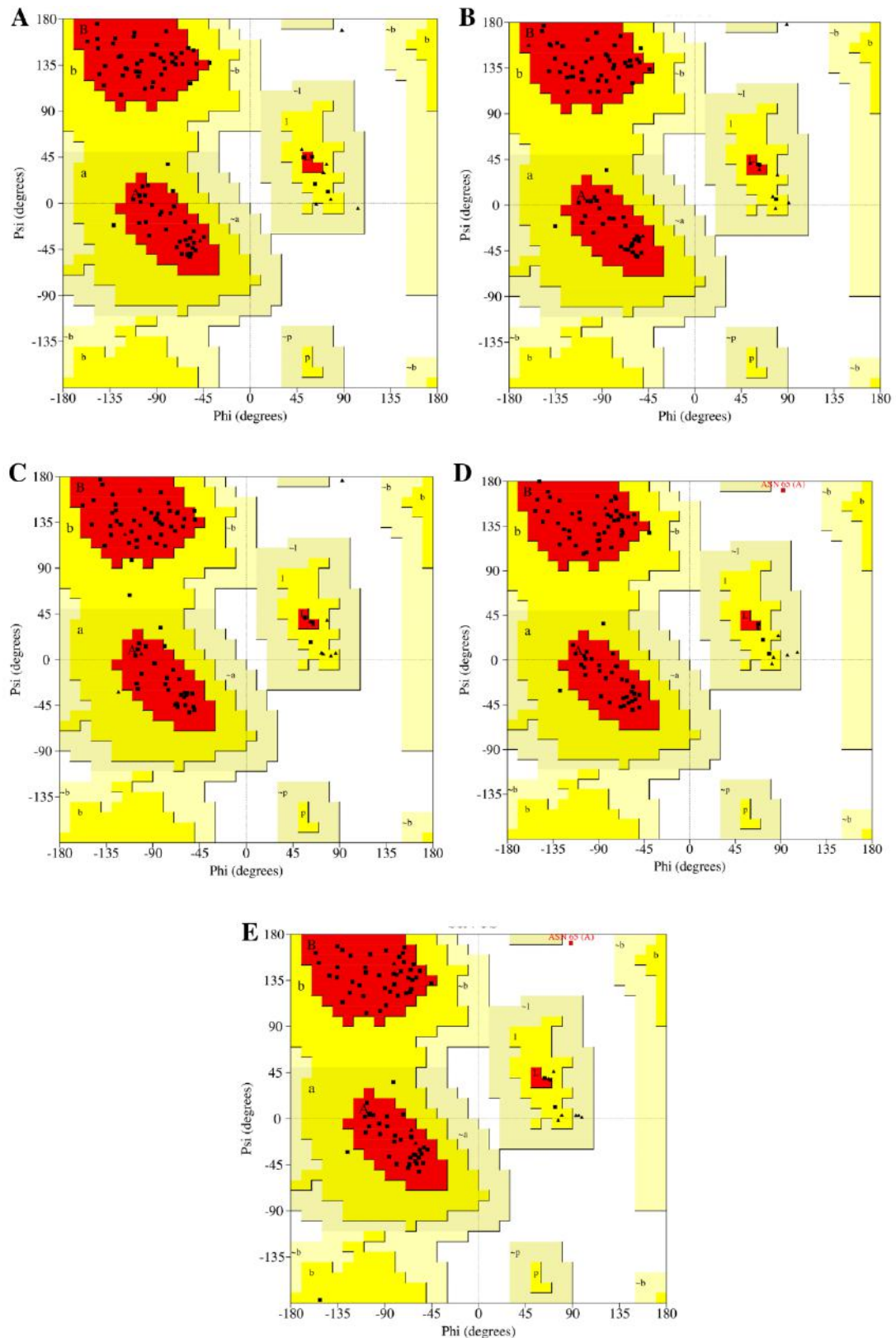


Figura 10 - Análise estereoquímica dos modelos 3D das Fd de *T. vaginalis* por meio de gráficos de Ramachandran. (A) Molde Fd 1 (1L5P); (B) Modelo da Fd 2; (C) Modelo da Fd 3; (D) Modelo da Fd 4; (E) Modelo da Fd 5. Regiões mais favoráveis em vermelho; regiões adicionalmente permitidas em amarelo; regiões generosamente permitidas em bege; regiões desfavoráveis em branco.

Tabela 3 - Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran do molde e das Fd 2-7

<i>Estrutura</i>	<i>Regiões Favoráveis</i>	<i>Regiões Permitidas</i>	<i>Regiões não-permitidas</i>
1L5P (Fd1)	91,5%	8,5%	0%
Fd2	94,9%	5,1%	0%
Fd3	94,5%	5,5%	0%
Fd4	92,5%	6,2%	1,2%
Fd5	93,6%	5,1%	1,3%

Em sequência, os modelos das Fd 6 e 7 gerados pelo método de *threading* apresentaram, respectivamente, 73,4% e 69,6% dos resíduos em regiões favoráveis, e 4,3% e 1,8% em regiões não permitidas (Tabela 4), sendo LIS87, VAL61, TIR45 e LEU2 para a Fd 6 e SER70 e CIS55 para a Fd 7 (Figura 11). Diferente dos modelos de modelagem comparativa, esses resíduos de aminoácidos que estão em regiões não permitidas, estão próximos ao centro [2Fe-2S], e mesmo que não tenham relação com o transporte de elétrons, eles podem de alguma forma interferir na interação do MTZ com o sítio ativo.

A partir dos resultados apresentados, observa-se que os modelos das Fd 6 e 7 gerados por *threading* apresentaram valores significativamente inferiores de resíduos nas regiões favoráveis (73,4% e 69,6%, respectivamente) e superior em regiões não permitidas (4,3% e 1,8%, respectivamente) quando comparados com o molde 1L5P, que foi de 91,5% e 0%, respectivamente. De acordo com esses resultados, os modelos gerados por esta técnica não apresentaram uma qualidade adequada.

Tabela 4 - Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran das Fd 6 e Fd 7, obtidas por *threading*.

<i>Estrutura</i>	<i>Regiões Favoráveis</i>	<i>Regiões Permitidas</i>	<i>Regiões não-permitidas</i>
Fd6	73,4%	22,3%	4,3%
Fd7	69,6%	28,6%	1,8%

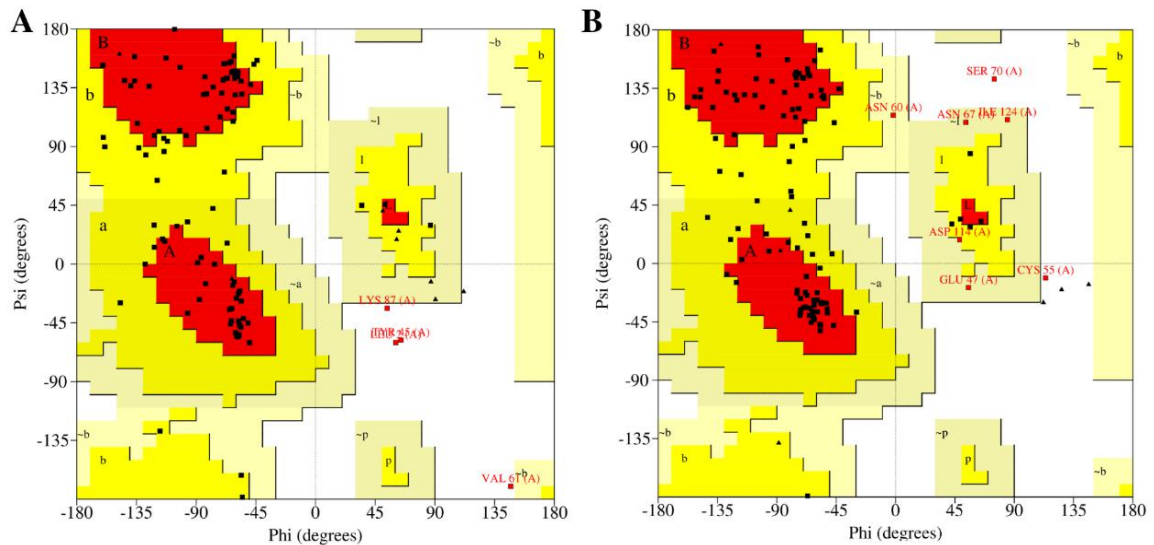


Figura 11 - Análise estereoquímica dos modelos 3D (obtidos por *threading*) das Fd de *T. vaginalis* por meio de gráficos de Ramachandran. (A) Modelo da Fd 6; (B) Modelo da Fd 7. Regiões mais favoráveis em vermelho; regiões adicionalmente permitidas em amarelo; regiões generosamente permitidas em bege; regiões desfavoráveis em branco.

Por conta disso, os modelos das Fd 6 e 7 foram obtidos através do programa *AlphaFold2* utilizando métodos de IA. Estes apresentaram, respectivamente, 86,2% e 89,3% dos resíduos em regiões favoráveis, e nenhum resíduo em regiões não permitidas (Tabela 5). Em comparação com os modelos obtidos pela técnica de *threading*, esses modelos obtiveram valores mais satisfatórios em relação aos aspectos estereoquímicos e aos parâmetros da cadeia principal e lateral, alcançando uma qualidade superior, sem apresentar nenhum resíduo em regiões desfavoráveis (Figura 12).

Tabela 5 - Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran das Fd 6 e 7 obtidas pelo programa *AlphaFold2*.

<i>Estrutura</i>	<i>Regiões Favoráveis</i>	<i>Regiões Permitidas</i>	<i>Regiões não-permitidas</i>
Fd6	86,2%	13,8%	0%
Fd7	89,3%	10,7%	0%

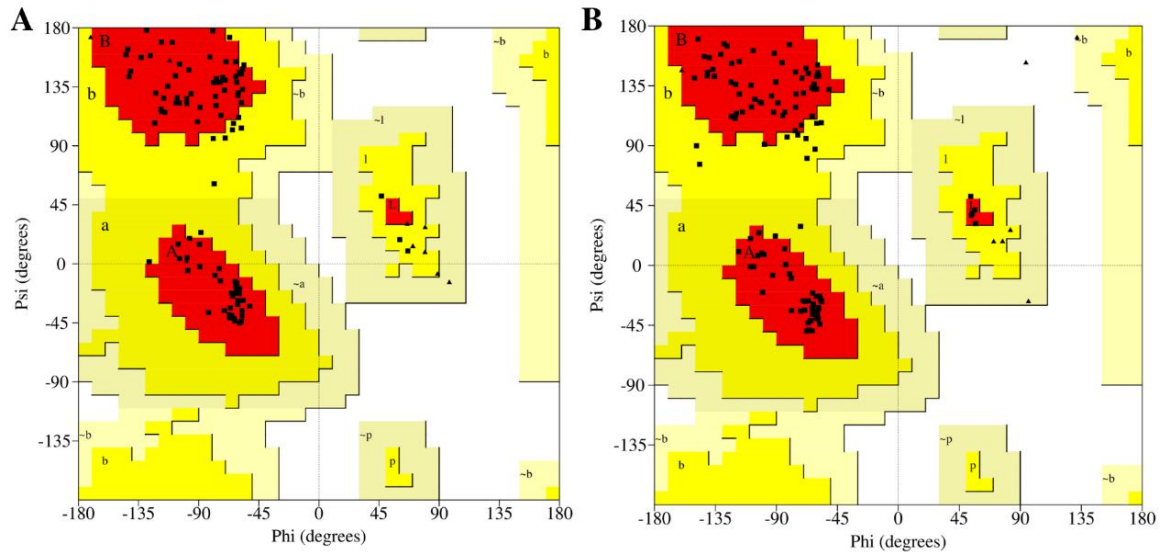


Figura 12 - Análise estereoquímica dos modelos 3D (obtidos por método de IA no programa *AlphaFold2*) das Fd de *T. vaginalis* por meio de gráficos de Ramachandran. (A) Modelo da Fd 6; (B) Modelo da Fd 7. Regiões mais favoráveis em vermelho; regiões adicionalmente permitidas em amarelo; regiões generosamente permitidas em bege; regiões desfavoráveis em branco.

5.4.2 Análise da compatibilidade 3D-1D dos modelos

O *Verify3D* é um programa que gera dados sobre a compatibilidade de um modelo tridimensional de uma proteína com a sua sequência peptídica (estrutura primária). Cada resíduo é caracterizado com base na classe estrutural, sua localização na cadeia principal e sua região (α -hélice, folhas- β , alça, polar, apolar etc.) (SILVA, 2010). A partir daí, é atribuído um *score* 3D-1D para cada resíduo, com base em um banco de dados de estruturas de aminoácidos. A cada 20 resíduos é realizado uma nova análise de aminoácidos, e espera-se que o *score* de cada aminoácido fique acima de 0,2 (BOWIE, LÜTHY, EISENBERG, 1991; RODRIGUES, 2019).

Na análise do perfil do *score* 3D-1D, os modelos das Fd 2-5 de *T. vaginalis* obtidos a partir de modelagem comparativa apresentaram perfis semelhantes ao molde, sendo, respectivamente 98,92%, 86,67%, 86,46% e 94,79%, dos resíduos com *score* 3D-1D maior ou igual a 0,2 (Tabela 6 e Figura 13). Todos os modelos apresentaram bons resultados, mas também as Fd 2 e 5 apresentaram *scores* acima do molde, que é de 87,1% (Tabela 6).

Ainda, a análise do perfil do *score* 3D-1D dos modelos das Fd 6 e 7 obtidos a partir da técnica de *threading* apresentaram, respectivamente 82,73% e 84,40% dos resíduos com *score* 3D-1D maior ou igual a 0,2 (Tabela 7 e Figura 14). Assim, os resultados se mostraram aceitáveis para os dois modelos.

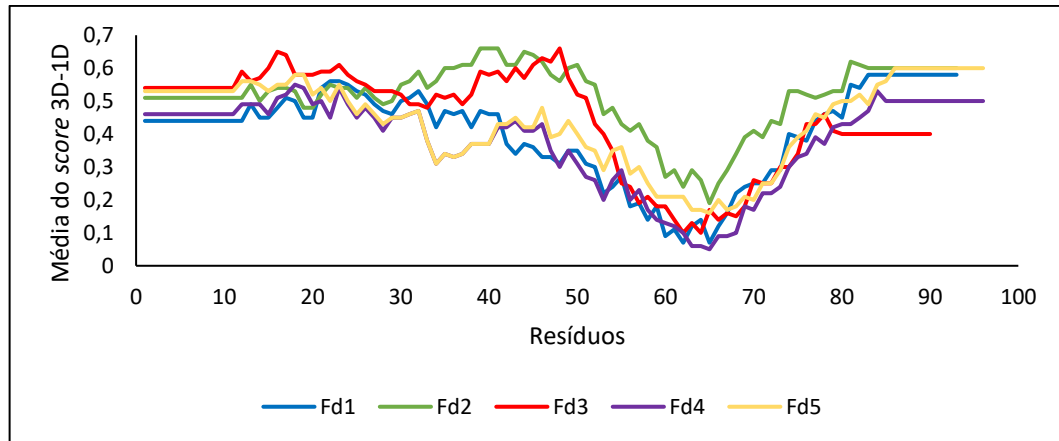


Figura 13 - Análise dos modelos 3D (obtidos por métodos comparativos) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos perfis do *score 3D-1D*.

Tabela 6 - Percentual dos resíduos de aminoácidos do molde 1L5P (Fd1) e das Fd 2-7 de *T. vaginalis* com *score 3D-1D* maior ou igual a 0,2.

<i>Estrutura</i>	<i>Resíduos com score 3D-1D ≥ 0,2</i>
1L5P(Fd1)	87,10%
Fd2	98,92%
Fd3	86,67%
Fd4	86,46%
Fd5	94,79%

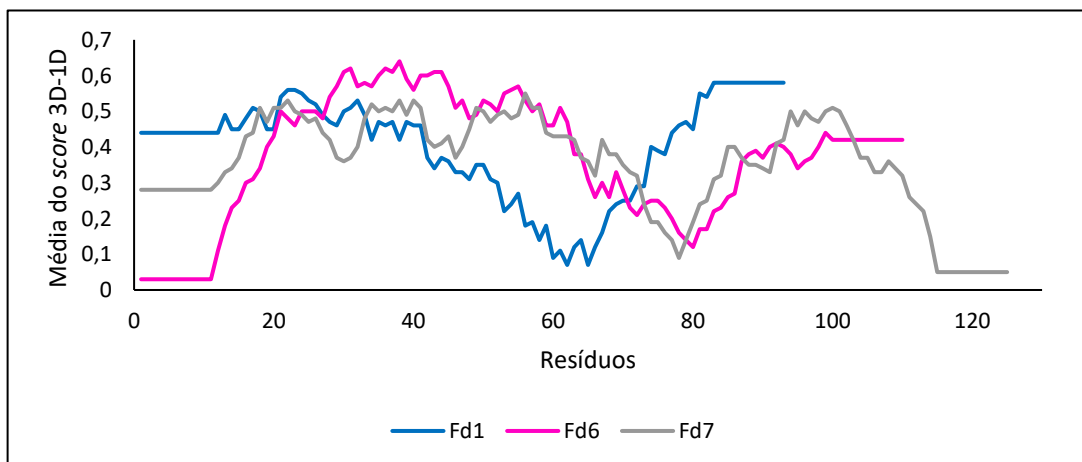


Figura 14 - Análise dos modelos 3D (obtidos por método *threading*) das Fd 6 e 7 de *T. vaginalis* por meio dos Perfis do *score 3D-1D*.

Tabela 7 - Percentual dos resíduos de aminoácidos dos modelos obtidos por *threading* das Fd 6 e 7 de *T. vaginalis* com *score* 3D-1D maior ou igual a 0,2

<i>Estrutura</i>	<i>Resíduos com score 3D-1D ≥ 0,2</i>
Fd6	82,73%
Fd7	82,40%

Finalmente, analisando o perfil *score* 3D-1D dos modelos das Fd 6 e 7 obtidos pelo programa *AlphaFold2*, foi possível observar os resultados de 86,64% para a Fd6 e 82,40% para a Fd 7 (Tabela 8). Assim como os resultados dos modelos construídos por *threading*, esses modelos também mostraram resultados satisfatórios (Figura 15). Além disso, comparando os dois métodos utilizados para a construção dos modelos 6 e 7, a metodologia de IA exibiu resultados melhores, com melhor compatibilidade entre a sequência de aminoácidos e as estruturas 3D preditas.

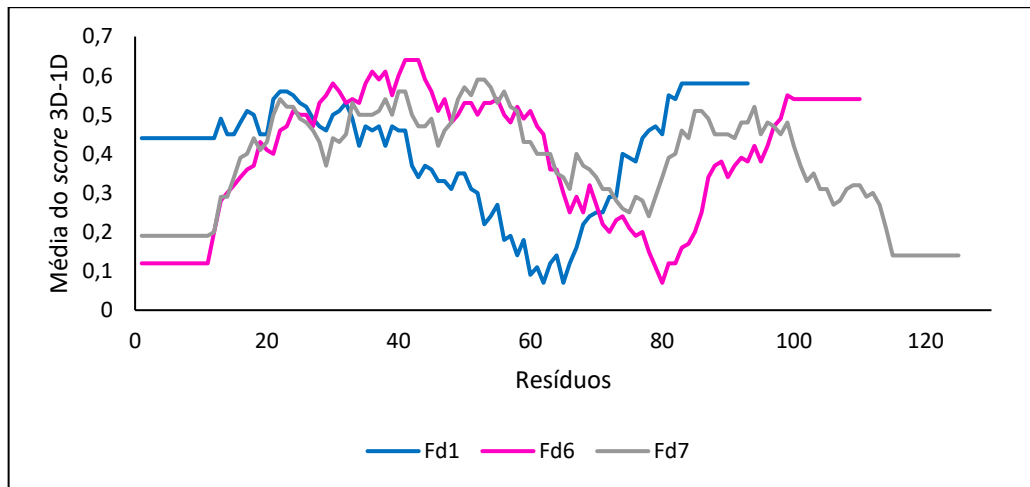


Figura 15 - Análise dos modelos 3D (obtidos por método de IA no programa *AlphaFold2*) das Fd 6 e 7 de *T. vaginalis* por meio dos Perfis do *score* 3D-1D

Tabela 8 - Percentual dos resíduos de aminoácidos dos modelos obtidos pelo programa *AlphaFold2* das Fd 6 e 7 de *T. vaginalis* com *score* 3D-1D maior ou igual a 0,2

<i>Estrutura</i>	<i>Resíduos com score 3D-1D ≥ 0,2</i>
Fd6	86,64%
Fd7	84,80%

5.4.3 Análise da qualidade energética dos modelos

O servidor ProSA-web foi utilizado para analisar as condições energéticas dos resíduos de aminoácidos nos modelos das proteínas que foram construídos. O parâmetro de qualidade analisado é o *score-Z* (índice de qualidade global), que mostra se o modelo estrutural proposto está dentro de um intervalo de minimização de energia aceitável, quando comparado ao *score-Z* obtido a partir de proteínas com estruturas determinadas experimentalmente e que possuem um tamanho semelhante ao da proteína de interesse (SILVA, 2010; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007)

As estruturas das proteínas que servem de parâmetro de comparação foram obtidas por cristalografia e difração de raios X (representação pela região em azul-claro nos gráficos) e por ressonância magnética nuclear (representação pela região em azul-escuro nos gráficos) (SILVA, 2010).

No servidor ProSA-web, os *score-Z* encontrados para os modelos das Fd 2-5 obtidos por modelagem comparativa foram, respectivamente -6,73 -5,91, -5,24 e -5,00, estando todos próximos do valor encontrado para o molde (-5.75). Além disso, todos os valores estão posicionados graficamente de forma semelhante e são compatíveis com os valores de proteínas do mesmo tamanho com estruturas 3D já elucidadas por métodos experimentais (Figura 16).

Em relação ao gráfico de energia de cada resíduo de aminoácido (Figura 17), geralmente, valores positivos correspondem a problemas na estrutura. Analisando os modelos construídos, observa-se que nenhum dos resíduos de aminoácidos das Fd 2-5 apresentou energia suavizada acima de zero, se tornando semelhantes ao molde. Esses resultados indicam boa qualidade do modelo.

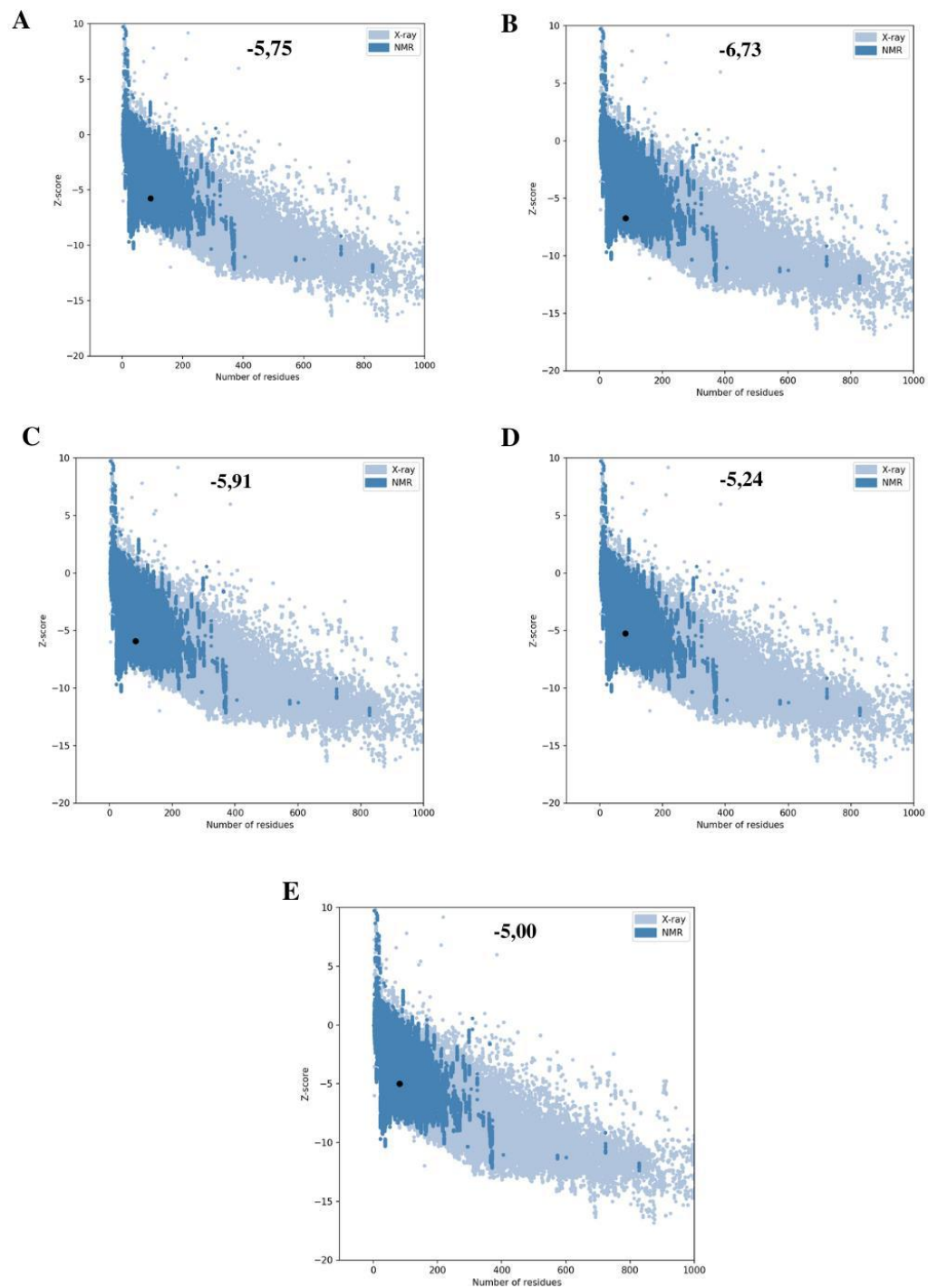


Figura 16 - Análise dos modelos 3D (obtidos por métodos comparativos) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de *score-Z* calculados no ProSA-web. (A) Molde Fd 1 (1L5P); (B) Modelo da Fd 2; (C) Modelo da Fd 3; (D) Modelo da Fd 4; (E) Modelo da Fd 5. Eixo x indica o valor de z-score e o eixo y indica a quantidade de resíduos de aminoácidos. A estrutura analisada está representada pelo ponto preto.

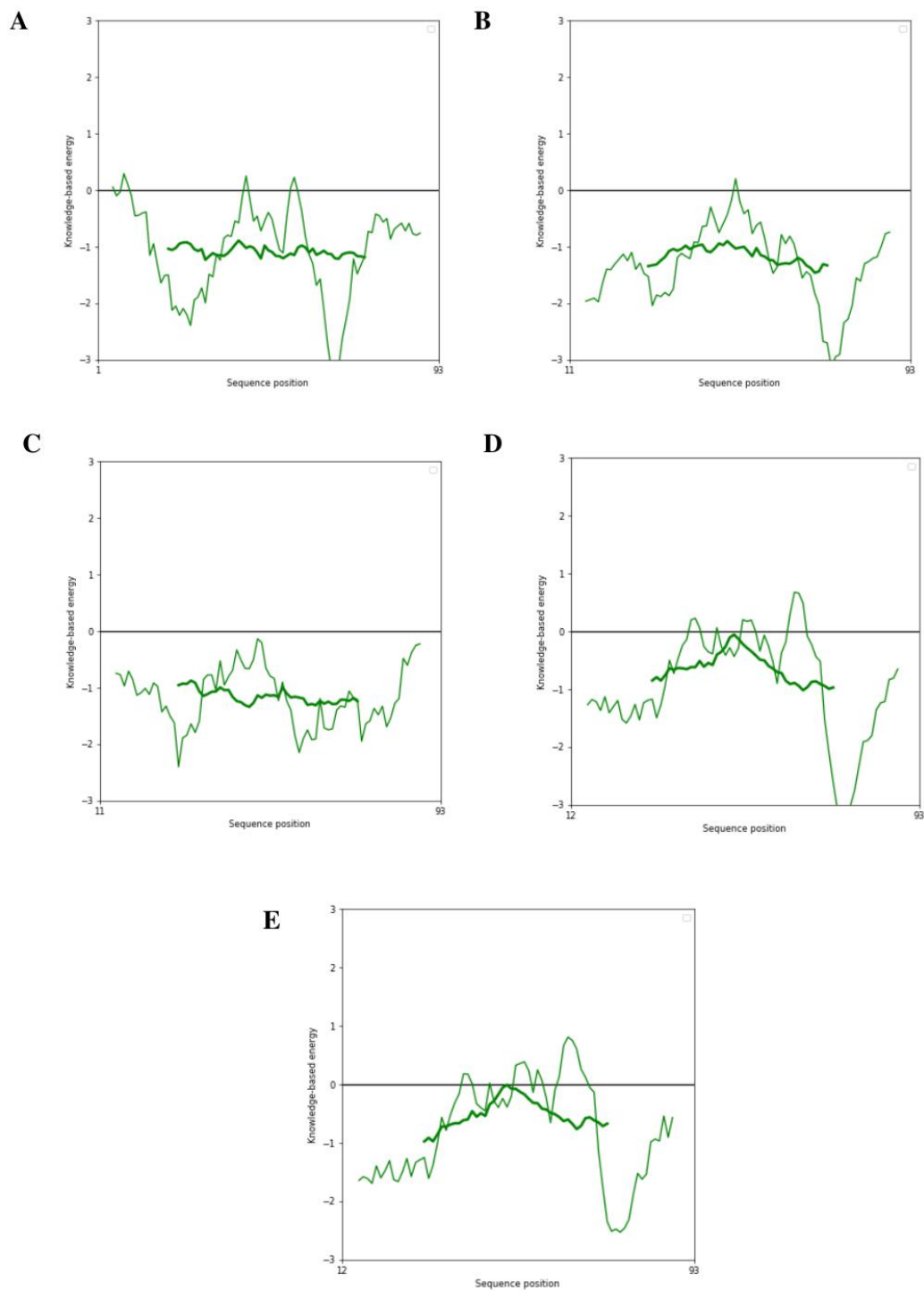


Figura 17 - Análise dos modelos 3D (obtidos por métodos comparativos) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de energia em função de cada resíduo calculados no ProSA-web. (A) Molde Fd 1 (1L5P); (B) Modelo da Fd 2; (C) Modelo da Fd 3; (D) Modelo da Fd 4; (E) Modelo da Fd 5. A linha em verde claro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento (ou janela) de 10 resíduos, enquanto a linha em verde escuro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos.

Para os modelos das Fd 6 e 7 construídos por *threading*, os *score-Z* (esquerda) encontrados foram, respectivamente -6,27 e -5,75, também apresentando proximidade com o valor encontrado para a Fd1 (-5,75). Além disso, todos os valores estão posicionados graficamente de forma semelhante com estruturas 3D já elucidadas por RMN ou cristalografia de raio X (Figura 18).

Analisando o gráfico de energia de cada resíduo de aminoácido (Figura 18), nenhum dos dois modelos apresentaram energia suavizada acima de zero, especificamente a Fd 7, que nesse caso obteve bons resultados.

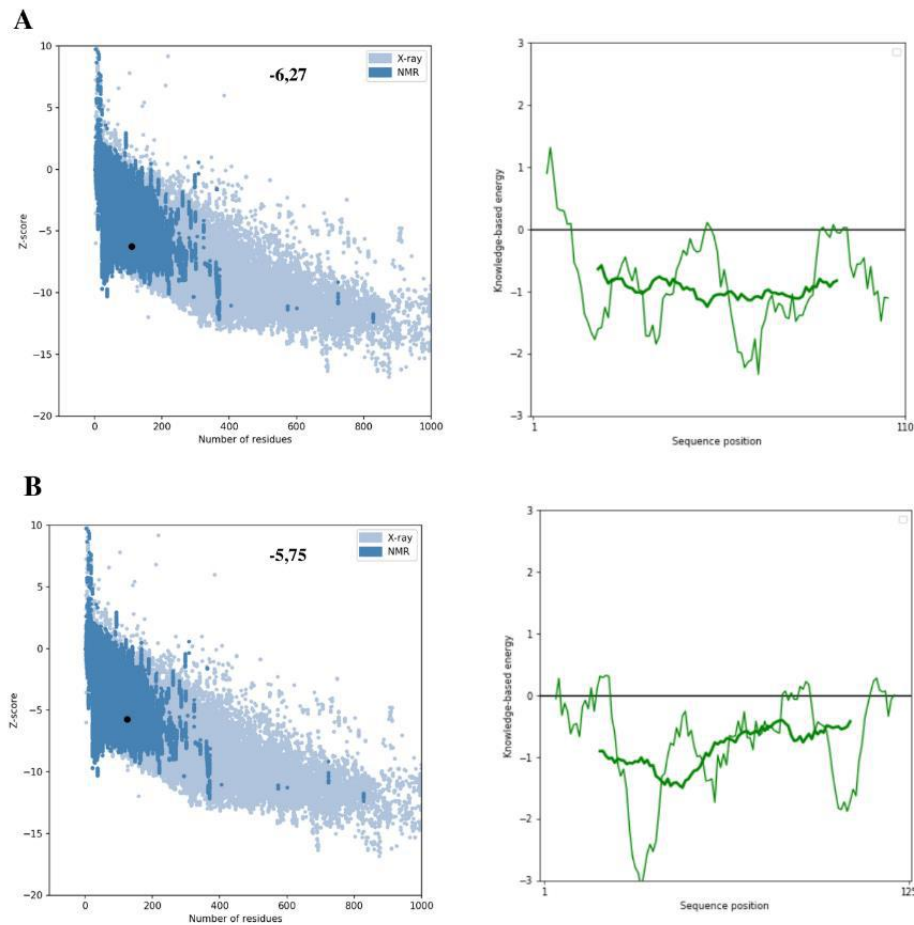


Figura 18 - Análise dos modelos 3D (obtidos por *threading*) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de *score-Z* (esquerda) e dos gráficos de energia em função de cada resíduo (direita) calculados no ProSA web. (A) para a Fd 6; (B) para a Fd 7. Gráfico de *score-Z*: Eixo x indica o valor de *score-z* e o eixo y indica a quantidade de resíduos de aminoácidos. A estrutura analisada está representada pelo ponto preto: A linha em verde claro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento (ou janela) de 10 resíduos, enquanto a linha em verde escuro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos.

Por fim, os modelos das Fd 6 e 7, obtidos pelo programa *AlphaFold2*, apresentaram valores de *score-Z* (esquerda) de -5,48 e -5,38, respectivamente (Figura 19). Assim como as estruturas anteriores, os valores estão posicionados no gráfico de maneira compatível com

outras estruturas 3D que já foram elucidadas por RMN ou cristalografia de raio X (Figura 18). A análise do gráfico de energia (direita) de cada resíduo de aminoácido (Figura 19), mostrou que os dois modelos não apresentaram energia suavizada acima de zero, indicando a qualidade do modelo.

Quando comparados com os modelos construídos por *threading*, os modelos obtidos pelo programa *AlphaFold2* mostraram valores de *Z-score* mais próximos do molde Fd1 (1L5P).

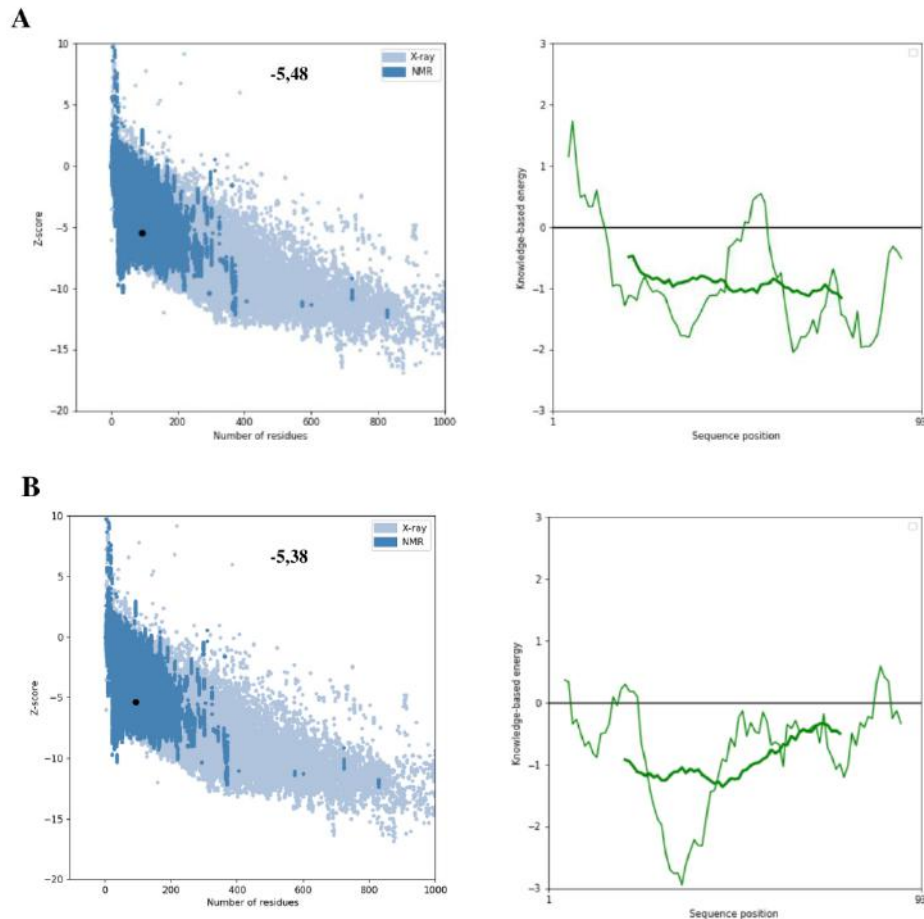


Figura 19 - Análise dos modelos 3D (obtidos por método de IA no programa *AlphaFold2*) das Fd de *T. vaginalis* por meio dos gráficos de *score-Z* (esquerda) e dos gráficos de energia em função de cada resíduo (direita) calculados no ProSA web. (A) para a Fd 6; (B) para a Fd 7. Gráfico de *score-Z*: Eixo x indica o valor de *score-z* e o eixo y indica a quantidade de resíduos de aminoácidos. A estrutura analisada está representada pelo ponto preto. A linha em verde claro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento (ou janela) de 10 resíduos, enquanto a linha em verde escuro indica a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada fragmento de 40 resíduos.

Coletivamente, os dados obtidos indicaram que os modelos das Fd 2-5 obtidos por modelagem comparativa e os modelos das Fd 6 e 7 obtidos pelo programa *AlphaFold2* foram os que apresentaram os melhores resultados e qualidade durante a validação das estruturas. Dessa maneira, eles foram selecionados para dar continuidade nas análises de caracterização estrutural e estudos de *docking*.

5.5 Análise das características estruturais dos modelos 3D das Fd 2-7 de *T. vaginalis*

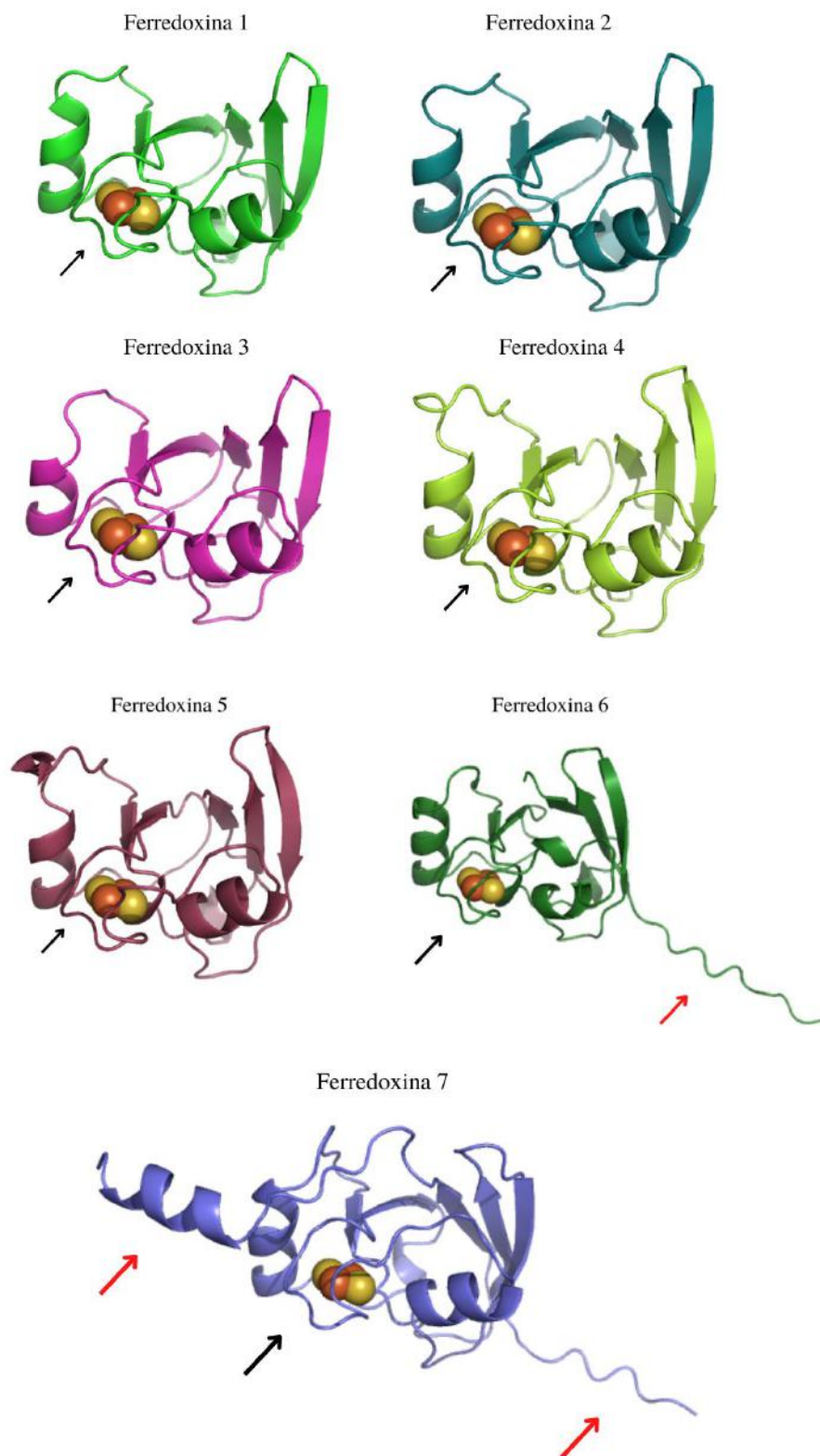


Figura 20 - Estruturas 3D da Fd1 (código PDB 1L5P) e dos modelos das Fd 2-7 construídos. As setas apontam para a alça que envolve o centro Fe-S, sendo este representado pelas esferas laranja, para o ferro e amarela para o enxofre. As setas vermelhas indicam a regiões preditas como desordenadas.

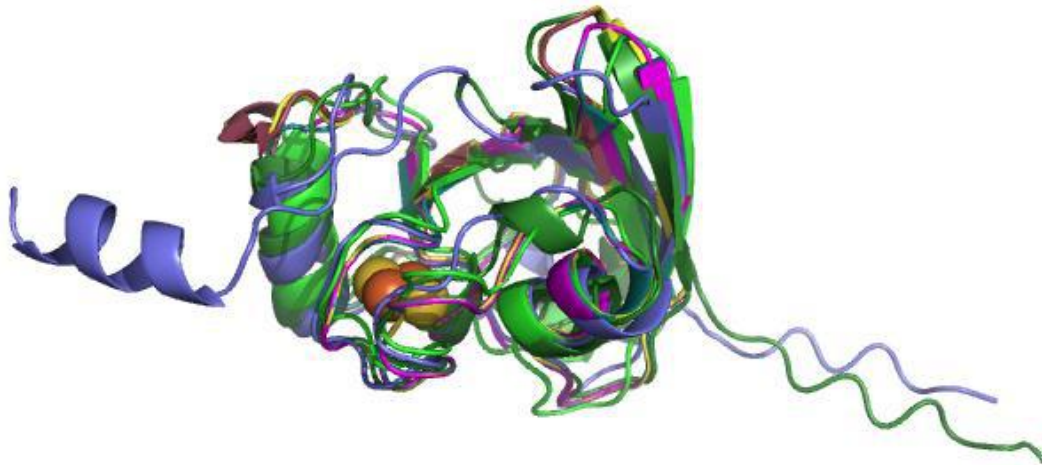


Figura 21 – Alinhamento das estruturas 3D da Fd1 (código PDB 1L5P) e dos modelos das Fd 2-7 de *T. vaginalis*.

Tabela 9 - Valores de RMSD calculados a partir a sobreposição das estruturas 3D do modelo com o molde 1L5P utilizando o programa PyMOL. Valores menores de RMSD indicam maior similaridades entre as estruturas.

<i>Ferredoxinas</i>	<i>RMSD</i>
Fd2	0,10 Å
Fd3	0,22 Å
Fd4	0,23 Å
Fd5	0,23 Å
Fd6	1,48 Å
Fd7	3,23 Å

As Fd de *T. vaginalis* apresentaram um arcabouço estrutural semelhante, apesar dos diferentes níveis de identidade entre as sequências de aminoácidos (Figura 20 e 21). Comparando as Fd 1-5, que apresentam maior identidade entre si, foi possível observar que as estruturas 3D dessas proteínas apresentaram elevada similaridade, evidenciada pelos valores do desvio quadrático médio (RMSD) relativamente baixos, variando de 0,10 Å a 0,23 Å (Tabela 10). Em contrapartida, as Fd 6 e 7 apresentaram maior variação estrutural em relação a Fd 1, o que foi demonstrado pelos maiores valores de RMSD (1,48 Å e 3,23 Å, respectivamente). De modo interessante, essa divergência estrutural está de acordo com o resultado mostrado na filogenia molecular, onde a Fd 7, durante o tempo, foi a que mais se distanciou das outras Fd de *T. vaginalis*.

Quando se compara a semelhança estrutural entre todas as proteínas, foi observada maior similaridade entre as estruturas das Fd 4 e 5, o que foi evidenciado por um RMSD de 0,06 Å (Tabela 10), em acordo com os resultados encontrados na análise da filogenia molecular.

Contudo, apesar da elevada diferença estrutural com a Fd 1 e 2 (3,231 Å e 3,027 Å, respectivamente), a Fd 7 apresentou estrutura mais similar com as Fd 3, 4, 5 e 6, sendo representada pelos valores 1,548 Å, 1,638 Å, 1,496 Å, 1,467 Å, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10 - Matriz de RMDS entre as Fd 1-7 de *T. vaginalis*

	Fd 1	Fd 2	Fd 3	Fd 4	Fd 5	Fd 6	Fd 7
Fd 1	0	0,10	0,22	0,23	0,23	1,48	3,23
Fd 2		0	0,13	0,12	0,14	1,54	3,02
Fd 3			0	0,18	0,17	1,78	1,54
Fd 4				0	0,06	1,49	1,63
Fd 5					0	1,54	1,49
Fd 6						0	1,46
Fd 7							0

A alça que envolve o centro de ferro-enxofre dessas proteínas é composta pelos resíduos 45 a 59 e há relatos na literatura de que, devido à sua flexibilidade, ela pode desempenhar um papel importante durante a interação do MTZ com as Fd, quando essas estão em seu estado reduzido (WEKSBERG, et al., 2007). Na comparação entre as Fd construídas e o molde, observou-se que os elementos de estruturas secundárias se mantiveram semelhantes entre todas elas, incluindo a conformação da α_1 , uma hélice proeminente que é encontrada em todas as Fd [2Fe-2S] conhecidas (CROSSNOE et al., 2002). A exceção foi a Fd 6, em que a conformação da hélice α_1 não pôde ser observada (Figura 20).

Em relação às estruturas da Fd 6 e 7, observaram-se regiões N-terminais desordenadas (regiões apontadas pelas setas vermelhas) (Figura 20). Essas regiões indicam que o programa não conseguiu encontrar um molde de estruturas secundárias adequado para essa região, então ele considerou termos energéticos e buscou a conformação de menor energia. Entretanto, acredita-se que os resíduos de aminoácidos que formam essas regiões apresentadas com uma conformação diferente fazem parte de uma sequência de endereçamento que é removida proteoliticamente após a translocação para o hidrogenossomo (JOHNSON et al., 1990; LAHTI; JOHNSON, 1991; PLUMPER; BRADLEY; JOHNSON, 2000). Porém, ainda não há dados na literatura se esse processamento pós-traducional realmente acontece com as demais Fd, além da Fd1.

As estruturas das Fd 2-5 apresentaram semelhança tanto nas estruturas secundárias, quanto nas alças (*loops*), mas essa semelhança não foi tão grande entre as Fd 6 e 7. Mais

especificamente, quando analisada a região do sítio ativo, onde está presente a alça que envolve o centro de ferro-enxofre, as Fd 2-5 mostraram menor diferença enquanto as Fd 6 e 7 foram as que visivelmente apresentaram maiores diferenças nessa região, sendo possível notar um pouco de variação entre elas (Figura 20 e 21).

Além disso, uma análise dos resíduos de cisteína foi feita e foi observado que as quatro cisteínas (CIS50, CIS56, CIS59 e CIS95) que coordenam o centro se mantiveram conservadas em todas as estruturas (Figura 22). Apesar de algumas diferenças terem sido encontradas, não houve mudanças estruturais significativas na região do sítio catalítico.

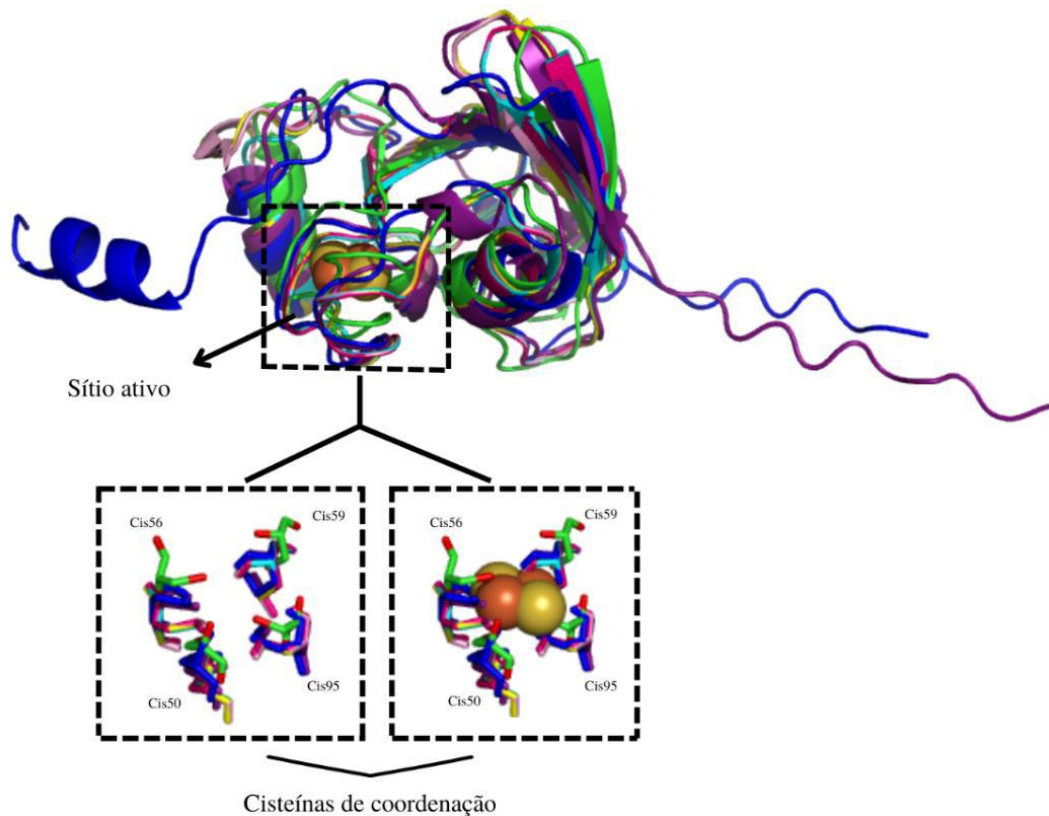


Figura 22 - Alinhamento das Fd 1-7 de *T. vaginalis* (obtidas por modelagem comparativa e pelo *AlphaFold2*) com foco no sítio ativo (centro [2Fe-2S]) e nas suas quatro cisteínas de coordenação. Fd1: Estrutura em verde; Fd2: Estrutura em azul ciano; Fd3: Estrutura em rosa; Fd4: Estrutura em amarelo; Fd5: Estrutura em rosa claro; Fd6: Estrutura em roxo; Fd7: Estrutura em azul.

Embora as regiões de alças tenham sido as que mais apresentaram variações (Figura 22), a conformação da alça que envolve o centro [2Fe-2S] exibiu certa semelhança entre todos os modelos, mesmo que nem todos os resíduos de aminoácidos sejam conservados (Figura 23). Não foram observadas substituições de resíduos de aminoácidos por resíduos muito volumosos, como triptofano, fenilalanina, tirosina e histidina, sugerindo que a aproximação e interação de ligantes com o centro metálico não seriam afetadas por um impedimento estérico (Figura 23).

Entretanto, notaram-se divergências nas propriedades físico-químicas desses resíduos, como o resíduo 49 da Fd 1 (Figura 24), que é uma treonina (resíduo polar) que é substituída por uma lisina (resíduo básico) nas Fd 4 e 5, por um aspartato (resíduo ácido) na Fd 6 ou por uma alanina (resíduo apolar) na Fd 7. Já na posição 55, as Fd 1, 2, 3, 4, 5 e 7 possuem resíduos apolares enquanto a Fd 6 possui uma serina, que é um resíduo polar. Na posição 58, as Fd 1, 2 e 3 possuem uma lisina (resíduo básico), enquanto as Fd 4 e 5 possuem glutamato (resíduo ácido), a Fd 6 apresenta uma leucina (resíduo apolar) e a Fd 7 tem uma treonina (resíduo polar). Essas diferenças podem afetar na interação com o ligante, ou até na aproximação do MTZ com o centro [2Fe-2S], e por isso, as diferentes Fd podem vir a apresentar diferentes interações.

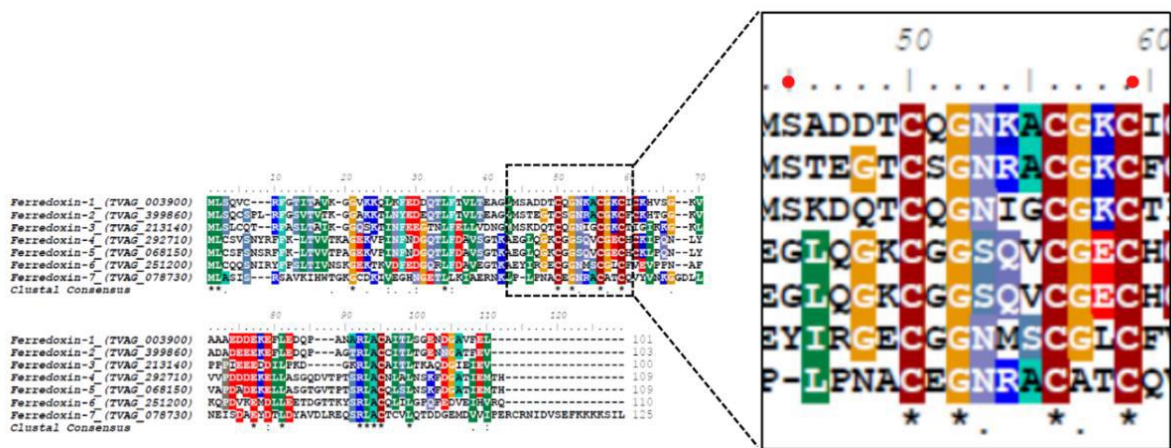


Figura 23 - Região do alinhamento múltiplo composta pelos resíduos de aminoácidos que formam a alça que cobre o centro [2Fe-2S] e suas diferenças entre as Fd 1-7. Pontos vermelhos indicam os resíduos de aminoácidos de início e fim da alça.

A análise da distribuição de cargas nas proteínas também fornece informações valiosas que podem revelar detalhes de interações da proteína com outras moléculas. Por isso, foram analisados os mapas de potencial eletrostático dos modelos e comparado com o mapa da Fd1. A análise dos mapas de potencial eletrostático das Fd apresentou um perfil similar entre as Fd 1, 2 e 6, e entre as Fd 4 e 5, sendo as Fd 3 e 7 as mais diferentes. Quando se considera a região de ligação do centro [2Fe-2S], as Fd 1, 2, 4, 5 e 6 exibiram regiões predominantemente negativas, seguidas de regiões neutras. Já a Fd 3, apresentou resultados mais divergentes, com predominância de regiões neutras e presença de cargas positivas, possuindo uma semelhança com a Fd 7, devido às áreas neutras, apesar de ser possível observar regiões de cargas positivas e negativas (Figura 24). Vale a pena ressaltar que essas divergências apresentadas em regiões próximas do sítio catalítico, podem resultar em alterações na interação dessas enzimas com o ligante. Além disso, essas divergências podem também refletir características funcionais distintas de cada Fd, indicando que talvez participem de processos biológicos diferentes.

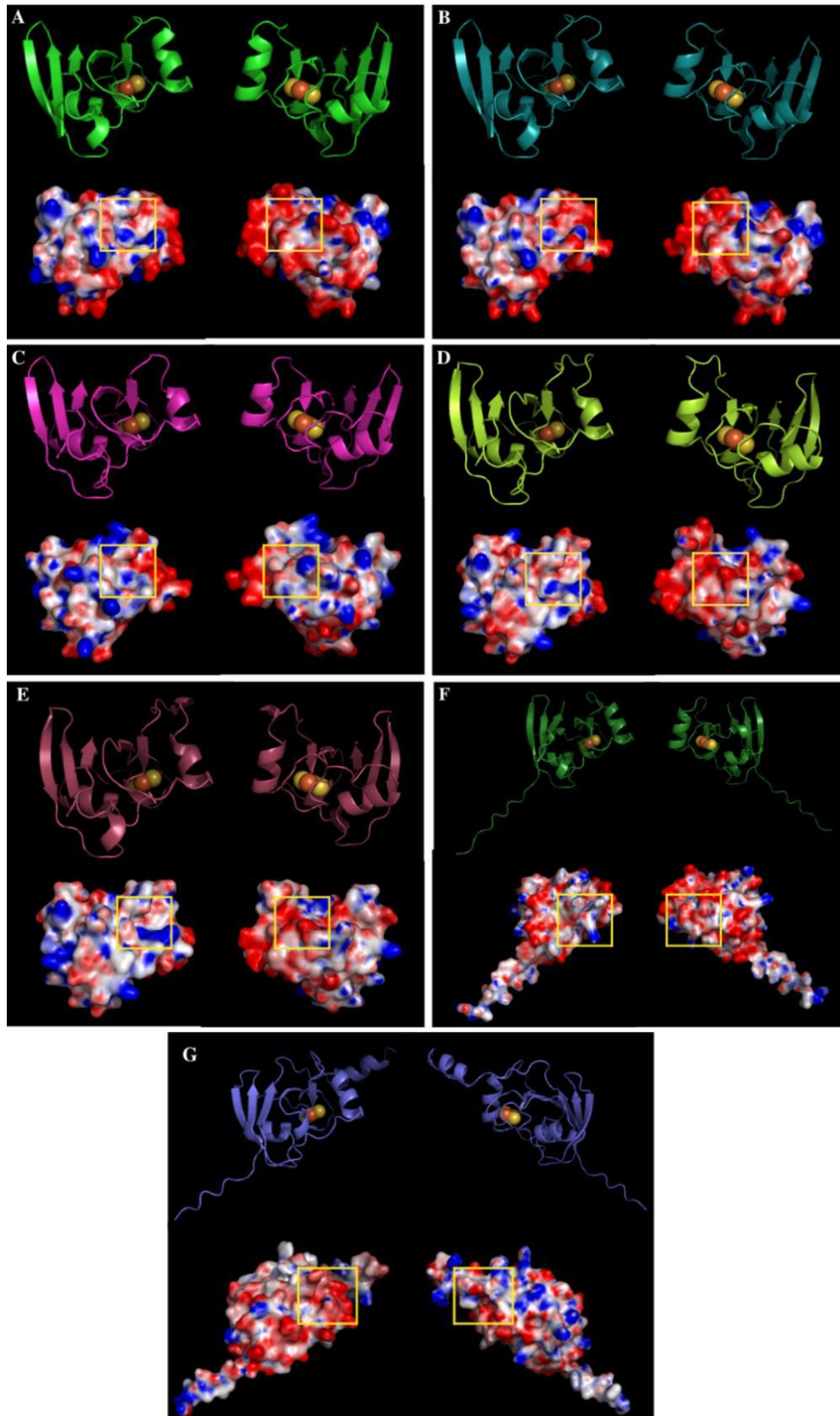


Figura 24 - Mapa de potencial eletrostático das Fd 1-5 de *T. vaginalis*. (A) Molde 1L5P (Fd1); (B) Fd 2; (C) Fd 3; (D) Fd 4; (E) Fd 5.; (F) Fd 6; (G) Fd 7. Estrutura 3D mostrando as regiões α -hélices e folhas β acima e os mapas de potencial eletrostático abaixo da estrutura 3D das enzimas. Os mapas mostram as regiões positivas em azul, as regiões negativas em vermelho, e as regiões neutras em branco. A região do sítio catalítico está destacada em amarelo. A faixa de variação usada foi de -10 a 10.

5.6 Avaliação das interações do metronidazol com as ferredoxinas 1-7 de *T. vaginalis* por *docking* molecular

Para a avaliação das interações entre o fármaco MTZ e as Fd 1-7 de *T. vaginalis*, foram realizados estudos de *docking* molecular. O MTZ apresentou orientações e conformações diferentes nas Fd, porém, em todas elas ele se ligou à superfície da proteína, próximo ao centro [2Fe-2S] (Figura 25). Nas Fd 1 e 2, o MTZ apresentou conformação favorável para a interação com o átomo de Fe1 do centro [2Fe-2S], ou seja, o grupo nitro estava orientado para o átomo de Fe1. Entretanto, não se pode observar o mesmo para a Fd 3, uma vez que o grupo nitro do fármaco apresentou uma orientação oposta ao Fe1 do centro, com uma distância de 11,21 Å, sendo a maior distância para todas a Fd (Tabela 11). De acordo com a análise filogenética e com o alinhamento, mesmo a Fd 3 possuindo um bom nível de similaridade com as Fd 1 e 2, ela não apresenta relação direta com essas Fd, o que possivelmente reflete no modo de interação diferente com o MTZ.

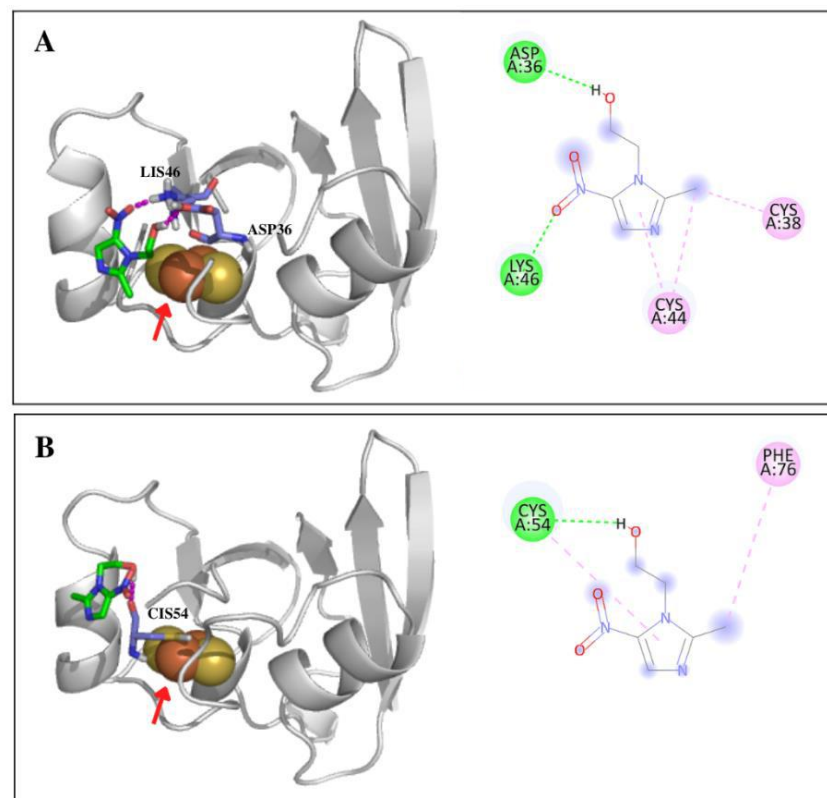


Figura 25 - Imagem mostrando o modo de ligação previsto do MTZ. Em verde as poses do MTN nas Fd. Nas imagens à esquerda, os átomos de ferro do centro [2Fe-2S] estão representados pelas esferas laranja e o átomo de Fe1 está indicado pela seta vermelha. Os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas. Nas imagens à direita, as ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em rosa (esquerda) e verde escuro (direita). Resíduos com interações do tipo Van der Waals estão representados em verde claro. Parte 1

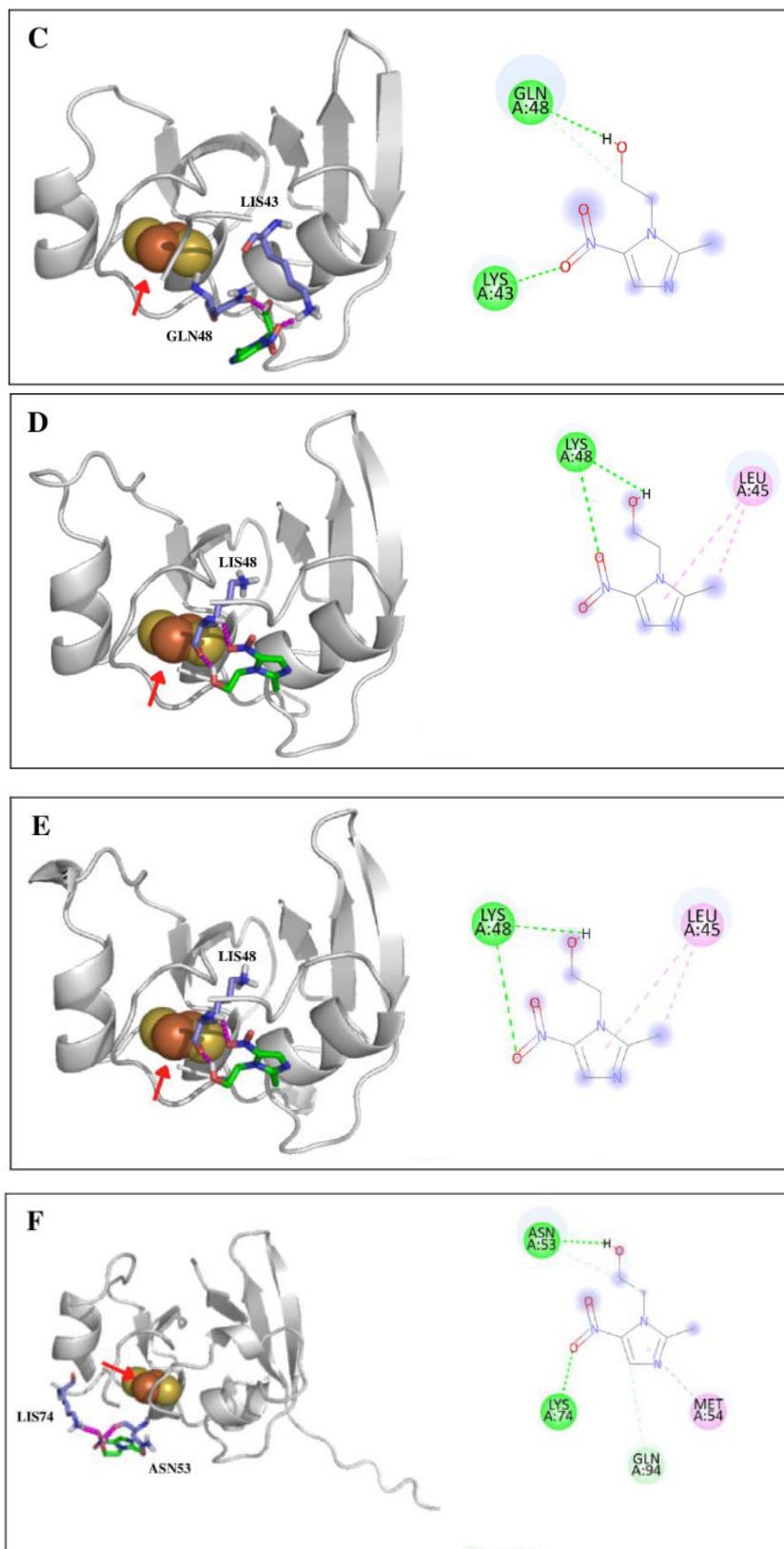


Figura 25 - Imagem mostrando o modo de ligação previsto do MTZ. Em verde as poses do MTN nas Fd. Nas imagens à esquerda, os átomos de ferro do centro [2Fe-2S] estão representados pelas esferas laranja e o átomo de Fe1 está indicado pela seta vermelha. Os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas. Nas imagens à direita, as ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em rosa (esquerda) e verde escuro (direita). Resíduos com interações do tipo Van der Waals estão representados em verde claro. Parte 2

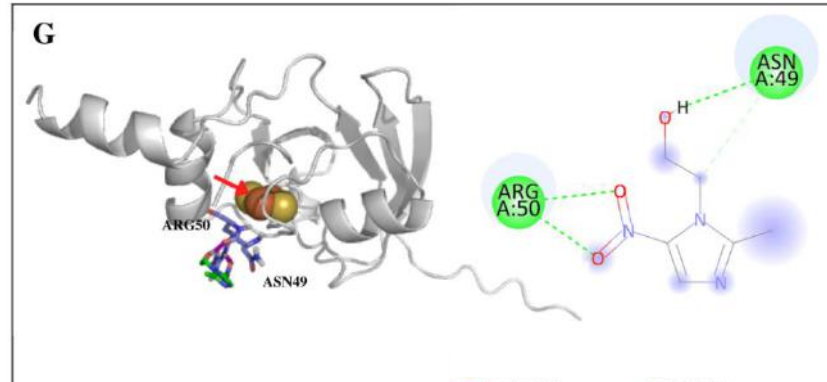


Figura 25 - Imagem mostrando o modo de ligação previsto do MTZ. Em verde as poses do MTN nas Fd. Nas imagens à esquerda, os átomos de ferro do centro [2Fe-2S] estão representados pelas esferas laranja e o átomo de Fe1 está indicado pela seta vermelha. Os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas. Nas imagens à direita, as ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em rosa (esquerda) e verde escuro (direita). Resíduos com interações do tipo Van der Waals estão representados em verde claro. Parte 3

Tabela 11 - Distância entre o grupo nitro do MTZ e o átomo de Fe1 do centro [2Fe-2S] e suas respectivas energias de ligação.

Ferredoxinas	Distância entre o grupo nitro do MTZ e o átomo de Fe1 (Å)	Energia de ligação (Kcal/mol)
Fd1	8,01	-2,05
Fd2	7,69	-1,35
Fd3	11,21	-1,42
Fd4	9,72	-1,65
Fd5	9,75	-1,65
Fd6	8,96	-1,94
Fd7	8,41	-1,69

De modo interessante, as únicas Fd que obtiveram semelhanças em relação às interações foram as Fd 4 e 5, onde o MTZ apresentou a orientação similar e favorável para a interação com o Fe1, além de interagir com a LIS48 (Figura 25). Conseqüentemente, a distância entre o grupamento nitro do MTZ e o átomo de Fe1 do centro (9,72 Å para a Fd 4 a 9,75 Å para a Fd 5) assim como a energia de ligação com o fármaco (-1,65 Kcal/mol) (Tabela 11) foram próximas, sugerindo afinidade teórica similar. É importante lembrar que essas duas proteínas

são muito semelhantes, então esses resultados estão de acordo com o que foi observado na matriz de similaridade e nas análises filogenéticas.

No caso do *docking* nas Fd 6 e 7, o MTZ apresentou conformações com o grupo nitro orientado para o átomo de Fe1 do centro [2Fe-2S], com a interação do MTZ ocorrendo em sítios expostos à superfície parecidos para essas duas Fd, mas diferente de todas as outras Fd (Figura 25). Como resultado do modo de ligação similar, também se observaram a distância entre o grupamento nitro do MTZ com o átomo de Fe1 (8,96 Å para Fd 6 e 8,41 Å para Fd 7) e energia de ligação (-1,94 Kcal/mol para Fd 6 e -1,69 Kcal/mol para Fd 7) semelhantes para ambas as proteínas (Tabela 11). A diferença no modo de ligação do MTZ com essas duas Fd pode estar associada à divergência evolutiva dessas enzimas em relação às outras, principalmente a Fd 7, como visto nas filogenias (Figura 7 e 8)

Comparando as energias de ligação previstas para o MTZ nas diferentes Fd de *T. vaginalis*, o fármaco apresentou energia de ligação similares entre todas elas, variando de -2,05 Kcal/mol com a Fd 1 a -1,35 Kcal/mol com a Fd 2, indicando a maior afinidade teórica com a Fd 1. Contudo, isso não foi observado para a distância entre o MTZ e o átomo de Fe1, que variou de 7,69 Å na Fd 2 a 11,21 Å na Fd 3 (Tabela 11).

No mecanismo proposto para a ativação do MTZ, um elétron é transferido pelo átomo de Fe1 para o MTZ, oxidando o centro [2Fe-2S] (WEKSBERG, *et al.*, 2007). A identificação do caminho de elétrons mais favorável para cada um dos átomos doadores de elétrons na enzima foi calculada por Crossnoe e colaboradores através de uma variedade de possíveis rotas de transferências de elétrons, e como resultado, os maiores valores da constante de acoplamento foram obtidos com o átomo de Fe1 como doador de elétrons (CROSSNOE, *et al.*, 2002).

Estudos realizados com a estrutura cristalográfica da Fd 1 mostraram a presença de uma fenda que expôs modestamente o centro [2Fe-2S] do sítio ativo (CROSSNOE, *et al.*, 2002). Todavia, estudos de dinâmica molecular entre os estados reduzido e oxidado da Fd mostraram que, na simulação com a estrutura no estado reduzido, a alça que cobre o centro [2Fe-2S] se desloca e leva à criação de uma fenda ampla e exposição do sítio ativo, permitindo o acesso de moléculas pequenas como o MTZ ao centro [2Fe-2S]. Essa mudança conformacional da estrutura reduzida da Fd 1 ocorreu logo no início da simulação e permaneceu com a conformação da alça aberta durante a maior parte da simulação, sugerindo que essa alteração conformacional é importante (WEKSBERG, *et al.*, 2007).

Além disso, foi descrito que essas mudanças conformacionais perto do sítio ativo ocorreram anteriormente entre Fd [2Fe-2S] com estado reduzido e oxidado de outras espécies como a Fd das bactérias *Anabaena* e *Pseudomonas putida*, indicando que esse movimento

próximo ao centro redox pode estar associado com o estado de oxidação (MORALES, et al., 1999; SEVRIUKOVA, 2005; WEKSBERG, *et al.*, 2007).

Esperava-se que o MTZ estabelecesse interações com o átomo de Fe1 dos centros [2Fe-2S] das Fd de *T. vaginalis*. Entretanto, os resultados obtidos não corroboram com essa hipótese, pois mesmo com a conformação do grupo nitro do MTZ estando orientada para o átomo de Fe1 na maioria dos modelos, nenhum deles interagiu de maneira direta com esse átomo. Cabe ressaltar que a maioria dos modelos foi construída com base na estrutura da Fd1 no estado oxidado, com o centro [2Fe-2S] coberto por uma alça, o que pode ter influenciado na interação do fármaco com esse grupo e, conseqüentemente, impedindo a possível interação do MTZ com o átomo Fe1.

Em contrapartida, Marcus e colaboradores realizaram estudos de *docking* molecular com o ornidazol, um derivado 5-nitroimidazólico e a Fd1 de *T. vaginalis*. A partir das diferentes simulações computacionais realizadas, duas supostas rotas de transferência de elétrons através de diferentes resíduos da proteína foram identificadas para ativação desta substância: sendo uma do átomo de enxofre 1 e outra do Fe2, via CIS47 e LIS46 (MARCUS, et al., 2016).

É interessante ressaltar que, no *docking* realizado com a Fd 1, o MTZ interagiu com a LIS46, assim como no *docking* da Fd 1 com o ornidazol, realizado por Marcus e colaboradores (2016). Isso sugere que essa hipótese de transferência de elétrons entre os resíduos de aminoácidos da proteína pode vir de fato a ocorrer. Entretanto, essa interação não pôde ser observada para nenhum dos modelos de Fd, visto que o MTZ não estabeleceu interações com os resíduos de lisina equivalentes, apesar do MTZ interagir com as LIS43, LIS48 e LIS74 nas Fd 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Dessa maneira, estudos de dinâmica molecular com as Fd de *T. vaginalis* em sua forma apo e em complexo com o MTZ serão de grande importância para investigar melhor como ocorre a transferência de elétrons do centro [2Fe-2S] para o MTZ, ocasionando a sua ativação e ação antiprotozoária.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, as reconstruções filogenéticas mostraram que todas as Fd de *T. vaginalis* estão mais relacionadas com as Fd de animais (adrenodoxinas mitocondriais) do que com as Fd encontradas nos plastídeos de vegetais. As Fd 1-6 de *T. vaginalis* parecem ter divergido a partir de um ancestral comum na base dos Parabasalia e são agrupadas com as adrenodoxinas de outros eucariotos. Além disso, duplicações gênicas ocorridas ao longo da evolução na linhagem que originou *T. vaginalis* geraram um ramo contendo as Fd 1, 2, e 3 e outro abrigando as Fd 4, 5 e 6. Já a Fd 7 parece ser exclusiva da linhagem Parabasalia, não estando agrupada com as adrenodoxinas convencionais.

Modelos tridimensionais das Fd 2-7 de *T. vaginalis* foram construídos e validados empregando métodos de modelagem comparativa e inteligência artificial. De modo geral, as Fd do parasito apresentam similaridades estruturais, conservando as quatro cisteínas que coordenam o centro [2Fe-2S]. No entanto, diferenças na composição de uma alça que cobre esse centro foram observadas, o que também está relacionado com às diferentes distribuições de cargas notadas nessa região.

Os estudos de *docking* molecular do fármaco MTZ com as Fd 1-7 indicou que o fármaco apresenta afinidade teórica similar com essas proteínas, e foi observada uma orientação favorável para a interação com o centro [2Fe-2S] em todas as Fd, exceto com a Fd 3. Ainda assim, o grupo nitro estava distante do átomo Fe1 do centro [2Fe-2S], sugerindo a ausência de interação significativa entre eles. Possivelmente, esses resultados são decorrentes da predição das estruturas a partir de uma proteína ligada a um centro [2Fe-2S] no estado oxidado, quando a alça que encobre o centro impede que o MTZ se ligue no sítio previsto de interação. Portanto, estudos de dinâmica molecular são necessários para a melhor compreensão do mecanismo de ativação do MTZ pelas diferentes Fd de *T. vaginalis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCELRY'S SOFTWARE INC. **Discovery Studio Modeling Environment**, Release 3.5; San Diego: Accelrys Software Inc., 2012.

AFZAN, M. Y.; SURESH, K. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 371-381, 2012.

ALVES, M. J. G. **Epidemiologia da tricomoniose e sensibilidade ao metronidazol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2006.

ARAÚJO, J. X. et al. Modelagem molecular de derivado do geniposídeo como inibidor da TMPRSS2 contra a COVID-19 Molecular modeling of geniposide derivative as TMPRSS2 inhibitor Against COVID-19. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 6, p. 45109-45122, 2022.

ARAÚJO, S. **Clonagem, expressão e purificação de membros da família de Proteína de Superfície Associada a Mucina (MASP) de *Trypanosoma cruzi* para estudos estruturais**. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2010.

ASSIS, B. L. M. **Obtenção de modelo tridimensional para o antígeno ML2055 de *Mycobacterium leprae***. 2020. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Medicina) - Universidade Federal do Paraná, Toledo, 2020.

BARROS, M. P. de. **Adenosina deaminase em *Trichomonas vaginalis*: estudo da localização celular e dos efeitos de nutrientes essenciais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BATZOGLOU, S., (ed). **Research in Computational Molecular Biology**. 13th Annual International Conference, RECOMB 2009. LNCS 5541. **Springer**, p. 31-45, 2009.

BENCHIMOL, M. et al. Draft Genome Sequence of *Tritrichomonas foetus* Strain K. **Genome Announcements**, v. 5, n. 16, e00195-17, 2017.

BENCHIMOL, M. Invited Review: The hydrogenosome. **Acta Microscopica**, v. 8, n. 1, p. 1-22, 1999.

BENCHIMOL, M. The hydrogenosome as a drug target. **Current Pharmaceutical**, v. 14, n. 9, p. 872-881, 2008.

BERI, D. et al. Demonstration and characterization of cyst-like structures in the life cycle of *Trichomonas vaginalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 430, p. 1-15, 2020.

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

BODEK, D. F.; BLUM, S. E. C. Ferredoxinas. **Educación Química**, v. 24, n. 4, p. 426-430, 2013.

BOWIE, J.U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.

BRADLEY, P.; MISURA, K. M. S.; BAKER, D. Toward high-resolution de novo structure prediction for small proteins. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1868–1871, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis – IST**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022.

BRAUN, R. L.; JUNQUEIRA, D. M.; VERLI, H. Filogenia. In: VERLI, H. (org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. ed. 1, cap. 5, São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. p. 81-114.

BRAVO, R. S. et al. Tricomoniase vaginal: o que se passa? **DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n. 2, p. 73-80, 2010.

BRITO, M. A. de. Estudando interações fármaco-receptor com o *Protein Data Bank* (PDB) e programas gratuitos. **Revista Virtual de Química**. v. 3, n. 6, p. 467-483, 2016.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335–373, 2003.

BRUNI, M. P. **Tricomoniase feminina no sul do Brasil: relação com HIV, fatores de risco e métodos diagnósticos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

BUENO, R.V. **Planejamento de novos candidatos a fármacos tuberculostáticos: modelagem molecular e QSAR**. 2013. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade de Goiás. Goiânia, 2013.

CAMPBELL, I. J.; BENNETT, G. N.; SILBERG, J. J. Evolutionary relationships between low potential ferredoxin and flavodoxin electron carriers. **Frontiers in Energy Research**, v. 7, n. 79, p. 1-18, 2019.

CARLTON, J.M. et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, p. 207-212, 2007.

CARVALHO, N. S. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecções que causam corrimento vaginal. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 30, n. esp1, 2021.

CAVALCANTI, D. R. **Avaliação do potencial de compostos naturais como possível alternativa terapêutica contra *Trichomonas vaginalis***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

CDC – DPDX – Trichomoniasis. Disponível em: www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html. Acesso em: 10 abr 2022.

CROSSNOE, C. R. et al. The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* Ferredoxin provides insight into metronidazole activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 503–518, 2002.

DAȔBROWSKA, J. et al. Whole genome sequencing of a feline strain of *Tritrichomonas foetus* reveals massive genetic differences to bovine and porcine isolates. **International Journal of Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 227-233, 2020.

DAVID, A. et al. The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist’s Guide. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 2, p.167336, 2022.

DIAS, R.; AZEVEDO JR., W de. Molecular docking algorithms. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 1040–1047, 2008.

DIAZ, J. M. O.; RIAÑO, N. E. A. Tema de revision: *Trichomonas Vaginalis*. **Revista Salud, Historia y Sanidad**, v. 3, n. 3, 2008.

EDWARDS, T. et al. *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 406-417, 2016.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83-89, 2019.

FERNANDES, K. M. et al. Avaliação da atividade de antimicrobianos comumente utilizados na rede hospitalar de Manaus frente a patógenos humanos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 19932-19952, 2021.

FUKUYAMA, K. et al. Structure of [4Fe-4S] ferredoxin from *Bacillus thermoproteolyticus* refined at 2.3 Å resolution: structural comparisons of bacterial ferredoxins. **Journal of Molecular Biology**, v. 210, n. 2, p. 383-398, 1989.

FUKUYAMA, K. et al. Tertiary structure of *Bacillus thermoproteolyticus* [4Fe-4S] ferredoxin: evolutionary implications for bacterial ferredoxins. **Journal of Molecular Biology**, v. 199, n. 1, p. 183-193, 1988.

FUKUYAMA, K. Structure and function of plant-type ferredoxins. **Photosynthesis Research**, v. 81, n. 3, p. 289-301, 2004.

GLEHN, M. P. v. **Prevalência de Trichomonas vaginalis em mulheres na idade fértil atendidas em equipe de saúde da família do Distrito Federal**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, 2016.

GOMES, T. V. et al. Principais aspectos referentes à Tricomoniase. **Revista Científica Integrada**, v. 5, ed. 1, 2021.

GORRELL, T. E.; YARLETT, N.; MÜLLER, M. Isolation and characterization of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin. **Carlsberg Research Communications**, v. 49, n. 2, p. 259-268, 1984.

GOUVÊA, E. H. **Identificação in silico de derivados azólicos candidatos a inibidores da lanosterol 14- α desmetilase (CYP51) com potencial antifúngico.** 2021. Dissertação (Mestrado em Produtos Bioativos e Biociências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, Macaé, 2021.

GRAVES, K. J. et al. A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1383-1391, 2020.

GUEDES, I. A. et al. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, p. 75–87, 2014.

GUIMARÃES, S. L. **Clonagem, expressão e purificação das enzimas NahE e NahK de *Pseudomonas putida* para determinação de suas estruturas cristalográficas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *In: Nucleic Acids Symposium Series*, n. 41, 1999. p. 95-98.

HEIS, M. D. Caracterização das cisteína desulfurases de arroz [*Oryza sativa* (L.)] e soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HENKEL, S. et al. *Toxoplasma gondii* apicoplast-resident ferredoxin is an essential electron transfer protein for the MEP isoprenoid-biosynthetic pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 1, p. 1-15, 2022.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, v. 9, n.15, p. 659 – 669, 2004.

HRDÝ, I. et al. Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5033-5036, 2005.

JOHNSON, P. J. et al. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 87, p. 6097-6101, 1990.

JUMPER, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

JUMPER, J.; HASSABIS, D. Protein structure predictions to atomic accuracy with AlphaFold. **Nature Methods**, v. 19, n. 1, p. 11-12, 2022.

KOONIN E.V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 309-338, 2005.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 199-212, 1999.

KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

LAHTI, C. J.; JOHNSON, P. J. *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v 46, p. 307-310, 1991.

LAND, K. M. et al. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. **Molecular Microbiology**, v. 51, p.115–122, 2004.

LA-SCALEA, M. A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 34, p. 59-75, 1998.

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

LEWIS, D. Clinical manifestatiosn of vaginal trichomoniasis. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 42, n. 7, p. 369-371, 2014.

LIMA, C. V. de; MODA, D. B.; ROMANELLO, L. Modelagem molecular de isoformas e docagem molecular da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) de *Schistosoma mansoni*. **Luminária**, v. 22, n. 1, p. 35–49, 2020.

LIMA, M. C. L. et al. O perfil epidemiológico das mulheres com *Trichomonas vaginalis* assistidas na atenção primária. **Revista Enfermagem Digital Cuidado e Promoção da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 8–13, 2019.

LIMA, M. C. L. et al. Prevalência e fatores de risco independentes à tricomoníase em mulheres assistidas na atenção básica. **Acta Paulista de Enfermagem**. v. 26, n. 4, p. 331-337, 2013.

LIU, H. Y.; GERMANAS, J. P. NMR spectroscopic studies of the hydrogenosomal [2Fe–2S] ferredoxin from *Trichomonas vaginalis*: Hyperfine-shifted ¹H resonances. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 72, p. 127–131, 1998.

LOPES, A. S. **Avaliação de compostos naturais e sintéticos com ação anti-*Trichomonas vaginalis***. 2018. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

LOPES, G. D. **Formação de pseudocistos em *Trichomonas vaginalis*: uma análise ultraestrutural, estrutural e proteômica**. 2018. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

MACHADO, E. R.; SOUZA, L. P. Tricomoníase: Assistência de enfermagem na prevenção e controle. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 229–243, 2012.

MACIEL, G. de P.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 152-160, 2004.

MAKIUCHI, T.; NOZAKI, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. **Biochimie**, v. 100, p. 3-17, 2014.

MARCUS, Y. et al. The drug ornidazole inhibits photosynthesis in a different mechanism described for protozoa and anaerobic bacteria. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 23, p. 4413-4426, 2016.

MARQUES-SILVA, M. et al. *Trichomonas vaginalis* and growing concern over drug resistance: a systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 35, n. 10, p. 2007-2021, 2021.

MARTINS, N. F. Uma síntese sobre aspectos da fotossíntese. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, p. 10-14, 2011.

MATSUBARA, H.; SAEKI, K. Structural and functional diversity of ferredoxins and related proteins. In: **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 38, p. 223-280, 1992.

MEDEIROS, S. F. et al. Vaginites e vaginoses. **Febrasgo/Feminina**, v. 47, n. 4, p. 231-240, 2019.

MENEZES, A. G. **Tricomoniase e complicações em gestantes: revisão da literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2022.

MORALES, R. et al. Refined X-ray structures of the oxidized, at 1.3 Å, and reduced, at 1.17 Å, [2Fe– 2S] ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* PCC7119 show redox-linked conformational changes. **Biochemistry**, v. 38, n. 48: p. 15764-15773, 1999.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. In: KUKOL, A. (ed.). **Molecular Modeling of Proteins**. v. 443. Humana Press: New jersey, EUA, 2008, p. 365-382.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press: Oxford, UK, 2000.

PACHECO, A. G. M. **Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14alfa-desmetilase do *Moniliophthora perniciosa***. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santa, Feira de Santana, 2010.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PINTO, A. V. et al. Proteínas virais no *Protein Data Bank*. **Revista de Ciência Elementar**, v. 8, n. 2, 2020.

PLUMPER, E.; BRADLEY, P. J.; JOHNSON, P. J. Competition and protease sensitivity assays provide evidence for the existence of a hydrogenosomal protein import machinery in *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 106, p. 11–20, 2000.

QUINTAS-GRANADOS, L. I. et al. TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 1953-1964, 2013.

QUON, D. V. K.; D'OLIVEIRA, C. E.; JOHNSON, P. J. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, p. 4402-4406, 1992.

RABELO, V. W. **Estudos de *docking* e dinâmica molecular da timidina quinase do vírus *Herpes simplex* para a análise da resistência ao aciclovir**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2016.

RESENDE, L. F. T. **Estudos conformacionais da proteína Albumina de Soro Bovino (BSA) e sua interação com o polímero NAFION® em diferentes condições físico-químicas por espectroscopias de dicroísmo circular e fluorescência**. 2019. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

ROBERTS, L. S. et al. **Foundations of Parasitology**. ed. 9. New York. McGraw-Hill, 2013.

RODRIGUES, A. B. M. **Análises computacionais para o estudo da fumarato hidratase como potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e de Sistemas) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

RODRIGUES, P. M. L. **Estudos estruturais em ferredoxinas por Ressonância Magnética Nuclear**. 1999. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 1999.

RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425.1987.

SANTIBANEZ, V. S. et al. **Avaliação de marcadores de sequenciamento RAD para inferência filogenética de máxima verossimilhança no gênero *Barbacenia* (Velloziaceae)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SANTOS, O. A. F.; BICCA, R. de. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-503, 2004.

SCHUMANN, J. A.; PLASNER S. Trichomoniasis. **StatPearls Publishing**, 2022. Nih.gov – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534826>. Acesso em: 14 abr 2022.

SEVRIOUKOVA, I. F. Redox-dependent structural reorganization in putidaredoxin, a vertebrate-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida*. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, n. 3, p. 607-621, 2005.

SIEVERS F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 135-145, 2018.

SILVA, A. T. de A. **Síntese de pró-fármacos derivados do Metronidazol**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2002.

SILVA, K. N. da. **Modelagem comparativa da metaloprotease VMBMP de *Bothrops moojeni* por homologia estrutural**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas - Escola Superior de Ciências da Saúde, Manaus, 2010.

SILVA, R. E. A infecção pelo *Trichomonas vaginalis* e suas possíveis relações com a aquisição e transmissão do vírus HIV. **Revista Científica da Faculdade Unimed**, v. 2, n. 1, p. 96-111, 2020.

- SILVA, V. B. D. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. 2008. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- SMITH, T. F. et al. Current limitations to protein threading approaches. **Journal of Computational Biology**, v. 4, n.3, p. 217-225, 1997.
- SWYGARD, H. et al. Trichomoniasis: Clinical Manifestations, Diagnosis and Management. **Sexually Transmitted Infections**, v. 80, n. 2, p. 91-95, 2004
- TAMAROZZI, E. R. **Caracterização estrutural de Dectin-1 humana e análise de interação com seus alvos moleculares β -glucanos e Syk**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2020.
- VIDAKOVIC, M. et al. Reactivity of reduced [2Fe-2S] Ferredoxins parallels host susceptibility to nitroimidazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 302–308, 2003.
- VYAS, V. K. et al. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 1, p. 1-17, 2012.
- WEI, G. W. Protein structure prediction beyond AlphaFold. **Nature Machine Intelligence**, v. 1, n. 8, p. 336-33, 2019.
- WEKSBERG, T. E. et al. Molecular dynamics simulations of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin show a loop-cap transition. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 3337–3345, 2007.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35(suppl_2), W407-W410. 2007.
- WU, S.; SKOLNICK, J.; ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. **BMC Biology**, v. 5, n. 17, p. 1-10, 2007.
- XU, D.; ZHANG, Y. *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 80, n. 7, p. 1715-1735, 2012.

XU, D.; ZHANG, Y. Toward optimal fragment generations for ab initio protein structure assembly. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 81, n. 2, p. 229-239, 2013.

YARLETT, N. et al. Reduction of nitroimidazole derivatives by hydrogenosomal extracts of *Trichomonas vaginalis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, p. 29-40, 1985.

YARLETT, N.; YARLETT, N. C.; LLOYD, D. Ferredoxin-dependent reduction of nitroimidazole derivatives on drug-resistant and susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, p. 1703-1708, 1986.

ZAFALON, G. F. D. **Algoritmos de alinhamento múltiplo e técnicas de otimização para esses algoritmos utilizando Ant Colony**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Computação) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 40, p. 1-8, 2008.

ZIMORSKI, V. et al. The N-terminal sequences of four major hydrogenosomal proteins are not essential for import into hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 89-97, 2013.