



**UFRJ**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO



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

**NAYARA SILVA CECCHE**

**Caracterização *in silico* da família de pirofosfatases inorgânicas solúveis do  
parasito *Trichomonas vaginalis***

NAYARA SILVA CECHE

Caracterização *in silico* da família de pirofosfatases inorgânicas solúveis do parasito *Trichomonas vaginalis*

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Eldo Campos

MACAÉ  
Dezembro de 2022

### CIP - Catalogação na Publicação

C388

Cecche, Nayara Silva

Caracterização in silico da família de pirofosfatases inorgânicas solúveis do parasito *Trichomonas vaginalis* / Alana Raquel Soares de Souza - Macaé, 2022.  
85 f.

Orientador(a): José Luciano Nepomuceno da Silva.

Coorientador(a): Eldo Campos.

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

1. *Trichomonas vaginalis*. 2. Pirofosfatases. 3. Polifosfato.  
4. Modelagem molecular. I. Silva, José Luciano Nepomuceno da, orient.  
II. Campos, Eldo, coorient. III. Título.

CDD 615

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé  
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

**NAYARA SILVA CECCHE**

Caracterização *in silico* da família de pirofosfatases inorgânicas solúveis do parasito  
*Trichomonas vaginalis*

Trabalho de conclusão de curso definido e aprovado com requisito para obtenção do título de  
farmacêutico.

Macaé, 20 de dezembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof. Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno da Silva

UFRJ/Macaé

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

Profa. Dra. Paula Alvarez Abreu

UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/1275935652105959>

Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro

UFRJ/Macaé

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

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar e me permitir realizar este grande sonho. Por me iluminar e nunca me desamparar em todos os momentos da minha vida. Agradeço por mostrar que sou capaz de alcançar tudo aquilo que desejo sendo uma pessoa correta, obstinada e por me ensinar todos os dias que tudo acontece da maneira e do jeito que é preciso.

As grandes mulheres da minha vida, Edileuza (Avó), Neyde (mãe), Edna e Luzinete (Tias) por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia, por me ensinarem que nada nesse mundo é impossível aos olhos de Deus e principalmente por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem, por mostrarem que sou capaz e por jamais me deixarem desistir. Obrigada por me criarem em um lar tão repleto de amor e respeito, hoje sou a pessoa que sou graças a vocês. Em especial agradeço a minha avó, que não pode ver de pertinho está conquista, mas sei que estará comigo sempre. Também a minha mãe, por ser a melhor mãe e amiga deste mundo. Por tanto amor, por toda a ajuda e dedicação durante este período de estudo, por toda a garra para sempre me proporcionar o melhor e assim eu pudesse realizar nosso sonho. Obrigada por cada palavra e por me ensinar que tudo nessa vida passa, com dedicação, fé e força de vontade somos capazes de tudo. Aos meus familiares, Raul (primo) e Adriano (padrasto), em especial minhas primas Danielly e Julliany por me acompanharem durante todo o trajeto, por vibrarem nos momentos felizes e por me apoiarem nos momentos difíceis, obrigada por sempre acreditarem em mim e por estarem comigo em todos os momentos.

Agradeço também a todos amigos que estiveram comigo durante esta jornada, em especial as minhas metades, Bruna, Thais e Natália, que estiveram comigo em todos os momentos, obrigada por todas as lágrimas que me ajudaram a secar, por sempre acreditarem em mim e estarem do meu lado, para sempre nós.

Aos grandes amigos que pude fazer durante este tempo de faculdade, Natália, Geovana, Mayara, Isabella, Carol, Maria e James. Obrigada por sempre serem meu apoio, por toda a força, por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir. Sou extremamente grata por poder ter as conhecido e por ter tido o direito de estar ao lado de vocês durante toda essa trajetória. Obrigada por todos os momentos que levarei para o resto da vida.

Ao meu grande orientador José Luciano Nepomuceno. Obrigada por me aceitar como aluna durante toda esta caminhada, por ser uma excelente pessoa e um excelente orientador. Obrigada por tanta dedicação, paciência e confiança. Sou extremamente grata e uma eterna admiradora.

Ao meu coorientador Eldo Campos. Obrigada por ser uma excelente pessoa e um excelente orientador. Obrigada por tanta dedicação, paciência e confiança.

Ao professor Evenilton, pela atenção e dicas durante a etapa de desenvolvimento e confecção deste trabalho e por todos aqueles que estiveram envolvido direta ou indiretamente neste estudo.

*“O fardo é proporcional às forças, como a recompensa será proporcional à resignação e à coragem.” (Allan Kardec)*

## RESUMO

O *Trichomonas vaginalis* é o agente causador da tricomoníase em humanos, infecção sexualmente transmissível (IST) não viral mais prevalente no planeta. Os pirofosfatos (PPi) e os polifosfatos (poliP) inorgânicos são polímeros lineares que formam longas cadeias através de ligações fosfoanídricas. Estes polímeros e as enzimas que estão envolvidas no seu metabolismo desempenham papel importante em processos vitais em diversos organismos, como sobrevivência e estabelecimento da infecção. As enzimas envolvidas no metabolismo destes polímeros podem ser do tipo fosfatases, realizam a sua clivagem, ou polifosfato quinases, que promovem a formação de cadeias de polifosfatos. As pirofosfatases inorgânicas (PPases) pertencem a um subgrupo de polifosfatases que dependem da utilização de metais bivalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) como cofatores para desempenhar sua função de hidrólise. O objetivo inicial desse trabalho foi identificar proteínas envolvidas nas vias de síntese e degradação de polifosfatos no parasito *T. vaginalis*. Essa busca nos levou a identificação de genes que codificam PPases que talvez atuem também em vias de degradação de polifosfatos. Assim, o presente trabalho visa especificamente identificar e caracterizar *in silico* as enzimas da família de PPases no parasito *T. vaginalis*, bem como investigar sua possível contribuição na degradação de PPi e poliP. Como metodologia, inicialmente realizou-se a mineração e busca em bancos de dados do NCBI e do *TrichDB* para identificação no genoma do parasito de genes homólogos às enzimas envolvidas nessas vias metabólicas em outros organismos. Essa busca resultou na identificação apenas de genes que codificam PPases similares à enzima PPase Vsp1 de *Trypanosoma brucei*, que tem a capacidade de hidrolisar tanto pirofosfato quanto polifosfatos. Modelos tridimensionais das PPases foram construídos por modelagem comparativa empregando o servidor *Swiss-Model*, e o refinamento dos modelos foi feito com o servidor *ModRefiner*. Os modelos foram validados com ferramentas dos servidores SAVES 6.0 e ProSA-web. Os ensaios de *docking* foram realizados para investigar a relação dos modelos com o metabolismo de PPi e poliP, utilizando os programas *AutoDock 4.2.6* e *AutoDockTools 1.5.4*. Os resultados foram visualizados com os programas *PyMOL* e *Discovery Studio (BIOVIA)*. Os ligantes foram confeccionados com o programa PC Spartan Pro 1.0. Como resultados, a partir da pirofosfatase inorgânica vacuolar Vsp1 de *Trypanosoma brucei* foram identificados quatro genes que codificam pirofosfatases inorgânicas em *T. vaginalis*, nomeadas como TvPPase 1, 2, 3 e 4. Dentre essas proteínas, a TvPPases 4 possui mais diferenças peptídicas, sendo a menos parecida entre as quatro PPases e também a menos semelhante à Vsp1 de *T. brucei*. Isso foi reafirmado na construção dos modelos por homologia, pois moldes diferentes tiveram que ser utilizados. Com a validação dos modelos, foram obtidos valores favoráveis indicando boa qualidade dos modelos refinados. O procedimento de *docking* molecular de PPi e PoliP mostrou que todas as quatro enzimas interagem bem com o PPi e que as TvPPases 1, 3 e 4 apresentam interações favoráveis e baixa energia de ligação com polifosfatos de cadeia curta e média, mas não com os de cadeia longa. Estudos adicionais *in silico* e *in vitro* são necessários para determinar a especificidade de substrato dessas proteínas e seu papel na sobrevivência e patogenicidade do parasito.

**Palavras Chaves** – *Trichomonas vaginalis*; Pirofosfatases inorgânicas; Modelagem molecular; Pirofosfato inorgânico; Polifosfato inorgânico;

## LISTA DE FIGURAS



- Figura 1-** Ultraestrutura da forma de trofozoíto do parasito *T. vaginalis*. Flagelos anteriores estão seccionados. Criado no servidor BioRender. Adaptado de: Rey, 2010. **20**
- Figura 2 -** Estágios morfológicos descritos para *T. vaginalis*. **Fonte:** Adaptado de: Hirt, 2013. **22**
- Figura 3 -** Ciclo biológico do parasito *T. vaginalis*. Todo o ciclo de vida e transmissão, em 1) Trofozoíto em fase diagnóstico (d), presente na urina e na secreção vaginal e prostática; 2) Multiplicação por fissão binária; 3) Trofozoíto em fase infectante (!), presente na cavidade vaginal e/ou uretral. **Fonte:** Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017. **23**
- Figura 4 -**Estrutura básica dos fármacos da família dos 2-metil-5-nitroimidazóis. **Fonte:** Adaptado de National Center for Biotechnology Information - PubChem Compound Summary 2022. **25**
- Figura 5 -** Estrutura genérica de uma cadeia linear de pirofosfato (A) e de polifosfatos (B). A cadeia de polifosfato apresenta a seguinte fórmula química geral:  $H_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ . Tanto no pirofosfato quanto nos polifosfatos os átomos de hidrogênios também podem estar ligados à cátions metálicos. **Fonte:** Elaborado no programa ACD/ChemSketch 2020.2. **26**
- Figura 6 -** Alinhamento múltiplo com nove sequências proteicas de pirofosfatases (PPases). Tv: *T. vaginalis*; Tb: *T. brucei*; Rm: *R. microplus*; La: *L. amazonensis* e Hs: *H. sapiens*. O quadrado representa a região da extensão N-terminal (domínio EF-hand de ligação ao  $Ca^{2+}$ ). O sinal de \* representa os 13 resíduos presentes no sítio ativo que são funcionalmente importantes para atividade das PPases. O triângulo invertido representa regiões de substituição de resíduos na sequência da TvPPase 4. A região sublinhada represente o motivo PROSITE característico das PPases solúveis da família I. As cores representam resíduos de aminoácidos de acordo com seu caráter (Vermelho: ácidos; Verde: polar; Azul: básico; Lilás: apolar). Os blocos coloridos sombreados representam posições com identidade e semelhança de resíduos bem conservadas entre as sequências. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *Clustal Omega v 2.1* e *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5*. **45**
- Figura 7 -** Alinhamento múltiplo com as sequências proteicas do molde (5LS0) e das TvPPases 1-3. **47**
- Figura 8 -** Alinhamento múltiplo com as sequências proteicas do molde (GMT1) e das TvPPases 4. **47**
- Figura 9 -** Gráficos de Ramachandran para os moldes (5LS0 e 6MT1) e as TvPPases 1-4. Em (A) molde 5ls0 (B) modelo TvPPase 1; (C) modelo TvPPase 2; (D) modelo TvPPase 3; (E) molde 6mt1 e (F) modelo TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *SAVES v. 6.0 -PROCHECK*. **48**
- Figura 10 -** Gráfico do perfil de score 3D-1D dos resíduos do molde 5LS0 (Código PDB:) e dos modelos das TvPPases 1, 2 e 3. Em verde: molde 5LS0; Azul: modelo TvPPase 1; Rosa claro: modelo TvPPase 2; Laranja: modelo TvPPase 3. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *SAVES v. 6.0 -Verify3D*. **50**
- Figura 11 -** Gráfico do perfil de score 3D-1D dos resíduos do molde, a estrutura cristalizada do molde 6MT1 e do modelo da TvPPase 4. Em roxo: molde 6MT1; **50**

Amarelo: modelo TvPPase 4 **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no SAVES v. 6.0 -Verify3D.

**Figura 12** - Gráfico da qualidade dos modelos baseados no *score-Z* (ProSA-web). 51  
(A) molde 5ls0 (B) modelo TvPPase 1; (C) modelo TvPPase 2; (D) modelo TvPPase 3; (E) molde 6mt1 e (F) modelo TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *ProSA-web*.

**Figura 13** - Gráfico da qualidade dos modelos baseada na energia dos resíduos de 53  
aminoácidos da sequência (ProSA-web). Em (A) molde 5LS0; (B) modelo TvPPase 1; (C) modelo TvPPase 2; (D) modelo TvPPase 3; (E) molde 6MT1 e (F) modelo TvPPase 4. A linha em verde claro corresponde à energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada segmento (janela) de 10 resíduos, enquanto a linha verde-escura corresponde a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada segmento (janela) de 40 resíduos. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *ProSA-web*.

**Figura 14** - Alinhamento entre as estruturas tridimensionais dos moldes (5LS0 e 54  
6MT1) e as TvPPases 1- 4. Estrutura em verde: molde 5ls0; Azul: modelo TvPPase 1. Rosa: modelo TvPPase 2; Magenta: modelo TvPPase 3; Roxo: molde 6mt1; Amarelo: modelo TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *PyMOL*.

**Figura 15** - Mapa de potencial eletrostático dos moldes (5LS0 e 6MT1) dos 55  
modelos das TvPPases 1- 4. Regiões de cargas negativas, regiões neutras e regiões de cargas positivas são representadas em vermelho, branco e azul, respectivamente. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *PyMOL*.

**Figura 16** - Alinhamento entre as estruturas tridimensionais das TvPPases 1- 4. 56  
Azul: modelo TvPPase 1. Rosa: modelo TvPPase 2; Magenta: modelo TvPPase 3; Amarelo: modelo TvPPase 4. A seta preta mostra a região de *loop*, presente na estrutura da TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *Pymol*.

**Figura 17** - Localização do átomo de nitrogênio do resíduo de lisina usado para 57  
centralizar a caixa do *docking* das TvPPases. Em Verde claro: ScPPase (1M38); Azul: TvPPase 1; Rosa: TvPPase 2; Magenta: TvPPase 3; Amarelo TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Pymol*.

**Figura 18** - Redocking molecular do PPI na pirofosfatase inorgânica da archaea 58  
*Thermococcus thioireducens* (código PDB: 5UCQ). Em colorido, pirofosfato em sua pose original na 5UCQ; em amarelo pirofosfato na pose obtida com o redocking. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*.

**Figura 19** - Diagrama 2D de interações. Resíduos da 5UCQ que interagem com o 59  
pirofosfato. Em A: pirofosfatase inorgânica da archaea *Thermococcus thioireducens* (código PDB: 5UCQ); B: *Redocking*. Em Lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*.

**Figura 20** - Melhor pose obtida por *docking* do pirofosfato (PPI) nos modelos das 60  
TvPPases 1-4. Em A) TvPPase 1; B) TvPPases 2; C) TvPPase 3 e D) TvPPase 4. A

esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*.

**Figura 21** - Sobreposição do PPI ligado por *docking* molecular às TvPPases 1-4 com o PPI ligado por redocking na PPase de *T. thio-reducens*. Em colorido, pirofosfato na pose da 5UCQ; em amarelo pirofosfato na pose do docking. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **61**

**Figura 22** - Diagrama 2D de interações. Resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o pirofosfato. Em A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em Lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **62**

**Figura 23** - Melhor pose obtida por *docking* dos polifosfato de cadeia curta (PoliP3) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*. **64**

**Figura 24** - Diagrama 2D de interações. Resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia curta (PoliP3). A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **65**

**Figura 25** - Grupos de poses obtidos no procedimento de docking molecular do poliP5 nas TvPPase 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*. **67**

**Figura 26** - Melhor pose obtida por *docking* dos polifosfato de cadeia média (poliP5) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*. **68**

**Figura 27** - Diagrama 2D de interações. Resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia média (PoliP5). A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal-acceptor; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **69**

**Figura 28** - Grupos de poses obtidos no procedimento de docking molecular do poliP15 nas TvPPase 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*. **72**

**Figura 29** - Melhor pose obtida por *docking* dos polifosfato de cadeia longa (PoliP15) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*. **73**

**Figura 30** - Diagrama 2D de interações. Resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia média A: TvPPase 1; B: TvPPases 2. Em **75**

lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável; Verde: interação do tipo *Pi-lone pair*. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*.

**Figura 31** - Diagrama 2D de interações dos resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia média (PoliP5). C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável; Verde: interação do tipo *Pi-lone pair* (par solitário  $\pi$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **76**

**Figura 32** - Comparação das poses obtidas por *docking* dos polifosfatos TvPPases 1-4. Em A) TvPPase 1; B) TvPPases 2; C) TvPPase 3 e D) TvPPase 4. Em ciano: PoliP3; Branco: PoliP5; Amarelo: PPI. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*. **77**

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Principais enzimas de biossíntese envolvidas no metabolismo de PoliP presente em alguns organismos modelo. VTC: chaperona de transporte vacuolar. **28**

**Quadro 2:** Principais enzimas de hidrólise envolvidas no metabolismo de PoliP presente em organismos modelos. FA: Fosfatase alcalina; CIAP: Fosfatase alcalina intestinal. **29**

**Quadro 3-** Tipo de interações e energia de ligação obtidos com o *redocking* do PPI na 5UCQ. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **59**

**Quadro 4** - Tipo de interações e energia de ligação obtidos com o *docking* molecular do PPI nas TvPPases 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **63**

**Quadro 5** - Tipo de interações e energia de ligação obtidos com o *docking* molecular do poliP3 nas TvPPases 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **66**

**Quadro 6** - Tipo de interações e energia de ligação obtidos com o *docking* molecular do poliP5 nas TvPPases 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **70**

**Quadro 7** - Tipo de interações e energia de ligação obtidos com o *docking* molecular do poliP15 nas TvPPases 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery (BIOVIA)*. **7**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Matriz de identidade e similaridade entre as quatro pirofosfatases de *T. vaginalis* com a Vsp1 de *T. brucei*. Código dos *loci* no TrichDB: TVAG\_12660; TVAG\_472200; TVAG\_019690 e TVAG\_231330) para TvPPase 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Código de acesso de TbVsp1 no NCBI: XP\_828780.1 **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *Clustal Omega v 2.1*. **44**
- Tabela 2** - Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *SAVES v. 6.0 - PROCHECK*. **49**
- Tabela 3** - Matriz de identidade e similaridade compartilhadas entre as quatro pirofosfatases de *T. vaginalis* e a PPase de *T. thio还原ens* (Código PDB: 5UCQ). **56**
- Tabela 4** - Valores de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e os pirofosfato. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*. **59**
- Tabela 5** - Valores previstos de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o polifosfato de cadeia curta (poliP3). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*. **64**
- Tabela 6:** Valores de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o polifosfato de cadeia média (poliP5). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*. **68**
- Tabela 7:** Valores de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o polifosfato de cadeia longa (poliP15). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*. **73**

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

1D	<i>Unidimensional</i>
3D	<i>Tridimensional</i>
ADP	Disfosfato de Adenosina
AMP	Monofosfato de Adenosina
APBS	<i>(Adaptive Poisson-Boltzmann Solver)</i> – Solucionador Adaptativo de Poisson-Boltzmann
ASP	Aspartato
ATP	Trifosfato de Adenosina
BLAST	<i>(Basic Local Alignment Search Tool)</i> – Ferramenta de Busca de alinhamento local básico
CIAP	<i>(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)</i> Fosfatase Alcalina Intestinal de bezerro
CTP	Trifosfato de Citidina
Ddp1	Endopolifosfatase
FA	Fosfatase Alcalina
GMQE	<i>(Global Model Quality Estimate)</i> Estimativa da qualidade global do modelo
GppA	Guanosina Pentafofato
GTP	Trifosfato de Guanosina
HIS	Histidina
HIV	<i>(Human Immunodeficiency Virus)</i> Vírus da imunodeficiência humana
H-Prune	Pirofosfatase humana da superfamília DHH
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
NCBI	<i>(National Center for Biotechnology Information)</i> Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
Nh2	Exopolifosfatase Glicossomal da Família Nudix do tipo II

Nh4	Exopolifosfatase Glicossomal da Família Nudix do tipo IV
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>(Protein Data Bank)</i> Banco de Dados de Proteínas
PFOR	Piruvato Ferredoxina Oxirredutase
Pi	Ortofosfato inorgânico
PoliP	Polifosfato inorgânico
PPase	Pirofosfatase inorgânica
PPi	Pirofosfato inorgânico
PPK	<i>(Polyphosphate kinase)</i> Polifosfato quinase
Ppk1	<i>(Polyphosphate kinase 1)</i> Polifosfato quinase 1
Ppk2	<i>(Polyphosphate kinase 3)</i> Polifosfato quinase 2
Ppn1	Exo e Endopolifosfatase Vacuolar do tipo I
Ppn2	Endopolifosfatase Vacuolar do tipo II
PPx	Polifosfatase Inorgânica
ProSA	<i>(Protein Structure Analysis)</i> Análise da estrutura de proteínas
QMEAN	<i>(Qualitative Model Energy Analysis)</i> Análise qualitativa da energia do modelo
QSQE	<i>(Quaternary Structure Quality Estimate)</i> Estimativa da qualidade da sequência quaternária
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>(Root-Mean Square Deviation)</i> Desvio médio da raiz quadrática
SAVES	<i>Structure Validation Server</i> Servidor de Validação de Estruturas
SCS	Succinil-coA sintase
TrichDB	<i>Trichomonas vaginalis Sequence Database</i> Banco de dados de sequências de <i>T. vaginalis</i>
Vsp1	Pirofosfatase Vacuolar Solúvel do tipo I

VTC      Complexo Chaperona de Transportador Vacuolar



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> .....	19
1.1.1 Morfologia.....	20
1.1.2 Ciclo biológico .....	22
1.1.3 Transmissão da infecção e tratamento .....	23
1.2 METABOLISMO DO PIROFOSFATO (PPi) E POLIFOSFATO INORGÂNICO (POLiP) .....	26
1.2.1 <i>Pirofosfato (PPi) e Polifosfatos inorgânicos (PoliP)</i> .....	26
1.2.2 <i>Enzimas envolvidas no metabolismo de poliP</i> .....	28
1.2.3 <i>As Pirofosfatases inorgânicas</i> .....	29
1.3 MODELAGEM MOLECULAR.....	31
1.3.1 <i>Modelagem comparativa</i> .....	31
1.3.2 <i>Docking Molecular</i> .....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 OBJETIVOS GERAL.....	35
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	35
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO E MINERAÇÃO GENÔMICA.....	36
4.2 ALINHAMENTO E MATRIZ DE IDENTIDADE E SIMILIARIDADE.....	37
4.3 MODELAGEM MOLECULAR – CONSTRUÇÃO, MINIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS TRIDIMENSIONAIS DAS PPASES DE <i>T. VAGINALIS</i> .....	38
4.4 PROTONAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS .....	39
4.5 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES E ADIÇÃO DO COFATOR METÁLICO NOS MODELOS CONFECCIONADOS .....	40
4.6 ESTRATÉGIA DE VALIDAÇÃO POR <i>REDOCKING</i> .....	41
4.7 <i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
5.1 BUSCA POR ORTÓLOGOS DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE POLIFOSFATOS NO GENOMA DE <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> .....	43
5.2 BUSCA E OBTENÇÃO DOS MODELOS TRIDIMENSIONAIS DAS TvPPASES.....	46
5.2.1 REFINAMENTO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS TRIDIMENSIONAIS DAS TvPPASES .....	47
5.3 VALIDAÇÃO POR REDOCKING.....	56
5.4 AVALIAÇÃO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DAS INTERAÇÕES DO PIROFOSFATO COM AS TvPPASES .....	59
5.5 <i>DOCKING</i> MOLECULAR E AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES DOS POLIFOSFATOS DE CADEIA CURTA (POLiP3) COM AS TvPPASES 1-4 .....	63
5.6 <i>DOCKING</i> MOLECULAR E AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES DOS POLIFOSFATOS DE CADEIA MÉDIA (POLiP5) COM AS TvPPASES 1-4.....	66
5.7 <i>DOCKING</i> MOLECULAR E AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES DOS POLIFOSFATOS DE CADEIA LONGA (POLiP15) COM AS TvPPASES 1-4.....	71
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....80**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Trichomonas vaginalis*

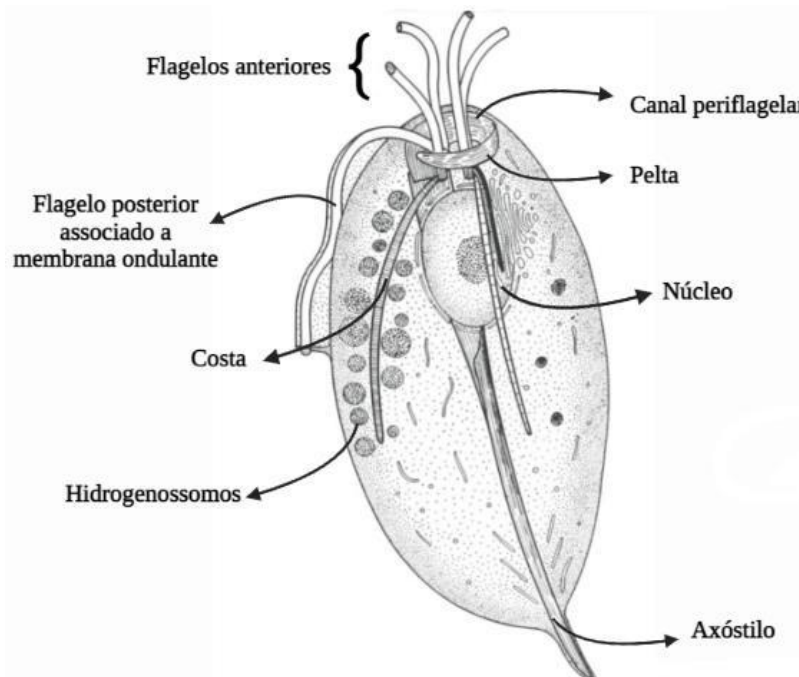
O parasito *Trichomonas vaginalis* [Metamonada: Parabasalia: Trichomonadida] é o agente etiológico da tricomoníase em humanos, considerada a infecção sexualmente transmissível (IST), não viral mais prevalente do mundo (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004). Este parasito foi descrito pela primeira vez em 1836 pelo médico francês Alfred Donné, ao examinar uma paciente com vaginose (MACHADO; SOUZA, 2012).

Segundo dados da organização mundial de saúde (OMS), estima-se que 376,4 milhões de novas infecções por *T. vaginalis* ocorreram em todo o mundo no período entre 2012 e 2016, correspondendo a uma estimativa de aproximadamente 1 milhão de novas infecções por dia. Atualmente, a OMS estima uma prevalência de 270 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (BERI *et al.*, 2020). O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde do Brasil (2015) ainda afirma que, a cada ano, aproximadamente 500 milhões de pessoas adquirem a tricomoníase, que é uma IST curável, bem como outras, como gonorreia, clamídia e sífilis.

A tricomoníase acomete principalmente pessoas com faixa etária de 15 a 49 anos e ocorre de forma sintomática majoritariamente em mulheres. Assim, cerca de 90% dos casos são rapidamente diagnosticados em mulheres, enquanto a infecção em homens costuma acontecer de forma assintomática (ROWLEY *et al.*, 2019). Por raramente apresentarem sintomas, os indivíduos do sexo masculino são considerados os principais transmissores do parasito (MACHADO; SOUZA, 2012; ROWLEY *et al.*, 2019). Esta infecção pode apresentar uma diversidade de manifestações clínicas, abrangendo desde de um quadro assintomático ou mais brando, até um quadro de inflamação severa (SAKRU *et al.*, 2005). Em alguns casos, a infecção por *T. vaginalis* pode estar associada ao nascimento de bebês prematuros, bem como ao baixo peso ao nascer, câncer cervical e infertilidade. Além disso, pesquisadores relatam que *T. vaginalis* é capaz de potencializar a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (VIH ou HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004). Desta forma, a investigação clínica é extremamente importante para o diagnóstico e, conseqüentemente, para um tratamento adequado, evitando problemas mais graves e a propagação da infecção (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

### 1.1.1 Morfologia

O *T. vaginalis* possui três estágios morfológicos bem característicos, sendo que o mais comumente encontrado é o estágio de trofozoíto, o qual apresenta morfologia alongada elipsoide, piriforme e, em alguns casos, oval (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Os trofozoítos possuem em média de 10 a 30  $\mu\text{m}$  de comprimento por 5 a 12  $\mu\text{m}$  de largura (MACHADO; SOUZA, 2012). Este estágio é capaz de se replicar e é também dotado de mobilidade, uma vez que esta forma possui quatro flagelos anteriores e um quinto flagelo recorrente associado com uma membrana ondulante, de comprimento menor que o corpo celular (FRASSON, 2011). Possui um único núcleo, localizado próximo à sua extremidade anterior (BENCHIMOL, 2004) e que apresenta cromatina em forma de grânulos pequenos e finos (CHEON *et al.*, 2013; LEMOS; GUILLO; GARCÍA-ZAPATA, 2014). Na região anterior do corpo celular, próximo ao local onde os flagelos surgem, está localizado o pelta, estrutura responsável por auxiliar na sustentação da parede do canal periflagelar, e que é constituído por microtúbulos (PREISNER *et al.*, 2016). Os microtúbulos que formam o pelta se estendem, formando um feixe denso que percorre longitudinalmente todo o corpo celular, sendo denominado axóstilo. O axóstilo fornece suporte geral para o corpo celular e participa também do processo da divisão celular (CHEON *et al.*, 2013; BENCHIMOL, 2004) (Figura 1).



**Figura 1** - Ultraestrutura da forma de trofozoíto do parasito *T. vaginalis*. As principais estruturas e organelas celulares encontradas em trofozoítos de *T. vaginalis* estão indicadas. Os flagelos anteriores e recorrentes estão seccionados. **Fonte:** Adaptado de Rey, 2010.

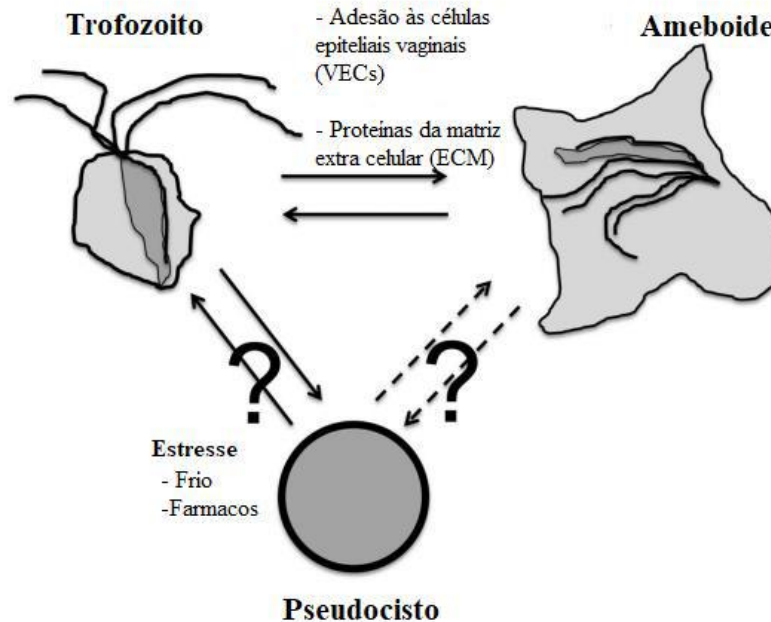
O segundo estágio morfológico deste parasito possui formato ameboide flagelado (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Os trofozoítos se diferenciam no estágio ameboide no momento em que entram em contato com o epitélio do hospedeiro ou com proteínas que compõem a matriz extracelular (Figura 2). Acredita-se que esse estágio morfológico seja uma forma do parasito aumentar a superfície de contato com as células epiteliais da região (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Além disso, esse estágio é capaz de emitir pseudópodes, os quais permitem que o parasito se alimente com mais eficiência e se fixe a partículas sólidas (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Estudos relataram diferentes moléculas de adesão envolvidas na interação do parasito com às células epiteliais do hospedeiro, que incluem lipofosfoglicanos, proteínas metabólicas e outras proteínas de membrana identificadas recentemente através de análises genômicas e proteômicas (RYAN *et al.*, 2011).

O terceiro e último estágio morfológico conhecido possui um formato arredondado e flagelos internalizados (EDWARDS *et al.*, 2016) (Figura 2). Alguns estudos chamam estas formas de pseudocistos, formas endoflageladas ou ainda de formas semelhantes a cistos (BERI *et al.*, 2020), consideradas como um estágio imóvel, mas com papel significativo no ciclo de vida do parasito (MIELCZAREK; BLASZKOWSKA, 2016). Essas formas aflageladas são encontradas principalmente em condições desfavoráveis de crescimento e parecem ter relação com a resistência do parasito a condições de estresse (LOPES *et al.*, 2018), sendo que seu aparecimento pode ser induzido *in vitro* quando a forma de trofozoíto é exposta a condições extremas, como ao frio ou outros fatores desfavoráveis (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Os organismos pertencentes ao táxon Trichomonadida são todos de metabolismo anaeróbico, e assim não possuem organelas como peroxissomos e mitocôndrias. Nestes parasitos, suas mitocôndrias evoluíram para uma organela adaptada ao microambiente anóxico, chamada hidrogenossomo (KUSDIAN; GOULD, 2014). Os hidrogenossomos são organelas envoltas por duas membranas, de morfologia esféricas ou ligeiramente alongadas e estão geralmente localizadas ao longo do axóstilo (EDWARDS *et al.*, 2016). Estas organelas podem ser encontradas em diferentes espécies de Parabasalia e são responsáveis pela produção de ATP, em um conjunto de reações onde o hidrogênio molecular (H<sub>2</sub>) é liberado como subproduto (LEITSCH, 2021). Os hidrogenossomos abrigam enzimas envolvidas em diferentes processos metabólicos, como a ferredoxina, a piruvato ferredoxina oxidoredutase (PFOR), a enzima málica e a succinil-coA sintetase (SCS).

Os diferentes estágios celulares de *T. vaginalis* podem ser encontradas de acordo com as características da fase da infecção e de acordo com as condições do ambiente. Isto é, as

variações na sua morfologia sofrem influência das condições físico-químicas do microambiente, como por exemplo, pH e temperatura (NEVES *et al.*, 2005).



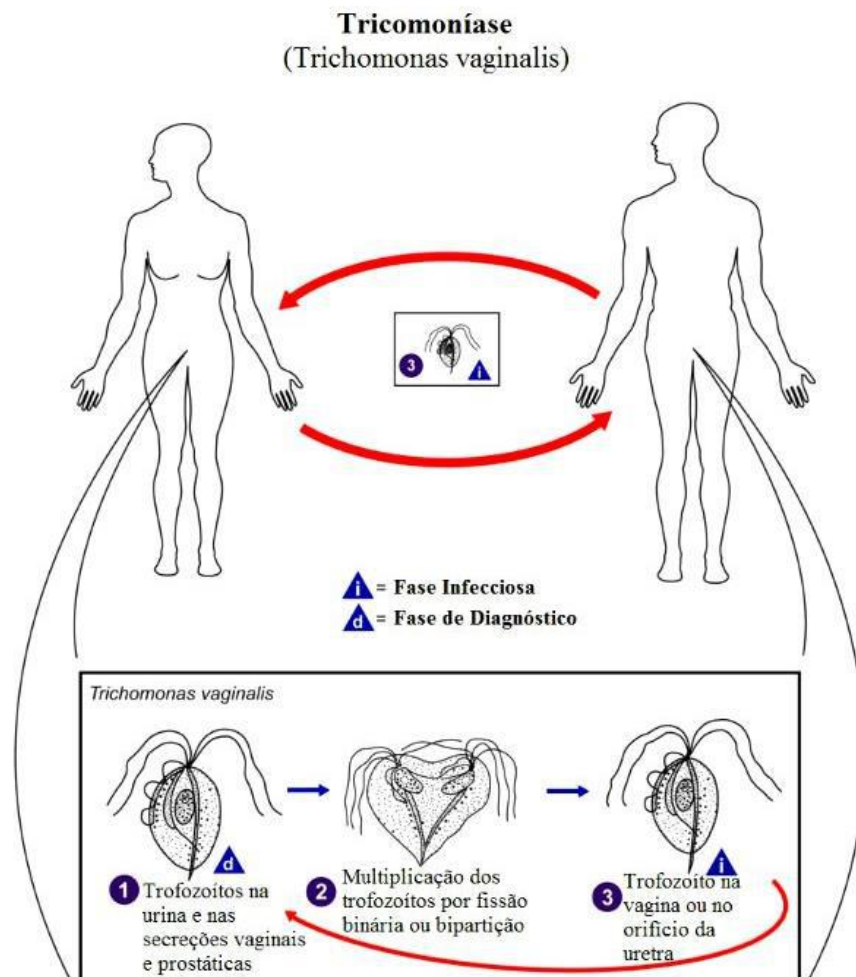
**Figura 2** - Estágios morfológicos descritos para *T. vaginalis* e a sinalização celular que induz a diferenciação. Trofozoítos são as formas replicativas. Quando em contato com células epiteliais da vagina (VECs) e proteínas da matriz extra celular (ECM), colo do útero, uretra ou próstata, os trofozoítos se diferenciam para formas ameboides flageladas. Os pseudocistos são induzidos após exposição de trofozoítos a condições de estresse (frio, exposição a fármacos etc.) e são capazes de se diferenciar em trofozoítos quando as condições microambientais se reestabelecem. Ainda não se sabe se ocorre a diferenciação da forma ameboide em pseudocistos. **Fonte:** Adaptado de: Hirt, 2013.

### 1.1.2 Ciclo biológico

*T. vaginalis* apresenta um ciclo de vida simples, pois tem como único hospedeiro os humanos. Desta forma, quando o parasito, em seu estágio de trofozoíto (ou pseudocisto) atinge o trato urogenital de um novo hospedeiro, dá início a sua multiplicação (NEVES *et al.*, 2005), por mitose fechada. O *T. vaginalis* é um parasito extracelular obrigatório e é normalmente encontrado na mucosa vaginal, uretral, próstata e prepúcio (FRASSON, 2011). Com relação a sua reprodução, o parasito se replica assexuadamente por fissão binária longitudinal e mitose fechada, o que acontece majoritariamente no pH menos ácido da vagina, onde o parasito utiliza as células do epitélio vaginal e cervical para se aderir, para que assim possa sobreviver e conseqüentemente se replicar (FICHOROVA, 2009). Além disso, sua proliferação também acontece na uretra masculina (Figura 3) (PETRIN *et al.*, 1998).

Alguns estudos mostram que o *T. vaginalis* desenvolveu a capacidade de sobreviver no ambiente vaginal durante mudanças fisiológicas do hospedeiro (PETRIN *et al.*, 1998). Por exemplo durante o período menstrual, quando o ambiente tem modificações de pH, presença

de células como eritrócitos e anticorpos (MACHADO; SOUZA, 2012). Isso acontece, pois durante este período há presença de nutrientes como ferro na região, que é de extrema importância para a regulação da expressão gênica do parasito (PETRIN *et al.*, 1998). Em meios de cultura, este organismo consegue sobreviver em temperaturas que podem variar de 20 a 40 °C, e em uma faixa de pH entre 5 e 7,5 (NEVES *et al.*, 2005).



**Figura 3** - Ciclo biológico e transmissão do parasito *T. vaginalis*. 1: Trofozoíto em fase diagnóstica (d), presente na urina e na secreção vaginal e prostática; 2: Multiplicação por fissão binária; 3: Trofozoíto em fase infecciosa (i), presente na cavidade vaginal e/ou na uretra. **Fonte:** Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 2017.

### 1.1.3 Transmissão da infecção e tratamento

A transmissão da tricomoníase acontece principalmente através do contato sexual, quando ocorre a transferência de trofozoítos presentes na secreção vaginal, prostática ou uretral do hospedeiro contaminado para o hospedeiro não contaminado (NEVES *et al.*, 2005). A evolução da infecção depende de diferentes características associadas ao hospedeiro, por exemplo, imunidade, estado nutricional e composição da microbiota vaginal (RAVEL *et al.*, 2011). Muito se discute sobre a possibilidade de infecção não-sexual, por exemplo, a

possibilidade de transmissão vertical vulvovaginal, entre a mãe e o bebê no momento do parto, principalmente para bebês do sexo feminino, uma vez que há contato da recém-nascida com secreção materna contaminada (PETRIN *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Estes casos, foram verificados através da detecção por microscopia do parasito em fluídos do recém-nascido (KISSINGER, 2015). Além disso, já se observou a transmissão não-sexual, onde o parasito é capaz de sobreviver em estado latente nos fluidos corporais, bem como em superfícies úmidas e objetos como assentos sanitários, roupas de cama, instrumentos ginecológicos etc. Desta forma, tem-se observado este tipo de transmissão em grupos de mulheres ainda virgens, por meio de contato com superfícies e objetos contaminados (PETRIN *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Apesar desta forma de infecção ser rara, não pode ser desconsiderada, uma vez que o *T. vaginalis* é capaz, em condições específicas de humidade, de sobreviver por até três horas fora do organismo humano assim que expulso (EDWARDS *et al.*, 2016).

Uma vez estabelecida a infecção, o parasito infecta especialmente o epitélio escamoso do trato genital, sendo que em 50% dos casos permanece em período de incubação de 4 a 28 dias (PETRIN *et al.*, 1998; KISSINGER, 2015). Em mulheres a infecção pode persistir por longos períodos, desde meses e até mesmo anos, dependendo de características específicas relacionada a sua saúde. Já em homens o tempo de persistência é menor, cerca de 10 dias (KISSINGER, 2015).

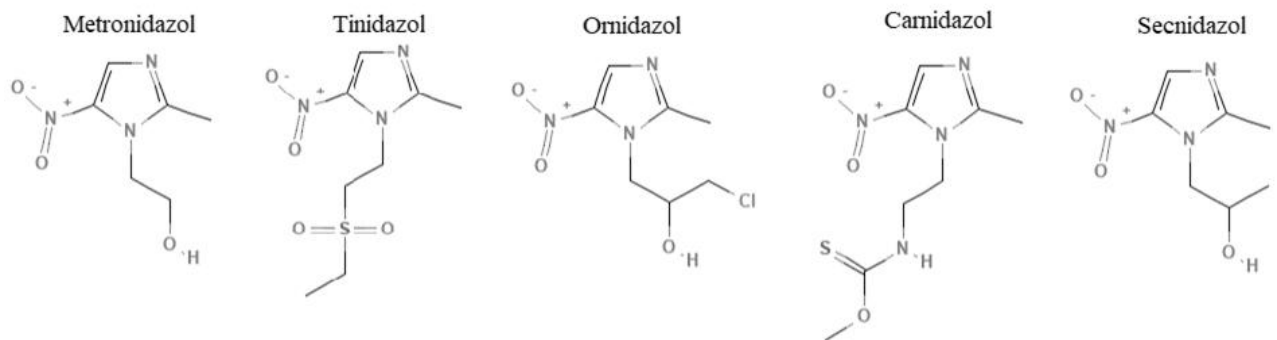
Quanto aos sintomas apresentados pelos pacientes acometidos pela infecção, em mulheres a tricomoníase comumente se apresenta de uma forma sintomática aguda, quando há presença de secreção amarela-esverdeada, espumante e purulenta, com odor forte e desagradável, sendo que pelo menos 20% dos casos sintomáticos apresentam este tipo de secreção (MACHADO; SOUZA, 2012). Pode ainda haver a presença de pequenos pontos hemorrágicos na mucosa cervical e vaginal (LOPES *et al.*, 2018; PETRIN *et al.*, 1998).

Infecções assintomáticas representam cerca de 85% dos casos em mulheres, onde não há alteração no pH vaginal e na microbiota bacteriana. No entanto, cerca de um terço destas mulheres após 6 meses passam de um quadro de infecção assintomática para sintomática, passando a apresentar sintomas clínicos da infecção (MACHADO; SOUZA, 2012; KISSINGER, 2015). Em homens, cerca de 77% dos casos, a infecção é assintomática (KISSINGER, 2015), mas nos casos sintomáticos há presença de secreção clara a mucopurulenta e em pequena quantidade, acompanhada de um leve prurido, podendo haver também sensação de queimação imediatamente após a relação sexual (PETRIN *et al.*, 1998). Também podem ocorrer outras complicações, como a diminuição na quantidade de espermatozoides, prostatite e epididimite (KISSINGER, 2015).



A infecção por *T. vaginalis* é considerada como uma das principais doenças infecciosas que afetam o sistema reprodutor humano, visto que em alguns casos pode levar a complicações severas (PETRIN *et al.*, 1998). Desta forma, deve-se priorizar medidas de prevenção e controle, através da utilização de estratégias como a educação em saúde, de forma que leve ao diagnóstico precoce, redução da disseminação da infecção, prevalência e complicações. Por isso, um diagnóstico e tratamento adequado do hospedeiro infectado, bem como dos seus parceiros, é de grande importância (MACHADO; SOUZA, 2012). Além disso, a prevenção se baseia nas mesmas medidas tomadas para redução dos riscos para qualquer outra IST (NEVES *et al.*, 2005).

A primeira forma de tratamento efetiva da tricomoníase foi adotada por volta de 1960 (CONRAD *et al.*, 2013), quando o metronidazol [1-(2-hidroxietil)-metil-5-nitroimidazol] foi sintetizado a partir da azomicina [2-nitroimidazol] (NEVES *et al.*, 2005). Atualmente existem fármacos pertencentes a família dos 2-metil-5-nitroimidazóis que podem ser usados no controle da infecção por *T. vaginalis*, são eles: metronidazol, tinidazol, ornidazol, camidazol e secnidazol (Figura 4), sendo o metronidazol o principal medicamento receitado para a tricomoníase em todo o planeta (PETRIN *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2005; MORETH *et al.*, 2010). Entretanto, o fato de o tratamento depender deste único grupo de medicamentos, pode levar ao desenvolvimento de resistência parasitária aos 5-nitroimidazóis (CONRAD *et al.*, 2013).



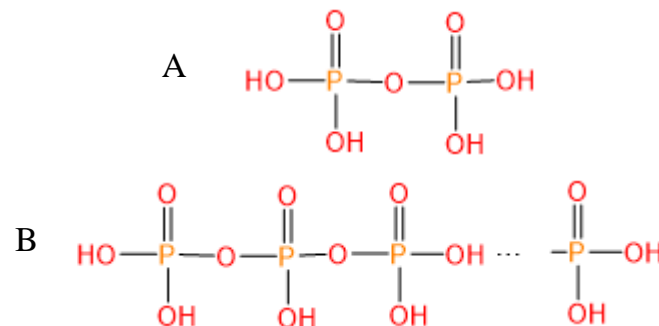
**Figura 4** -Estrutura básica dos fármacos da família dos 2-metil-5-nitroimidazóis. **Fonte:** Adaptado de National Center for Biotechnology Information - PubChem Compound Summary 2022.

A posologia do tratamento, assim como suas restrições, depende das características do paciente. Assim, por exemplo, em gestantes a administração desses medicamentos não deve ser feita por via oral e sim através de cremes e géis de aplicação tópica (MACHADO; SOUZA, 2012; NEVES *et al.*, 2005;). Cerca de 90% dos casos de infecção são curados quando se utiliza qualquer um dos medicamentos desta família, se administrado em dose e tempo corretos (HIRT; SHERRARD, 2015).

## 1.2 Metabolismo de Pirofosfato (PPi) e Polifosfatos inorgânicos (PoliP)

### 1.2.1 Pirofosfato (PPi) e Polifosfatos inorgânicos (PoliP)

Os polifosfatos (poliP) são polímeros lineares que foram descritos pela primeira vez em 1890, por L. Liberman. Os polifosfatos são formados por longas cadeias lineares de unidades de ortofosfato unidas através de ligações altamente energéticas, chamadas de ligações fosfoanidrílicas. Desta forma, cada unidade de ortofosfato se liga a outra unidade através dos átomos de oxigênios presentes na molécula (CRUZ, 2015).



**Figura 5** - Estrutura genérica de uma cadeia linear de pirofosfato (A) e de polifosfatos (B). A cadeia de polifosfato apresenta a seguinte fórmula química geral:  $H_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ . Tanto no pirofosfato quanto nos polifosfatos os átomos de hidrogênios também podem estar ligados a cátions metálicos. **Fonte:** Elaborado no programa ACD/ChemSketch 2020.2.

As moléculas formadas exclusivamente por grupamentos fosfatos interconectados por ligações fosfoanidrílicas podem ainda ser classificadas de acordo com o número de átomos de fósforo presentes na molécula (CRUZ, 2015). Assim, existe o pirofosfato (PPi), constituído por dois grupamentos fosfato unidos por uma ligação fosfoanidrílica (Figura 5A), e os polifosfatos, constituídos por três ou mais fosfatos compondo sua cadeia (KORNBERG; RAO; AULT-RICHE, 1999; CRUZ, 2015) (figura 5B). Os poliP podem ainda ser divididos de acordo com o tamanho da sua cadeia: poliP de cadeia curta, que possuem 3 ou 4 resíduos de Pi compondo sua cadeia, os de cadeia média, que possuem entre 5 e 14 resíduos de Pi, e os de cadeia longa, que possuem a partir de 15 resíduos de Pi (JIMENEZ; DOCAMPO, 2015). Além disso, os PPi podem servir como precursores para a síntese dos poliP (KULAKOVSKAYA *et al.*, 2021).

A formação de PPi foi descrita a primeira vez em 1941, pelo casal de pesquisadores Gerty e Carl Cori (1951), em uma reação biológica onde se observou que, durante a hidrólise de ATP para formar AMP, o PPi também era formado. Além disso também se notou que esta molécula se acumulava em extrato de fígado de ratos na presença de frutose e succinato (HEINONEN, 2001). O PPi é normalmente gerado como subproduto de inúmeras reações

bioquímicas e biossintéticas que dependem de nucleotídeos trifosfatados, como ATP, CTP e GTP (CRUZ, 2015). Tais reações incluem a síntese de polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (NYRÉN; LUNDIN, 1985).

O PPI desempenha importante papel no metabolismo de diferentes tipos celulares, podendo influenciar significativamente na fisiologia celular em uma série de reações vitais, como por exemplo na síntese de ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e polissacarídeos, onde estas reações são impulsionadas pela hidrólise de PPI ou de nucleotídeos trifosfatados (BAYKOV *et al.*, 1999).

Os poliP são considerados, por alguns pesquisadores, como uma espécie de “fóssil molecular” em diversos seres vivos, cuja presença e importância é conservada ao longo da evolução, tendo provavelmente um papel importante na fisiologia celular do último ancestral comum de todos os seres vivos (KULAKOVSKAYA *et al.*, 2021). Atualmente os poliP são considerados como reservatório de fósforo e também como reservatório energético, devido à alta energia contida em suas ligações fosfoanidridícas (CRUZ, 2015). Embora sejam encontrados em diferentes organismos ao longo da escala evolutiva, os poliP possuem localizações distintas dentro das células, dependendo do organismo estudado. Assim, os poliP podem ser encontrados, por exemplo, em grânulos, em vacúolos, no núcleo, em mitocôndrias e no citosol (YANG *et al.*, 2017).

Por serem encontrados em uma ampla variedade de células, os polifosfatos e as enzimas que estão envolvidas no seu metabolismo desempenham papel importante na regulação de processos vitais em diversos organismos (YANG *et al.*, 2017). Por exemplo, podem participar do metabolismo energético, da regulação da expressão gênica, da adaptação celular ao estresse, no desenvolvimento e crescimento ósseo em mamíferos, na manutenção na motilidade celular e no transporte através da membrana plasmática (YANG *et al.*, 2017). Os poliP também podem ser usados por algumas proteínas quinases, umas vezes que possuem ligações fosfoanidridícas que se igualam energeticamente ao ATP, podendo substituí-lo neste tipo de reação (CRUZ, 2015). Apesar de serem encontrados em diferentes organismos e possuírem similaridade no seu metabolismo, a enzimologia envolvida neste processo possui particularidades de acordo com cada linhagem estudada (*Trichomonas vaginalis* G3 montagem ASM282v1) (DENONCOURT; DOWNEY, 2021; CARLTON *et al.*, 2007).

Assim, o bom funcionamento dos mecanismos de regulação do PPI e poliP são importantes, sejam eles envolvidos na síntese, degradação e até mesmo no transporte intra e extracelular dessas moléculas (TERKELTAUB, 2001). Para que a homeostase celular de PPI nos organismos vivos seja mantida, é necessário que a atividade das enzimas especializadas na

sua síntese e degradação sejam reguladas de forma eficiente (TERKELTAUB, 2001). Como exemplo de tais enzimas, temos as pirofosfatases inorgânicas, que vão realizar a hidrólise de PPi e liberar Pi. As poliaminas, como a espermina e a espermidina, também podem participar da regulação dos níveis de PPi e poliP, uma vez que possuem capacidade de se complexar com essas moléculas, devido a complementariedade de cargas elétricas (TERKELTAUB, 2001).

### 1.2.2 Enzimas envolvidas no metabolismo de PoliP

No geral, as enzimas que compõem o maquinário de síntese e degradação de poliP em organismos modelos podem ser de dois principais tipos: polifosfatases (PPX), que realizam a quebra ou clivagem dos poliP, ou polifosfato quinases (PPK), responsáveis pela biossíntese dessas moléculas e conseqüentemente formação das suas cadeias (DENONCOURT; DOWNEY, 2021).

Existem diferentes tipos de PPKs como mostrado na quadro 1, sendo as mais estudadas a Polifosfato quinase 1 (Ppk1), responsável por catalisar a transferência reversível de fosfato  $\gamma$  do ATP para a molécula de poliP, e a Ppk2, que sintetiza poliP a partir de ATP ou GTP, mas também pode usar o poliP como doador de Pi para síntese de GTP (BROWN; KORNBERG, 2004). A síntese de poliP também pode ser catalisada pelo complexo chaperona de transporte vacuolar (*Vacuolar Transport Chaperone* - VTC), que está localizado principalmente na membrana do vacúolo de fungos e nas membranas dos acidocalcisomas de tripanossomatídeos (DENONCOURT; DOWNEY, 2021).

**Quadro 1** - Principais enzimas de biossíntese envolvidas no metabolismo de PoliP presente em alguns organismos modelo.

<b>Organismo</b>	<b>Enzima</b>
<i>Escherichia coli</i>	Ppk1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ppk1 e Ppk2
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DdPpk1 e Complexo DdPpk2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Complexo VTC (Vtc1, Vtc2, Vtc3, Vtc4 e Vtc5)
<i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	Complexo VTC (Vtc1 e 4)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Complexo VTC (Vtc1 e 4)

As PPX podem ser classificadas como endopolifosfatases e exopolifosfatases (Quadro 2). As endopolifosfatases são enzimas encontradas principalmente em vacúolos e são responsáveis por fazer a quebra da cadeia de polifosfatos agindo em ligações no interior das

cadeias, ou seja, hidrolisando os poliP em cadeias menores de poliP (DENONCOURT; DOWNEY, 2021). Essas enzimas também podem atuar fazendo o transporte de poliP entre diferentes compartimentos celulares (CRUZ, 2015). Um outro tipo de endofosfatase foi identificada em tripanossomatídeos, a pirofosfatase vacuolar solúvel do tipo 1 (VSP1). Essas proteínas estão localizadas em organelas especiais chamadas de acidocalcissomos, são reguladas por pH e por cofatores metálicos divalentes, como  $Mg^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ , e realizam a hidrólise de PPI e poliP, atuando principalmente em PoliP de cadeia longa (LEMERCIER *et al.*, 2004; CRUZ, 2015).

As exopolifosfatases são as polifosfatases mais estudadas, pois são encontradas em diferentes organelas e em diferentes organismos. Estas enzimas realizam a quebra das cadeias de polifosfatos em moléculas de Pi, e essa quebra se inicia pelas extremidades da cadeia (DENONCOURT; DOWNEY, 2021). Além disso, as exopolifosfatases são consideradas enzimas chaves na regulação do metabolismo de poliP (CRUZ, 2015). Alguns estudos revelam que em tripanossomatídeos existem pelo menos duas exopolifosfatases, denominadas Nh2, localizada nos glicosomos (peroxissomos especializados), e Nh4, localizada no núcleo e no citoplasma, e que funciona como endo e exopolifosfatase (CORDEIRO *et al.*, 2019).

**Quadro 2:** Principais enzimas de hidrólise envolvidas no metabolismo de poliP em organismos modelo.

<b>Organismo</b>	<b>Exopolifosfatase</b>	<b>Endopolifosfatase</b>
<i>Escherichia coli</i>	Ppx1, GppA e FA	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ppx1	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ppx1	Ppn1, Ppn2 e Ddp1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Ppx1 e Nh2	-
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	Nh4 e Vsp1
<i>Homo sapiens</i>	H-Prune	-
<i>Bos taurus</i>	CIAP	-

### 1.2.3 As Pirofosfatases inorgânicas

Pirofosfatases inorgânicas (PPases) são enzimas que promovem a clivagem de um PPI em dois íons fosfato. Esta atividade é importante, visto que controla a concentração celular de PPI, influenciando dessa maneira as vias biossintéticas, como as de síntese de ácidos nucleicos e de proteínas (KAJANDER; KELLOSALO; GOLDMAN, 2013). A hidrólise de PPI auxilia também na resistência ao estresse osmótico (LUGINBUEHL *et al.*, 2011), além do PPI poder ser utilizado como fonte de energia metabólica, no lugar do ATP (BAYKOV *et al.*, 1999).

As pirofosfatases foram descritas pela primeira vez por volta de 1928 em tecidos animais e foram depois encontradas também nos mais diferentes tipos de células e organismos (BAYKOV *et al.*, 1999). Estas proteínas pertencem a um subgrupo de polifosfatases inorgânicas que integram a superfamília das DHH fosfoesterases, enzimas que possuem um motivo Asp-His-His conservado, sendo identificadas inicialmente na proteína H-prune e na exonuclease RecJ bacteriana (FANG, 2007; LUGINBUEHL *et al.*, 2011). Atualmente são conhecidos genes que codificam três tipos de polifosfatases, que são divididas em três grupos. O grupo I compreende as exopolifosfatases citoplasmáticas, encontradas em organismos como *S. cerevisiae*, *T. cruzi* e *T. brucei*. Os grupos II e III são de fato formados principalmente por pirofosfatases (PPases). O grupo II compreende as PPases inorgânicas associadas a membrana de vacúolos e dos acidocalcissomos (LANDER; ULRICH; DOCAMPO, 2013; GALIZZI, 2013), organelas ácidas e eletrondensas, ricas em PPI e poliP e que são encontradas em algumas espécies de bactérias e em alguns eucariotos unicelulares (ULRICH *et al.*, 2014). Este grupo de PPases é responsável por realizar o bombeamento de prótons ( $H^+$ ) para o interior dessas organelas, utilizando nesse processo a energia liberada pela hidrólise de PPI (LANDER; ULRICH; DOCAMPO, 2013; BAYKOV *et al.*, 2017). O grupo III são a PPases solúveis, que produzem calor a partir da hidrólise de PPI, além de participar da biossíntese de lipídeos esteroides, da regulação da motilidade celular, do metabolismo de polifosfatos e de nucleotídeos e também regulação transcricional de alguns genes (GDULA *et al.*, 1998; GALIZZI *et al.*, 2013; BAYKOV *et al.*, 2017). As PPases inorgânicas solúveis são consideradas enzimas chaves do metabolismo celular em diversos organismos, sendo responsáveis por degradar PPI, embora algumas dessas enzimas também possam atuar na degradação de poliP (GALIZZI *et al.*, 2013). A atividade das PPases solúveis é dependente do pH do compartimento celular em que atuam e da utilização de íons metálicos bivalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ) como cofatores para desempenhar sua função de hidrólise de PPI ou de poliP de cadeias curtas e longas (LANDER; ULRICH; DOCAMPO, 2013). As PPases solúveis ainda podem ser divididas em três subgrupos, diferenciados de acordo com o tipo de cofator metálico que utilizam e pelo organismo em que se encontram (GALIZZI *et al.*, 2013). Por exemplo, as PPases solúveis da família I estão presentes em todos os organismos estudados e utilizam  $Mg^{2+}$  como cofator. Já as PPases da família II são encontradas somente em bactérias e utilizam majoritariamente  $Mn^{2+}$  como cofator, embora também sejam ativadas por  $Mg^{2+}$  (GALIZZI *et al.*, 2013). Por fim, as PPases da família III são haloalcanos dehalogenases modificadas encontradas em algumas bactérias (GALIZZI *et al.*, 2013). Muito se discute sobre esta diferença de afinidade ao cofator, e acredita-se que isto ocorre devido à diferença entre os resíduos de aminoácidos presentes nos

sítios ativos dessas proteínas. Por exemplo, as PPases solúveis da família II apresentam atividade cerca de 20 vezes maior na presença de  $Mn^{2+}$  do que na presença de  $Mg^{2+}$ , e existem evidências de que essa diferença ocorre devido à presença de resíduos de histidina no seu sítio catalítico, o que foi descrito na PPase solúvel da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (TAMMENKOSKY *et al.*, 2005).

### **1.3 Modelagem Molecular**

#### **1.3.1 Modelagem Comparativa**

A pesquisa por novas moléculas bioativas, assim com novos alvos para tratamento de diferentes patologias, têm assumido um papel significativo na pesquisa científica médica e farmacêutica. O avanço nessas áreas implicou no desenvolvimento de ferramentas computacionais que dispusessem de métodos que oferecessem, de maneira mais rápida, informações sobre alvos terapêuticos e potenciais novos fármacos (MENG *et al.*, 2011). Assim, foram desenvolvidos e aperfeiçoados uma série de métodos computacionais que realizam a avaliação biológica de maneira rápida e significativa, como por exemplo, a modelagem molecular de biomoléculas. A modelagem molecular compreende um conjunto de ferramentas que permitem a construção, análise, armazenamento, edição e visualização de sistemas moleculares. Dessa maneira, a triagem *in silico* constitui uma excelente ferramenta para prospecção de moléculas bioativas, pois permite a seleção de diversas moléculas com potencial de interação com alvos moleculares de maneira mais rápida e barata, assim como possibilita identificar de características importantes sobre alvos terapêuticos (BARREIRO *et al.*, 1997).

A modelagem comparativa, é uma técnica muito utilizada para predição de estruturas tridimensionais de proteínas homólogas, baseada na evolução molecular (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003). Assim, a modelagem molecular se baseia na premissa de que durante a evolução dos seres vivos as estruturas tridimensionais das proteínas consigam se manter mais conservadas que suas sequências (FIGUEIREDO, 2013). Proteínas são consideradas homólogas desde de que derivem do mesmo gene ancestral. Para que os algoritmos de modelagem comparativa possam inferir estruturas tridimensionais de proteínas cuja estrutura real ainda não foi elucidada por métodos experimentais, é importante que as proteínas comparadas possuam características em comum (DA SILVA; SILVA, 2007), como sequências polipeptídicas que apresentem similaridade estrutural e funcional, assim como conservação de regiões específicas que sejam importantes para o funcionamento das mesmas (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Para a aplicação das técnicas de modelagem comparativa, é necessário que pelo menos a estrutura de uma proteína da família já tenha sido elucidada através de técnicas experimentais (FIGUEIREDO, 2013). Além disso, é preciso buscar pelas sequências das proteínas de interesse e, posteriormente, realizar um alinhamento entre as estruturas primárias da proteína molde e da proteína de interesse para que seja possível avaliar a similaridade compartilhada entre elas (DA SILVA; SILVA, 2007). Dessa forma, é consensual que seja necessário o compartilhamento de pelo menos 25% de identidade entre a proteína molde e a proteína alvo a ser modelada (FIGUEIREDO, 2013). Com isso, torna-se possível a construção, otimização e por fim validação da estrutura tridimensional do modelo, garantindo que a estrutura obtida seja realista e confiável (DA SILVA; SILVA, 2007).

Em procedimentos de modelagem comparativa, são empregados dezenas de programas e servidores disponibilizados para a comunidade científica. Assim existem bancos de dados de sequências polipeptídicas, como o banco de sequências (*GeneBank*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), bancos de dados de coordenadas de estruturas proteicas elucidadas experimentalmente, como o PDB (*Protein Data Bank*), programas de alinhamento de sequências primárias de proteínas baseado em técnica de programação dinâmica, como o Clustal Omega, programas e servidores que realizam a construção dos modelos empregando estruturas molde, como o Swiss-Model, servidores que realizam uma otimização energética dos modelos iniciais, como ModRefiner. Ainda são empregados servidores que realizam a validação das estruturas dos modelos obtidos, como o PROCHECK que avalia características como o comprimento de ligação, os ângulos planos, quiralidade, planaridade dos anéis de cadeias laterais, conformação de cadeias laterais, ângulos torcionais e impedimento estérico (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003) e o ProSA-Web que avalia a qualidade geral do modelo, medindo o desvio da energia total da estrutura através dos valores do Z-scores, valores fora de uma faixa indicam estruturas errôneas (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). E por fim programas que permitem a visualização das estruturas tridimensionais, como Swiss-PDBViewer (DeepView), BIOVIA Discovery Studio e PyMOL.

### **1.3.2 Docking Molecular**

A partir da estrutura tridimensional de uma proteína, é possível realizar o procedimento de *docking* molecular, ou ancoramento molecular. Esta ferramenta tem sido utilizada desde 1980 e tem como objetivo investigar, de forma computacional, as interações entre um ligante e seu receptor, se tornando uma ferramenta muito importante na pesquisa farmacêutica (MENG *et al.*, 2011). Os ligantes, no caso, costumam ser pequenas moléculas, como substratos,



cofatores e inibidores, enquanto os receptores são as proteínas, com estrutura definida experimentalmente ou modeladas, às quais se pretende avaliar *in silico* a interação com os ligantes. Assim, os procedimentos de *docking* molecular buscam avaliar quais interações ocorrem, onde e como ocorrem, assim como procuram determinar a afinidade de ligação de determinados ligantes nos sítios de interação das proteínas alvo (MENG *et al.*, 2011). Normalmente são buscadas as interações que formam pares receptor-ligante mais estáveis, representadas pelos complexos que apresentam menor energia livre. Para isso são utilizados algoritmos de busca e funções de avaliação que buscam por possíveis orientações/conformações mais favoráveis entre as interações possíveis que possam ocorrer entre um ligante e seu receptor (MORGON; COUTINHO, 2007).

O processo de reconhecimento normalmente utilizado pelos programas de *docking* se baseia na teoria da chave e fechadura, proposta por Fischer (MENG *et al.*, 2011). Os programas atualmente disponíveis possibilitam que o procedimento de *docking* seja realizado de forma rígida, onde mantem regiões do receptor rígidas, ou de forma flexível, em que algumas regiões do receptor permanecem flexíveis, podendo haver mudança de conformação durante a interação com o ligante (YURIEV; AGOSTINO; RAMSLAND, 2011). Conhecer os sítios de ligação e suas características antes deste processo é de grande importância, uma vez que isso pode garantir que o encaixe ocorra de maneira mais realista e eficiente (MENG *et al.*, 2011).

Alguns programas e servidores estão disponíveis para este tipo de metodologia. Para a preparações dos ligantes que posteriormente são utilizados no procedimento de *docking* são empregados programas como, PC Spartan Pro, Avogadro, entre outros. E programas como Autodock 4 costumam ser empregados para realizar o *docking* de um ligante na proteína de interesse. Além disso, nesta etapa também são utilizados os programas de visualização das estruturas citados anteriormente, sendo que neste caso eles são empregados para análise visual do complexo proteína-ligante e suas poses.

## 2. JUSTIFICATIVA

A tricomoníase é considerada a IST não viral mais prevalente no mundo e constitui um problema de saúde pública mundial (MACHADO; SOUZA, 2012; MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004), com a ocorrência de aproximadamente 1 milhão de novas infecções por dia (ROWLEY *et al.*, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) anualmente são registrados cerca de 170 milhões de novos casos de tricomoníase em todo o mundo, com aproximadamente 4,3 milhões ocorrendo no Brasil (BRAVO *et al.*, 2010). Além disso, a tricomoníase levando a outros problemas de saúde, por exemplo, facilita e promove a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e também é considerada a causa de nascimento de bebês prematuros, bem como de baixo peso, câncer cervical em mulheres e infertilidade (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Pensando nisso, a busca por novos métodos de combate, prevenção e tratamento é demasiado importante. Buscar entender e conhecer melhor sobre a biologia do *T. vaginalis*, bem como suas vias metabólicas e seus mecanismos de patogenicidade pode facilitar que novos métodos de controle e tratamento sejam desenvolvidos. Nesse contexto, é interessante investigar as pirofosfatases inorgânicas (PPases) de *T. vaginalis*, visto que as PPases estão envolvidas na síntese e degradação de pirofosfatos inorgânicos (PPi), mas podem participar também da degradação de polifosfatos inorgânicos (poliP), moléculas importantes por participarem de diferentes processos celulares considerados vitais.

Desta maneira, é importante conhecer melhor sobre a funcionalidade das pirofosfatases inorgânicas. Para isso pode-se fazer a utilização de ferramentas computacionais e métodos de modelagem molecular, para que seja possível obter a estrutura tridimensional destas proteínas e assim entender sua afinidade com seus substratos, bem como sua importância na regulação de diferentes eventos fisiológicos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo inicial desse trabalho consistiu identificar proteínas envolvidas nas vias de síntese e degradação de polifosfatos no parasito *T. vaginalis*. Assim, este trabalho buscou identificar e caracterizar *in silico* a família de PPases solúveis do parasito *Trichomonas vaginalis*, bem como investigar sua funcionalidade e sua contribuição na síntese e degradação de pirofosfato e polifosfatos inorgânicos neste parasito.

#### 3.2 Objetivo específicos

- I. Investigar, a partir de análise genômica, quais as enzimas envolvidas no metabolismo de polifosfatos que estão presentes em *T. vaginalis*, e a qual classe estas pertencem;
- II. Obter os modelos tridimensionais das pirofosfatases (PPases) de *T. vaginalis*, através da modelagem comparativa;
- III. Determinar a capacidade das pirofosfatases (PPases) de *T. vaginalis* de interagirem com pirofosfato e polifosfatos inorgânicos, através do *docking molecular*;

## 4 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Levantamento bibliográfico e mineração genômica

A metodologia utilizada deste trabalho iniciou-se com uma pesquisa e mineração no genoma do parasito *Trichomonas vaginalis* G3 (montagem ASM282v1; CARLTON *et al.*, 2007) para identificar genes que possuem homologia às principais enzimas envolvidas nas vias metabólicas de síntese e degradação de poliP em outros organismos modelo. Para isso, buscou-se na literatura e nos bancos de dados do NCBI e do *Trichomonas vaginalis Database* (*TrichDB*), enzimas envolvidas na síntese e degradação de polifosfatos.

Este procedimento foi realizado conforme as seguintes etapas descritas abaixo:

- I. Busca na literatura (artigos, livros e outros) pela sequência peptídica das principais proteínas envolvidas no metabolismo de poliP (polifosfato quinases-PPK e polifosfatases-PPX);
- II. Busca nominal em banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para identificar as principais proteínas envolvidas no metabolismo de poliP (PPK e PPX);
- III. Realização de busca com o algoritmo BLAST no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pelas das sequências peptídicas destas proteínas (PPK e PPX). Nesta etapa os seguintes parâmetros foram utilizados; Programa: BlastP; Banco de dados: *non redundant*; Organismo: Metamonada; Algoritmo: PSI-Blast; Limiar esperado (Expect threshold): 1; Tamanho da palavra de busca (*word size*): 3; removeu-se o filtro de regiões de baixa complexidade (*Low complexity regions*);
- IV. Identificação de organismos com genes das PPX e PPK envolvidas neste metabolismo em organismos pertencentes aos Metamonada e armazenamento das sequências em formato FASTA;
- V. Realização de busca com o algoritmo BLAST no TrichDB (<https://trichdb.org/trichdb/app/>), utilizando as sequências obtidas no passo II, na busca de genes homólogos destas proteínas em *T. vaginalis*, cepa referência G3. Nesta etapa os seguintes parâmetros foram utilizados: Tipo de dados (*Target Data Type*): protein; Programa de Blast: Blastp; ou ainda Tipo de dados: genome; Programa de Blast: tBlastn;

- VI. Identificação dos prováveis genes das PPX e PPK envolvidas neste metabolismo em *T. vaginalis* e armazenamento das sequências em formato FASTA;
- VII. Para as sequências obtidas no passo III identificadas em organismos pertencentes aos Metamonada, mas distintos de *T. vaginalis* (ex. *Giardia intestinalis*), utilizando buscas no banco de dados do TrichDB, empregando os mesmos parâmetros da etapa V, e no banco de dados do NCBI, empregando o mesmo procedimento da etapa III, mas restringindo o parâmetro “Organismo” para *Trichomonas vaginalis*;
- VIII. Identificação dos prováveis genes das PPX e PPK envolvidas neste metabolismo em *T. vaginalis* e armazenamento das sequências em formato FASTA;
- IX. Foram realizadas buscas com o algoritmo BLAST (BLAST reverso) no banco de dados NCBI para todas as proteínas de *T. vaginalis* que foram encontradas em ambas as buscas, para verificar a semelhança destas proteínas com as enzimas envolvidas no metabolismo de PPi e PoliP em outros organismos. Nesta etapa os seguintes parâmetros foram utilizados: Programa: BlastP; Banco de dados: *RefSeq\_proteins*; Organismo: excluiu-se *Parabasalia*; Algoritmo: Blast; Limiar esperado (*expect threshold*): 0.1; Tamanho da palavra de busca (*word size*): 3; removeu-se o filtro de regiões de baixa complexidade (*Low complexity regions*).
- X. Sequências peptídicas que apresentaram melhores resultados da etapa IX com enzimas envolvidas no metabolismo de poliP de outros organismos foram consideradas como potenciais ortólogos dessas proteínas em *T. vaginalis*.

#### 4.2 Alinhamento e matriz de identidade e similaridade

Os alinhamentos múltiplos foram feitos utilizando o servidor online *Clustal Omega v 2.1* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que permite realização de alinhamento de múltiplas sequências utilizando árvores guia semeadas e técnicas de HMM (Hidden Markov Model) profile-profile, permitindo ainda a produção de alinhamentos múltiplos significativos de sequências divergentes (SIEVERS *et al.*, 2011). O alinhamento, feito no servidor, foi salvo no formato “.aln”. A edição do alinhamento múltiplo foi realizada utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5*.

Para comparação entre as sequências peptídicas utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5* foi construída uma matriz de identidade e similaridade empregando a matriz PAM250 (*Point Accepted Mutation*). Os percentuais de identidade e similaridade foram avaliados em valores que variam de 0-100%, onde a proteínas que mostraram score maior são consideradas mais similares entre si.

### 4.3 Modelagem Molecular – Construção, minimização e validação dos modelos tridimensionais das PPases de *T. vaginalis*

A construção dos modelos tridimensionais foi realizada por modelagem comparativa, onde utilizou-se o servidor *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) (ARNOLD *et al.*, 2006; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009). Foram utilizadas as sequências peptídicas das quatro PPases de *T. vaginalis* em formato FASTA para busca e obtenção dos possíveis moldes. Antes dos modelos serem construídos, realizou-se um alinhamento das sequências das PPases de *T. vaginalis* com os moldes sugeridos, para análise da conservação ao longo das sequências (cobertura) e da similaridade compartilhada entre as sequências peptídicas, para que o molde escolhido fosse o mais adequado (ARNOLD *et al.*, 2006; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009). Assim, os seguintes moldes foram utilizados:

- I. Estrutura cristalina da Pirofosfatase Inorgânica PPA1 do vegetal *Arabidopsis thaliana*, que possui três íons  $Mg^{2+}$  como ligantes (Código PDB: 5LS0) para as PPases 1, 2 e 3;
- II. Estrutura cristalina da Pirofosfatase Inorgânica do vegetal *Medicago truncatula* (Código PDB: 6MT1) para a PPase 4;

Os modelos obtidos foram submetidos a etapas de refinamento no servidor *ModRefiner* (*High-Resolution Protein Structure Refinement*; <https://zhanggroup.org/ModRefiner/>). O processo de refinamento realizado pelo ModRefiner pode ser dividido em dois passos, sendo o primeiro a construção da cadeia principal, adicionando átomos de carbono e nitrogênio utilizando parâmetros de distância, ângulos internos e de torção, e por fim é feita a minimização da energia. Em seguida são construídas as cadeias laterais, pela adição átomo de carbono e nitrogênio, acompanhados de minimização de energia (XU; ZHANG, 2011).

A validação dos modelos tridimensionais refinados foi feita utilizando as ferramentas disponíveis no servidor *SAVES v. 6.0*, que permitiu que os modelos fossem analisados através da qualidade estereoquímica (*PROCHECK* – gráficos de Ramachandran) (LASKOWSKI,

1993) e através da análise da compatibilidade da estrutura primária com a estrutura 3D dos modelos (*Verify3D*) (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991). O servidor *ProSA-web* também foi utilizado na validação dos modelos refinados, onde foi levado em consideração o *Score-Z* e a energia de cada resíduo de aminoácido (SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Por fim, os mapas de potencial eletrostáticos das quatro proteínas foram calculados utilizando o servidor *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS), e a ferramenta *PDB2PQR v 3.5.2* (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>) e programa *PyMOL v 2.5.2* (*The PyMOL Molecular Graphics System*).

#### 4.4 Protonação dos resíduos de aminoácidos das proteínas

Para a análise dos estados de ionização dos resíduos de aminoácidos associados ao sítio de ligação das proteínas PPases, inicialmente utilizou-se o servidor *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS), e a ferramenta *PDB2PQR v 3.5.2* (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>), onde o cálculo de pKa foi realizado tendo como referência as condições de pH 6 e 8, uma vez que não se sabe exatamente a localização subcelular das PPases e, conseqüentemente, não se sabe o pH da região onde são encontradas. Nesta etapa utilizou-se parâmetros como: campo de força eletrostática contínua “PARSE”, nomenclatura de saída “*Internal naming scheme*” e parâmetros adicionais padronizados pelo servidor. O arquivo de saída gerado pelo servidor no formato “log” foi salvo e os valores de pKa fornecidos foram observados, de forma que resíduos de aminoácidos básicos (histidina, arginina e lisina) que tinham valor de pKa maior que o pH do meio, estavam em estado ionizado, já os que tinham valor de pKa menor que o valor do pH do meio, estavam em estado neutro. Para os resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico, ácido aspártico) ou polares não carregados (cisteína e tirosina) que tinham valor de pKa menor que o pH do meio, promoviam a formação de grupos ionizados, já aqueles que tinham valor de pKa maior que o pH do meio, promoviam formação de grupos neutros (DOLINSKY *et al.*, 2004; JURRUS *et al.*, 2017). Somente os aminoácidos que estivessem em estado ionizado foram alterados, onde retirou-se H<sup>+</sup> dos aminoácidos básicos e adicionou-se H<sup>+</sup> nos aminoácidos ácidos.

Em seguida utilizou-se o programa *UCSF Chimera v 1.16* para alterar o estado de protonação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que estavam em estado ionizado. Então retirou-se e adicionou-se H<sup>+</sup> levando em consideração os seguintes parâmetros: “*consider each model in isolation from all others*”, com o método “*also consider H-bonds (slower)*”. Em seguida selecionou-se o resíduo de aminoácidos desejado em “*Protonation states for*” e

“*Individually chosen*”, onde  $H^+$  delta ou épsilon foi escolhido, de acordo com a sugestão do programa (PETTERSEN *et al.*, 2004).

#### 4.5 Construção dos ligantes e adição do cofator metálico nos modelos construídos

Utilizou-se o programa PC *Spartan Pro v 1.0.5* (Wavefunction Inc.) para construção dos quatro ligantes, sendo pirofosfato (PPi) e polifosfatos com três tamanhos de cadeias diferentes (PoliP3, PoliP5 e PoliP15, contando, respectivamente, três, cinco e quinze fosfatos ligados linearmente). Estes foram construídos em suas formas ionizadas com cargas  $-2$  e os conformeros de menor energia foram minimizados através do método semi-empírico AM1, empregando os seguintes parâmetros: “*Equilibrium Geometry*”, “*Semi-Empirical AM1*”, “*Electric Charges*”, “*Orbitals&Energies*” e “*Atomic charges*”. Os ligantes foram salvos no formato “Spartan” e em seguida foram realizados os cálculos de análise conformacional através dos parâmetros “*Conformer Distribution*” e “*Molecular Mechanics*”, assim como a atribuição do campo de força molecular Merck (MMFF94), obtendo as conformações moleculares mais estáveis (HALGREN; NACHBAR, 1996). Por fim, os ligantes foram salvos no formato “.pdb”.

A estratégia para inserção do cofator metálico  $Mg^{2+}$  nos modelos foi realizada com base nas estruturas depositadas no PDB de uma pirofosfatase inorgânica ativada por magnésio da archaea *Thermococcus thio-reducens* (HUGHES *et al.*, 2012). Visto que uma vez que essas proteínas se ligam ao cofator e ao substrato, a hidrólise do PPi acontece rapidamente, para elucidação do mecanismo de ação dessa enzima, esses autores produziram uma estrutura (código PDB: 5UCQ) a partir de cristais ligados a PPi e  $Ca^{2+}$  (em que o cálcio não viabiliza a hidrólise do PPi) e outra (código PDB: 3Q46) com produtos da hidrólise do PPi e  $Mg^{2+}$  (que permite verificar a ligação do cofator, mas não a interação inicial com o substrato). Assim o íon  $Mg^{2+}$  foi inserido com base na estrutura 3Q46, que contém quatro íons  $Mg^{2+}$  (305, 306, 307 e 308). Manteve-se somente um íon do cofator metálico, e o selecionado foi aquele que mostrou possuir maior número de interações em comum com o íon  $Ca^{2+}$  da estrutura 5UCQ. Para isso, realizou-se um alinhamento entre as duas estruturas da proteína (3Q46 e 5UCQ) nos programas *PyMOL v 2.5.2* (*The PyMOL Molecular Graphics System*) e *BIOVIA v21.1.0.20298* (*Discovery Studio Visualizer*), e avaliou-se a semelhança entre as coordenadas dos íons presentes em cada uma das estruturas, além das interações bem conservadas do cofator com resíduos de aminoácidos.

Uma vez identificado e selecionado o íon  $Mg^{2+}$  que melhor se adequava às características citadas anteriormente, realizou-se um alinhamento entre estrutura da proteína que continha o íon do cofator (3Q46) com cada um dos modelos das PPases de *T. vaginalis* (1,



2, 3 e 4), utilizando o programa *Swiss-PdbViewer (SPDBV) v.4.1.0* (RHODES, 2006), onde todos os resíduos da proteína referência foram excluídos e somente foi deixado o átomo do cofator metálico e, por fim, as PPases agora com o  $Mg^{2+}$ , foram salvas em formato “.pdb”.

#### 4.6 Estratégia de validação por *redocking*

A capacidade dos modelos das PPases de *T. vaginalis* ligarem a PPI e poliP foi investigada através de *docking* molecular, utilizando o programa *AutoDock v.4.2* e a interface gráfica *AutoDockTools v.1.5.4*. Esta ferramenta de *docking* utiliza grades de energia (*grids*) geradas pelo programa *AutoGrid v.4.0*. Estes *grids* possuem a função de reduzir o custo computacional e sua construção é feita através de cálculos preliminares da interação entre o ligante e receptor, para que posteriormente a energia total de interação possa ser calculada pelo Autodock (MORGON; COUTINHO, 2007; KITCHEN *et al.*, 2004). Nesta etapa utilizou-se como ligante o PPI.

Em estudos de *docking* molecular, uma etapa de *redocking* entre molde e ligante cocristalizado costuma ser empregada, de forma a validar a metodologia e os parâmetros usados durante o *docking*. Como no presente estudo os moldes considerados como mais adequados para confecção dos modelos não foram cocristalizados com ligantes, um procedimento convencional de *redocking* empregando esses moldes não foi possível. Realizamos assim uma adaptação do procedimento de *redocking*, empregando uma PPase com estrutura tridimensional semelhante ao molde, mas que foi cocristalizada com ligantes e cofatores. Assim o procedimento adaptado de *redocking* do PPI foi feito com uma pirofosfatase inorgânica da archaea *T. thio-reducens* (código PDB: 5UCQ), mencionada anteriormente.

As proteínas de estudo e os ligantes foram preparadas no programa *AutoDock Tools 1.5.4*, adicionando-se hidrogênios polares e as cargas *Gasteiger*, mantendo-se a estrutura rígida das proteínas. O  $Mg^{2+}$  e suas coordenadas foram extraídos da estrutura da pirofosfatase inorgânica de *T. thio-reducens* (código PDB: 3Q46), conforme os procedimentos descritos no item 4.5. Por fim, as estruturas foram salvas em formato “.pdbqt”. Utilizou-se uma caixa com dimensão de  $40 \times 40 \times 40$  pontos, com espaçamento padrão de  $0,375 \text{ \AA}$ . Neste procedimento de *redocking* do PPI, a caixa foi centralizada de acordo com as coordenadas xyz do átomo de nitrogênio do resíduo da lisina 154 da proteína de referência (código PDB: 3Q46), definidas como 10.702955, 7.497188 e -15.278061.

No total foram solicitadas as 50 melhores poses dos ligantes em cada modelo. As poses de menor energia e as interações obtidas com o cálculo de *docking* molecular foram analisadas utilizando os programas *Autodock v 4.2*, *PyMOL v 2.5.2 (The PyMOL Molecular Graphics*

*System*) e *Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298*. Por fim, as 50 poses obtidas foram agrupadas de acordo com os valores de até 2,0 Å de desvio da raiz média quadrática (Root-mean-square deviation of atomic positions - RMSD) encontrado nas diferentes poses (POSPISIL *et al.*, 2002).

#### 4.7 Docking molecular

A capacidade dos modelos das PPases de *T. vaginalis* ligarem a PPI e poliPs foi investigada através de *docking* molecular, empregando os mesmos programas e procedimentos descritos anteriormente para o procedimento de *redocking*, no item 4.6.

Para o procedimento de *docking*, os polifosfatos inorgânicos poliP3, poliP5 e poliP15, foram utilizados como ligantes, sendo construídos conforme descrito no item 4.5. O Mg<sup>2+</sup> e suas coordenadas foram extraídos da estrutura da pirofosfatase inorgânica de *T. thio-reducens* (código PDB: 3Q46), conforme os procedimentos descritos anteriormente no item 4.5. As proteínas e os ligantes em foram preparados adicionando-se os hidrogênios polares as cargas de *Gasteiger* no programa *AutoDock Tools 1.5.4*. Posteriormente, os hidrogênios não polares foram adicionados utilizando ainda o programa *AutoDock Tools 1.5.4*, e por fim, as estruturas foram salvas em formato “.pdbqt”. Foram utilizadas caixas com dimensões de 40 × 40 × 40 pontos para PPI, poliP3, poliP5 e 60 × 60 × 40 pontos para poliP15, com espaçamento padrão de 0,375 Å. A caixa foi centralizada em torno das coordenadas do átomo de nitrogênio do resíduo de aminoácido lisina 154 (LYS154), localizadas próximo à região de ligação dos fosfatos (CRUZ *et al.*, 2018), definido pelas coordenadas cartesianas 10.702955, 7.497188 e -15.278061. e presente na estrutura da pirofosfatase inorgânica de archaea *T. thio-reducens* (código PDB:5UCQ). Para as TvPPase 4 na lisina 105 (LYS158). O algoritmo genético Lamarckiano foi empregado como método de busca e os demais parâmetros foram os pré-estabelecidos como padrão pelo programa. No total foram solicitadas as 50 melhores poses dos ligantes em cada modelo. As poses de menor energia e as interações obtidas com o cálculo de *docking* molecular foram analisadas utilizando os programas *PyMOL v 2.5.2 (The PyMOL Molecular Graphics System)* e *Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298*.

Por fim, as 50 poses obtidas foram agrupadas de acordo com os valores de até 2,0 Å de RMSD) encontrado nas diferentes poses (POSPISIL *et al.*, 2002).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Busca por ortólogos de enzimas envolvidas no metabolismo de polifosfatos no genoma de *Trichomonas vaginalis*

O metabolismo de polifosfatos vem sendo estudado em uma série de organismos, e papéis importantes dessas moléculas na fisiologia celular vêm sendo descritos para microrganismos eucarióticos, como tripanossomatídeos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a ameba social *Dictyostelium discoideum* e a alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (DENONCOURT; DOWNEY, 2021). Até o momento, não há descrição na literatura de polifosfatos ou das enzimas envolvidas em seu metabolismo no parasito *T. vaginalis*. Assim, com o objetivo de identificar possíveis ortólogos de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de polifosfatos em *T. vaginalis*, buscas extensivas baseadas em ferramentas BLASTp e tBLASTn foram conduzidas nos bancos de dados do NCBI e do TrichDB (buscando no genoma da cepa referência G3).

Foram usadas para as buscas sequências peptídicas referência das enzimas mencionadas nos quadros 1 e 2. Em geral, não foram encontradas sequências de *T. vaginalis* compartilhando similaridade considerável e que indicasse que pudessem corresponder a ortólogos desses genes em *T. vaginalis*. Como as enzimas envolvidas no metabolismo de polifosfatos podem ser muito divergentes e não homólogas entre as linhagens de organismos estudadas (DESFOUGÈRES; SAIARDI; AZEVEDO, 2021), é possível que, caso polifosfatases e polifosfato quinases existam em *T. vaginalis*, elas tenham estrutura e sequências muito distintas das enzimas já descritas em outros organismos. No entanto, a partir da busca por ortólogos da endopolifosfatase de *T. brucei* (TbVsp1) (código no NCBI: XP\_828780.1), foram identificados quatro genes que codificam pirofosfatases inorgânicas (PPases) em *T. vaginalis*. Como em *T. brucei* a TbVsp1 participa tanto da hidrólise de pirofosfato quanto de polifosfatos, é possível que um ou mais dos ortólogos identificados em *T. vaginalis* compartilhem também dessa propriedade funcional. Estas PPases mostraram valores entre 32% e 37% de similaridade e identidade respectivamente, com a TbVsp1, e foram denominados como TvPPases 1–4 (tabela 1).

A matriz de identidade e similaridade mostrou que dentre essas quatro proteínas, a TvPPases 4 é a mais divergente, sendo a menos parecida entre as quatro PPases, é também a que compartilha menor similaridade de sequência com a TbVsp1. A TvPPase 1 é a proteína que compartilha maior similaridade de sequência com a TbVsp1.

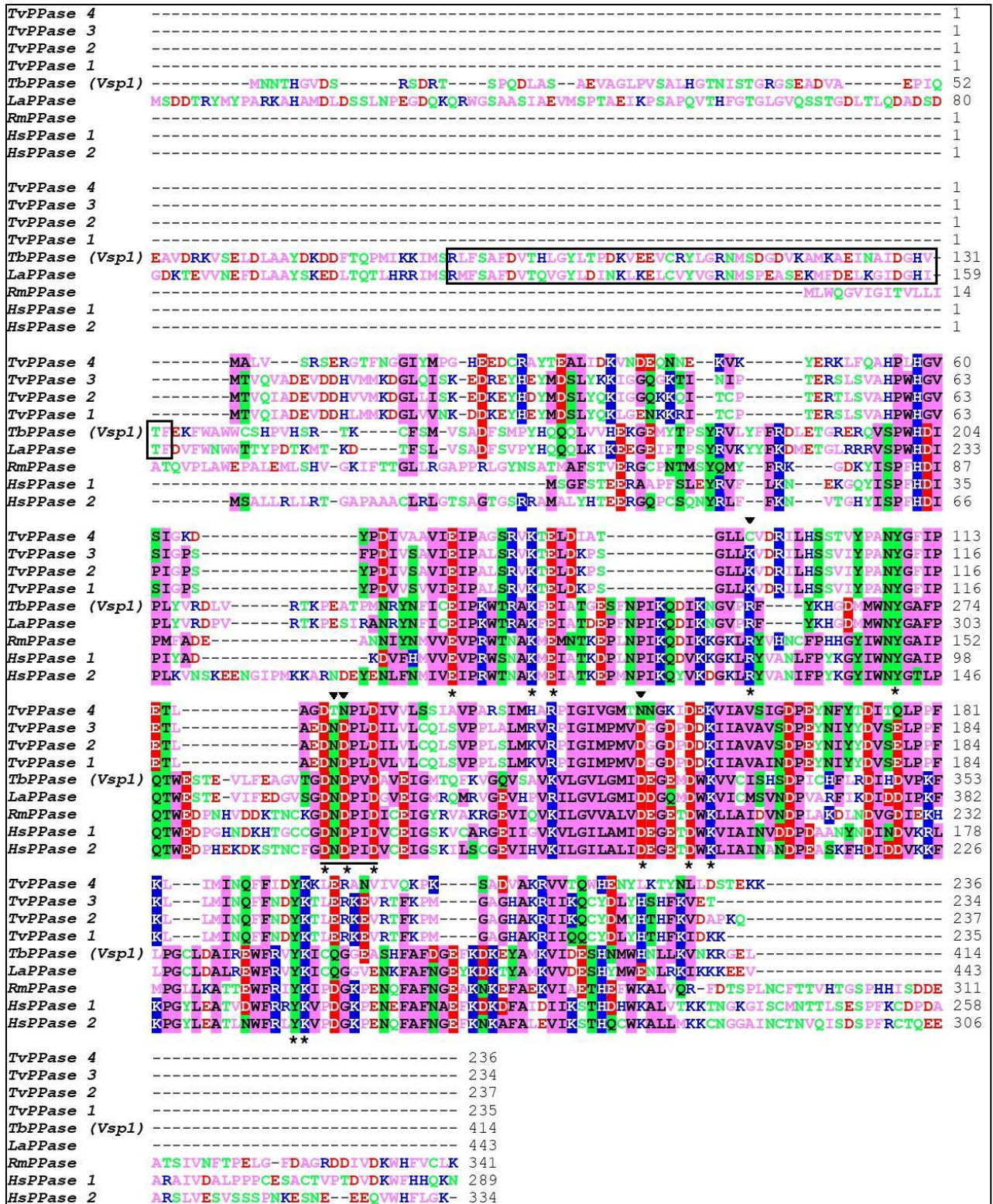
**Tabela 1** - Matriz de identidade e similaridade compartilhadas entre as quatro pirofosfatases de *T. vaginalis* e a Vsp1 de *T. brucei*.

	TbVsp1	TvPPase 1	TvPPase 2	TvPPase 3	TvPPase 4
TbVsp1	100/100	16,34/36,53	17,54/34,61	16,46/34,37	15,86/32,69
TvPPase 1		100/100	89,87/98,31	87,65/96,17	50/71,12
TvPPase 2			100/100	90,71/96,62	50/72,80
TvPPase 3				100/100	50/71,56
TvPPase 4					100/100

Valores de identidade e similaridade respectivamente apresentados em porcentagem. Código dos *loci* no TrichDB: TVAG\_12660; TVAG\_472200; TVAG\_019690 e TVAG\_231330, para TvPPases 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Código de acesso de TbVsp1 no NCBI: XP\_828780.1 **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *Clustal Omega v 2.1* e *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5*.

Foi realizado um alinhamento múltiplo com as sequências proteicas dos genes TvPPases 1–4 identificados e com as sequências proteicas de cinco PPases já bem caracterizadas em outros organismos e descritas na literatura (TbVsp1 de *T. brucei*, PPases do carrapato *Rhipicephalus microplus*, do parasito *Leishmania amazonenses* e de *Homo sapiens*) (figura 6). As PPases de tripanossomatídeos e a enzima do carrapato *R. microplus* foram escolhidas devido ao fato de terem a capacidade de hidrolisar tanto PPI quanto poliP (LEMERCIER *et al.*, 2004; ESPIAU *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2018).

O alinhamento permitiu identificar as regiões estruturalmente bem conservadas, além das regiões variáveis entre as proteínas homólogas. As regiões ricas em inserções representam os segmentos de menor similaridade entre as sequências, que costumam ser características de regiões de alças (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003). Podem ser notadas pequenas variações em alguns dos 13 resíduos de aminoácidos importantes para a função enzimática das pirofosfatases (GÓMEZ-GARCÍA; LOSADA; SERRANO; 2006; Figura 6). A TvPPases 4 apresentou quatro variações nestes aminoácidos, como a substituição de uma arginina por uma cisteína na posição 94; a substituição de uma asparagina por uma treonina na posição 120, a substituição de um ácido aspártico por uma asparagina na posição 121 e de um ácido aspártico por uma asparagina na posição 151. Em especial, a posição 121 da TvPPase 4 pertence ao motivo DXDXXD, característico das PPases solúveis da família I (GÓMEZ-GARCÍA; LOSADA; SERRANO; 2006). A substituição nessa posição pode ser um indicativo de a TvPPase 4 possa ter seu mecanismo catalítico inativo ou alterado, em relação aos demais membros da família de PPases solúveis. Com relação às TvPPases 1, 2 e 3, observou-se apenas uma substituição dos 13 resíduos de aminoácidos importantes para a função enzimática das proteínas, na posição 97, onde ocorre a mudança conservativa de um resíduo de aminoácido básico por outro (arginina por lisina).



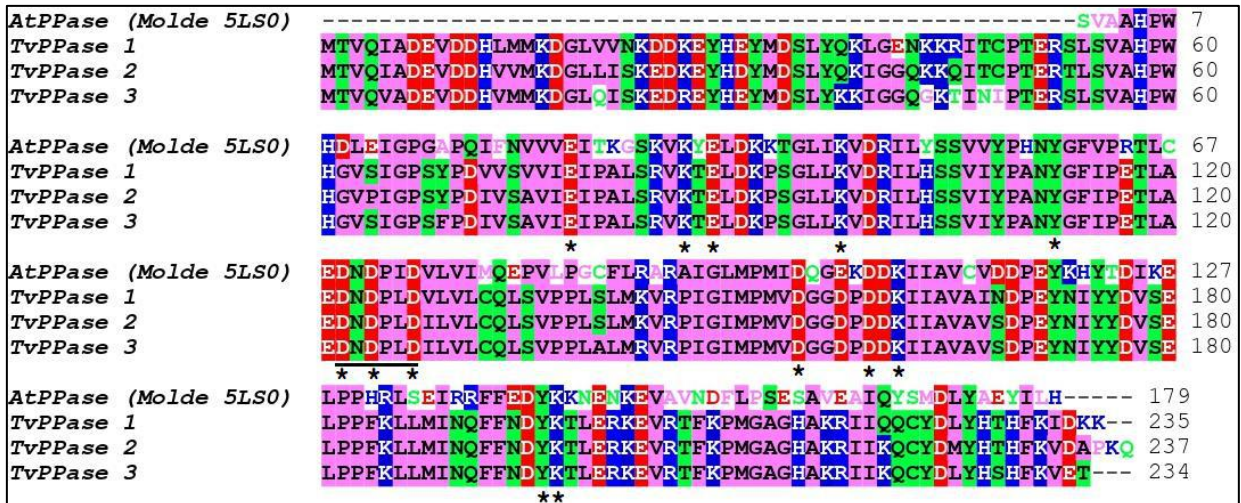
**Figura 6** - Alinhamento múltiplo com nove seqüências proteicas de pirofosfatases (PPases). Tv: *T. vaginalis*; Tb: *T. brucei*; Rm: *R. microplus*; La: *Leishmania amazonensis* e Hs: *H. sapiens*. Os 13 resíduos do sítio ativo importantes para atividade catalítica estão indicados por asteriscos abaixo das colunas. Os triângulos invertidos acima das colunas apontam substituições de resíduos da TvPPase 4. A região sublinhada corresponde ao motivo DXDXXD, característico das PPases solúveis da família I. A caixa representa a extensão N-terminal (domínio EF-hand, de ligação ao Ca<sup>2+</sup>) encontrada nas proteínas de tripanossomatídeos. As cores indicam as características químicas dos aminoácidos (vermelho: ácidos; verde: polar; azul: básico; lilás: apolar) e os blocos coloridos sombreados indicam posições com conservação entre as seqüências alinhadas. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no Clustal Omega v 2.1 e BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5.

As proteínas de tripanossomatídeos (TbPPase/Vsp1 e LaPPase), apresentam um grande domínio de extensão N-terminal, chamado domínio *EF-hand* do tipo II de ligação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 6). Este domínio é importante para regulação da atividade celular, participando da osmorregulação e virulência assim como participa da regulação do estado de oligomerização destas proteínas (LEMERCIER *et al.*, 2004). Nenhuma das TvPPases 1-4 mostram possuir resíduos de aminoácido conservados nesta região, desta maneira pode-se dizer que não há presença deste domínio *EF-hand* nestas proteínas.

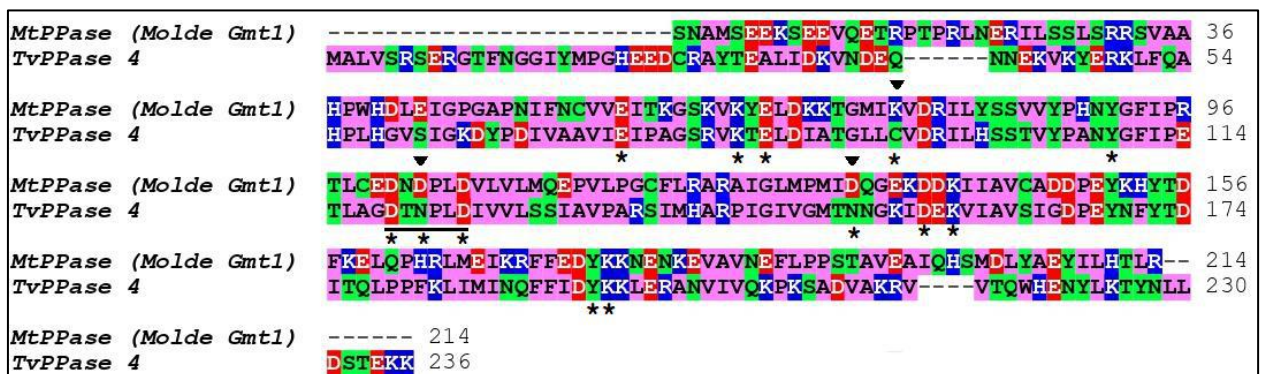
As variações observadas em alguns dos 13 resíduos de aminoácidos do sítio ativo podem ter relação com variações na especificidade e particularidades destas proteínas. Ainda assim as TvPPases 1, 2 e 3 mostram-se bastante similares entre si e com as demais PPases comparadas. Com exceções notáveis apenas para a TvPPase 4, reafirmando as diferenças observadas anteriormente com a matriz de identidade/similaridade.

## 5.2 Busca e obtenção dos modelos tridimensionais das TvPPases

As sequências peptídicas das TvPPases 1 – 4 foram submetidas ao procedimento de modelagem comparativa, utilizando o servidor *Swiss Model* (ARNOLD *et al.*, 2006; GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009) para a obtenção de modelos estruturais que pudessem posteriormente ser testados quanto a sua capacidade de interação com PPi e poliP. Para escolha dos moldes foram levados em consideração um conjunto de parâmetros fornecidos pelo *Swiss Model*, que permitiram avaliar as estruturas mais adequadas para guiar a modelagem de cada TvPPase. A estrutura 3D obtida do cristal da pirofosfatase inorgânica PPA1 do vegetal *Arabidopsis thaliana*, que possui três íons  $\text{Mg}^{2+}$  como ligantes (código PDB: 5LS0), foi empregada como molde para construção dos modelos das TvPPases 1, 2 e 3. Já a estrutura obtida do cristal da pirofosfatase inorgânica do vegetal *Medicago truncatula* (código PDB: 6MT1) foi escolhida como molde para a TvPPase 4. Um alinhamento múltiplo entre as sequências peptídicas das TvPPases com os moldes revelou boa conservação da similaridade ao longo das sequências, de forma que foi possível detectar as regiões bem conservadas, além das regiões variáveis entres as sequências dos moldes e dos modelos (Figuras 7 e 8).



**Figura 7** - Alinhamento múltiplo com as sequências proteicas das TvPPases 1-3 e do molde selecionado (5LS0) para construção dos modelos 3D. At: *A. thaliana*; Tv: *T. vaginalis*. Os asteriscos (\*) representam os 13 resíduos do sítio ativo que são importantes para atividade das PPases. A região sublinhada representa o motivo DXDXXD das PPases solúveis da família I. As cores indicam as características químicas dos aminoácidos (vermelho: ácidos; verde: polar; azul: básico; lilás: apolar) e os blocos coloridos sombreados indicam posições com conservação entre as sequências alinhadas. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *Clustal Omega v 2.1* e *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5*.

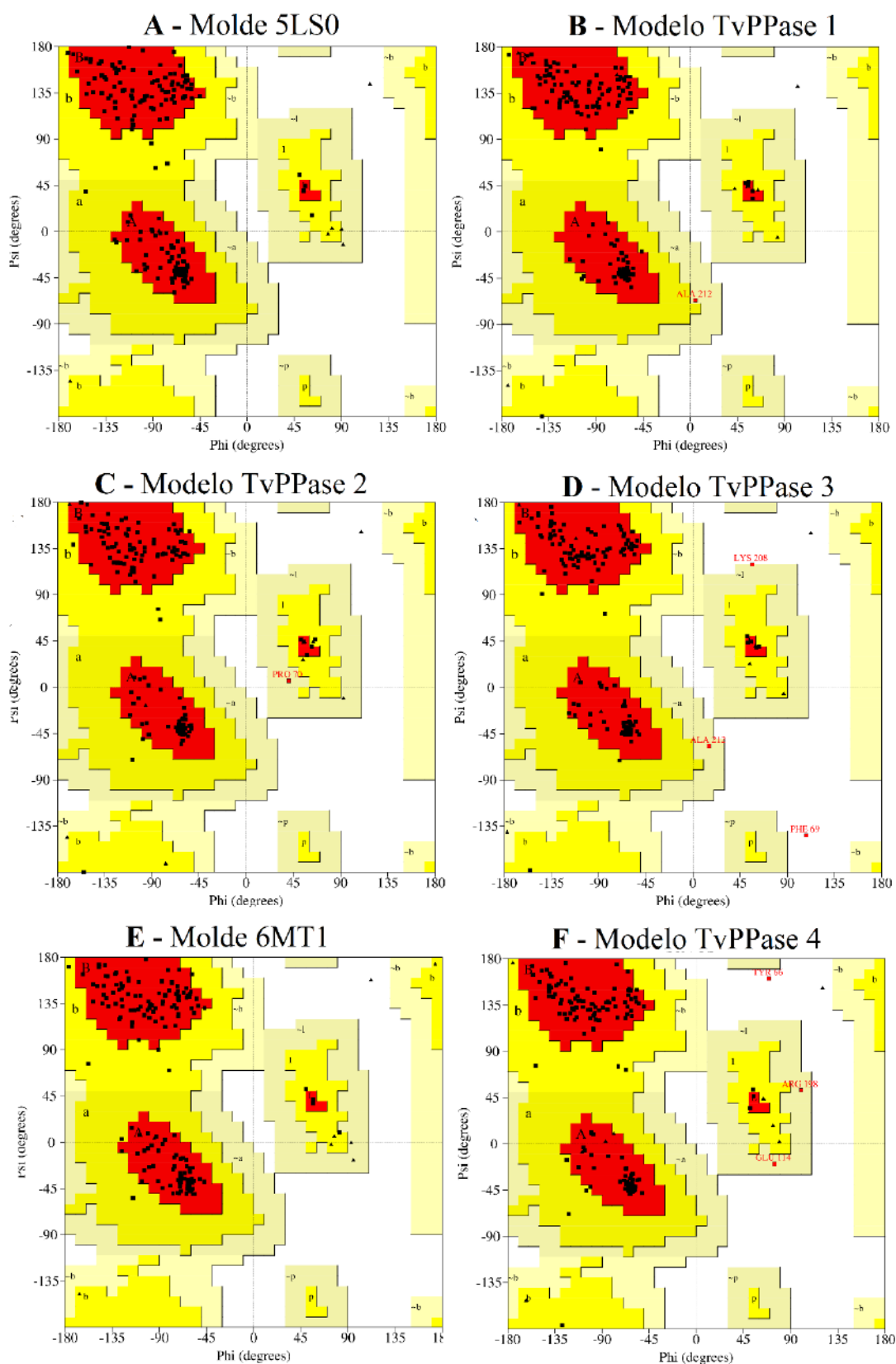


**Figura 8** - Alinhamento entre as sequências proteicas da TvPPase 4 e do molde selecionado (GMT1) para construção do modelo 3D. Mt: *M. truncatula*; Tv: *T. vaginalis*. Os asteriscos (\*) representam os 13 resíduos do sítio ativo que são importantes para atividade das PPases. A região sublinhada representa o motivo DXDXXD das PPases solúveis da família I. Os triângulos invertidos acima das colunas apontam substituições de resíduos da TvPPase 4. As cores indicam as características químicas dos aminoácidos (vermelho: ácidos; verde: polar; azul: básico; lilás: apolar) e os blocos coloridos sombreados indicam posições com conservação entre as sequências alinhadas. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *Clustal Omega v 2.1* e *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5*.

### 5.2.1 Refinamento e validação dos modelos tridimensionais das TvPPases

Os modelos foram submetidos ao processo de minimização de energia no servidor ModRefiner, adicionando-se átomos de carbono e nitrogênio e por fim realizando a minimização de energia de todos os átomos. Afim de poder validar a qualidade dos modelos das TvPPases 1-4, inicialmente foi analisada a qualidade estereoquímica dos moldes e modelos utilizando o gráfico de Ramachandran (*SAVES v. 6.0 -PROCHECK*) (Figura 9). Uma estrutura

proteica precisa possuir mais de 90% dos seus resíduos em regiões favoráveis e nenhum deles em regiões desfavoráveis, ou não permitidas (LASKOWSKI, 1993).



**Figura 9** - Gráficos de Ramachandran para os moldes (5LS0 e 6MT1) e as TvPPases 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no SAVES v. 6.0 -PROCHECK.



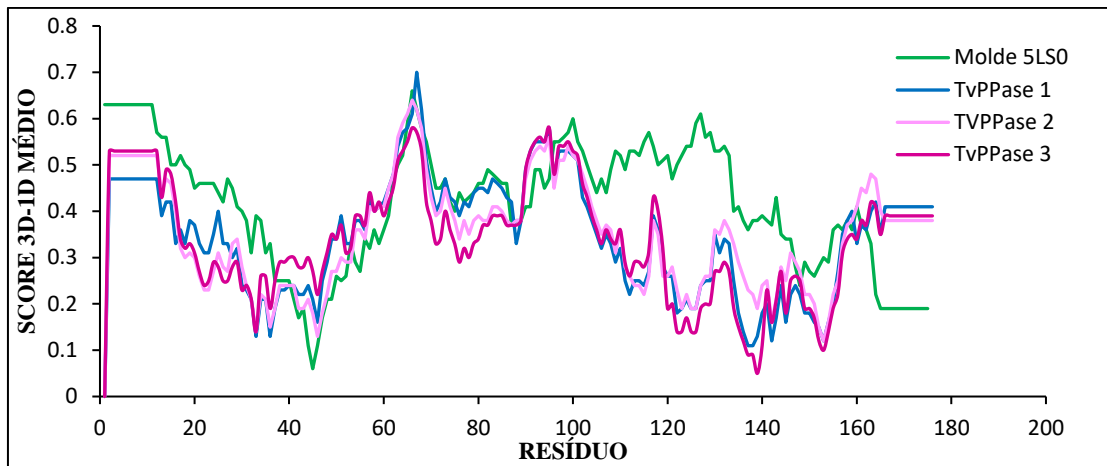
Os modelos refinados das TvPPases apresentaram entre 94,9 e 95,9% de seus resíduos em regiões favoráveis, o que configura valores ligeiramente superiores aos verificados para os seus moldes. No entanto, a TvPPase 3 e a TvPPase 4 apresentaram 0,7% e 0,6% respectivamente de resíduos em regiões não permitidas, sendo os resíduos PHE69 e TYR66. Nesses modelos estes resíduos estão posicionados em região desfavorável/não permitida do gráfico (Tabela 2), além disso, observa-se que a TvPPase 3 possui uma troca neste resíduo comparada com as TvPPases 1 e 2, que possuem uma TYR69, semelhante a TvPPase 4 que mantém esta tirosina em posição correspondente (TYR66). Em condições ideais, o correto seria o modelo não apresentar nenhum resíduo em regiões não permitidas (LASKOWSKI *et al.*, 1993). Porém consideramos o modelo adequado, visto que a posição ocupada por esse resíduo não é prevista para fazer parte do sítio ativo e, portanto, o mesmo não deve participar de interações com o ligante importantes para a atividade da proteína.

**Tabela 2** - Percentual de resíduos nas regiões favoráveis, permitidas e não permitidas do gráfico de Ramachandran.

	<b>Regiões favoráveis</b>	<b>Regiões não permitidas</b>	<b>Regiões adicionais permitidas</b>	<b>Regiões generosamente permitidas</b>
<b>Molde 5LS0</b>	94,1%	0%	5,9%	0%
<b>TvPPase 1</b>	95,9%	0%	3,4%	0,7%
<b>TvPPase 2</b>	95,2%	0%	4,8%	0%
<b>TvPPase 3</b>	95,2%	0,7%	2,7%	1,4%
<b>Molde 6MT1</b>	94,3%	0%	5,7%	0%
<b>TvPPase 4</b>	94,9%	0,6%	3,1%	1,3%

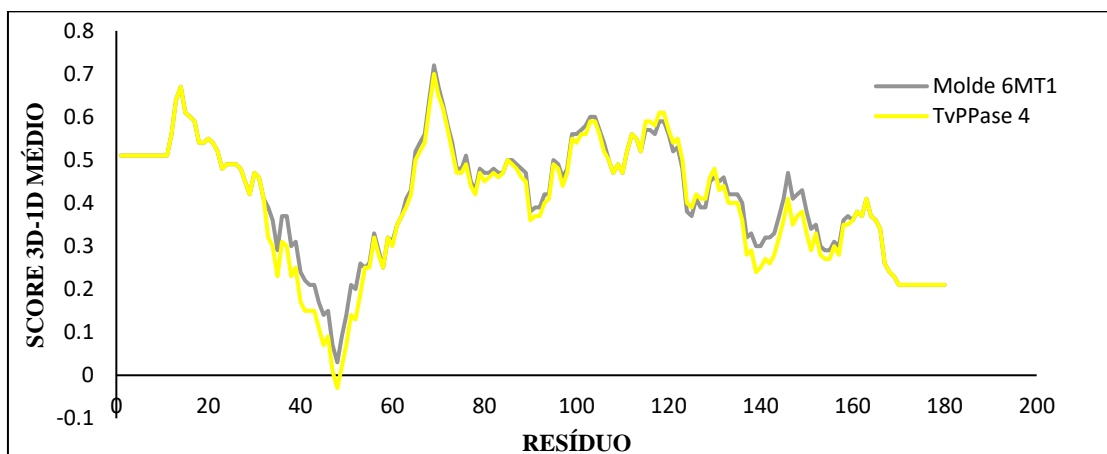
**Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no SAVES v. 6.0 - PROCHECK.

Com relação a compatibilidade entre a estruturas terciária (tridimensional) e primária dos modelos, levou-se em consideração o *score* 3D-1D, calculado no servidor SAVES v. 6.0, pelo programa Verify3D. Este valor de *score* deve ser maior ou igual a 0,2 em pelo menos 80% ou mais dos resíduos dos modelos (BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991). Observou-se que os modelos refinados das TvPPases 1, 2 e 3, apresentaram, respectivamente, 86,86%, 90,86% e 85,71% dos resíduos com *score* 3D-1D igual ou superior a 0,2. Vale ressaltar, que o modelo da TvPPase 2 foi o que apresentou valor de *score* 3D-1D mais semelhante ao que foi observado para o molde 5LS0, com 90,67% (Figura 10).



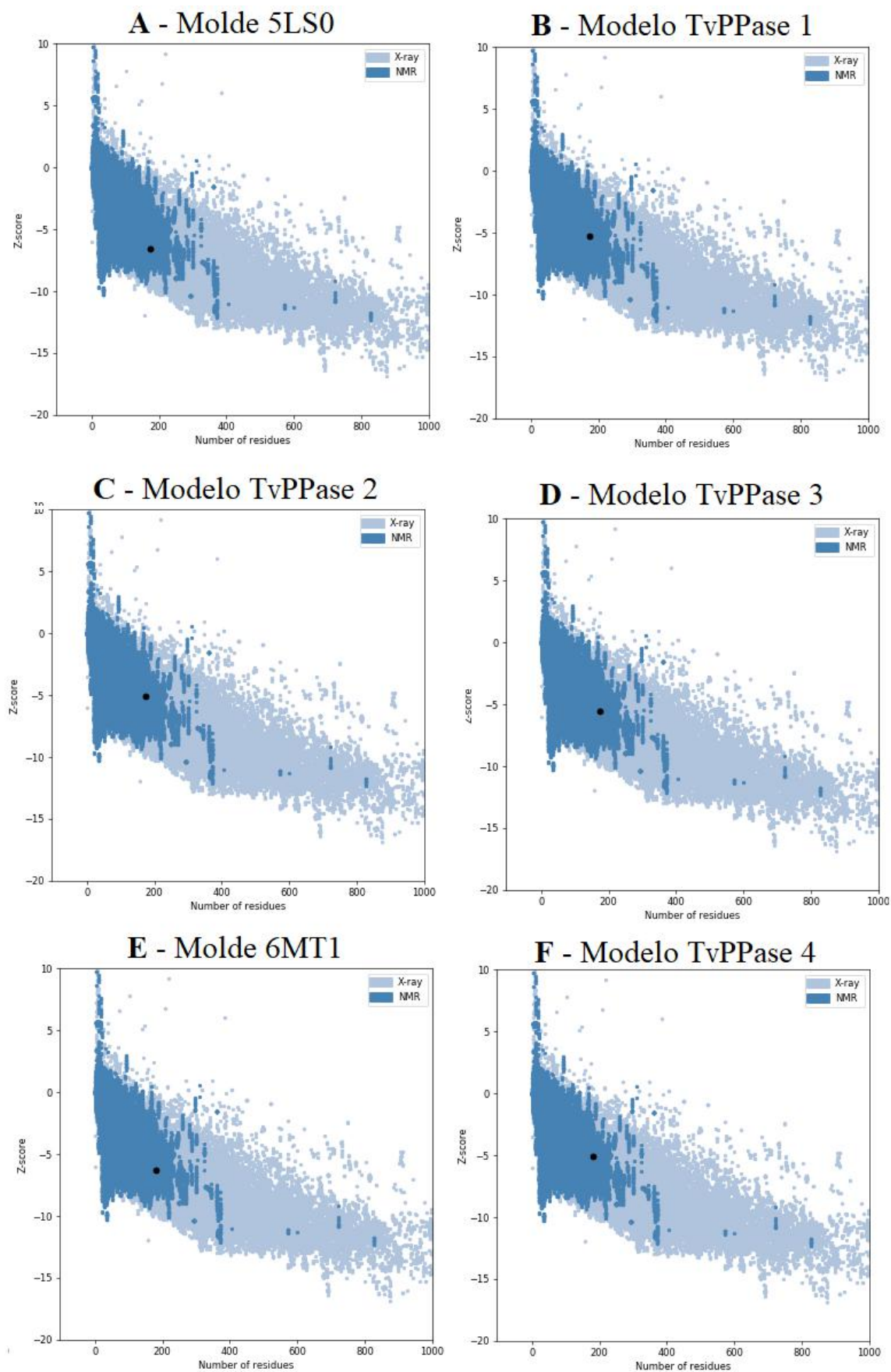
**Figura 10** - Gráfico do perfil de *score* 3D-1D dos resíduos do molde 5LS0 e dos modelos das TvPPases 1, 2 e 3. Em verde: molde 5LS0; Azul: modelo TvPPase 1; Rosa claro: modelo TvPPase 2; Laranja: modelo TvPPase 3. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no SAVES v. 6.0 - *Verify3D*.

O modelo refinado da TvPPase 4 apresentou 92,11% dos resíduos com valor de *score* igual ou superior a 0,2, bem próximo dos valores observados para o seu molde, que apresentou 96,11% (Figura 11).



**Figura 11** - Gráfico do perfil de *score* 3D-1D dos resíduos do molde 6MT1 e do modelo da TvPPase 4. Em roxo: molde 6MT1; Amarelo: modelo TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no SAVES v. 6.0 - *Verify3D*.

O *score-Z*, calculado pelo servidor ProSA-web, mostra a qualidade geral dos modelos comparados com estruturas já determinadas experimentalmente. Assim, os modelos refinados das TvPPase 1 (-5,31), TvPPase 2 (-5,07) e TvPPase 3 (-5,56) obtiveram valores de *score-Z* bem próximos ao do molde 5LS0 (-6,56), estando posicionados em uma região do gráfico compatível com outras proteínas de mesmo tamanho que tiveram suas estruturas 3D elucidadas experimentalmente e depositadas no PDB (Figura 12). Já a TvPPase 4 obteve *score-Z* (-5,10) próximo tanto do molde 6MT1 (-6,26) quanto das demais TvPPases (Figura 12).

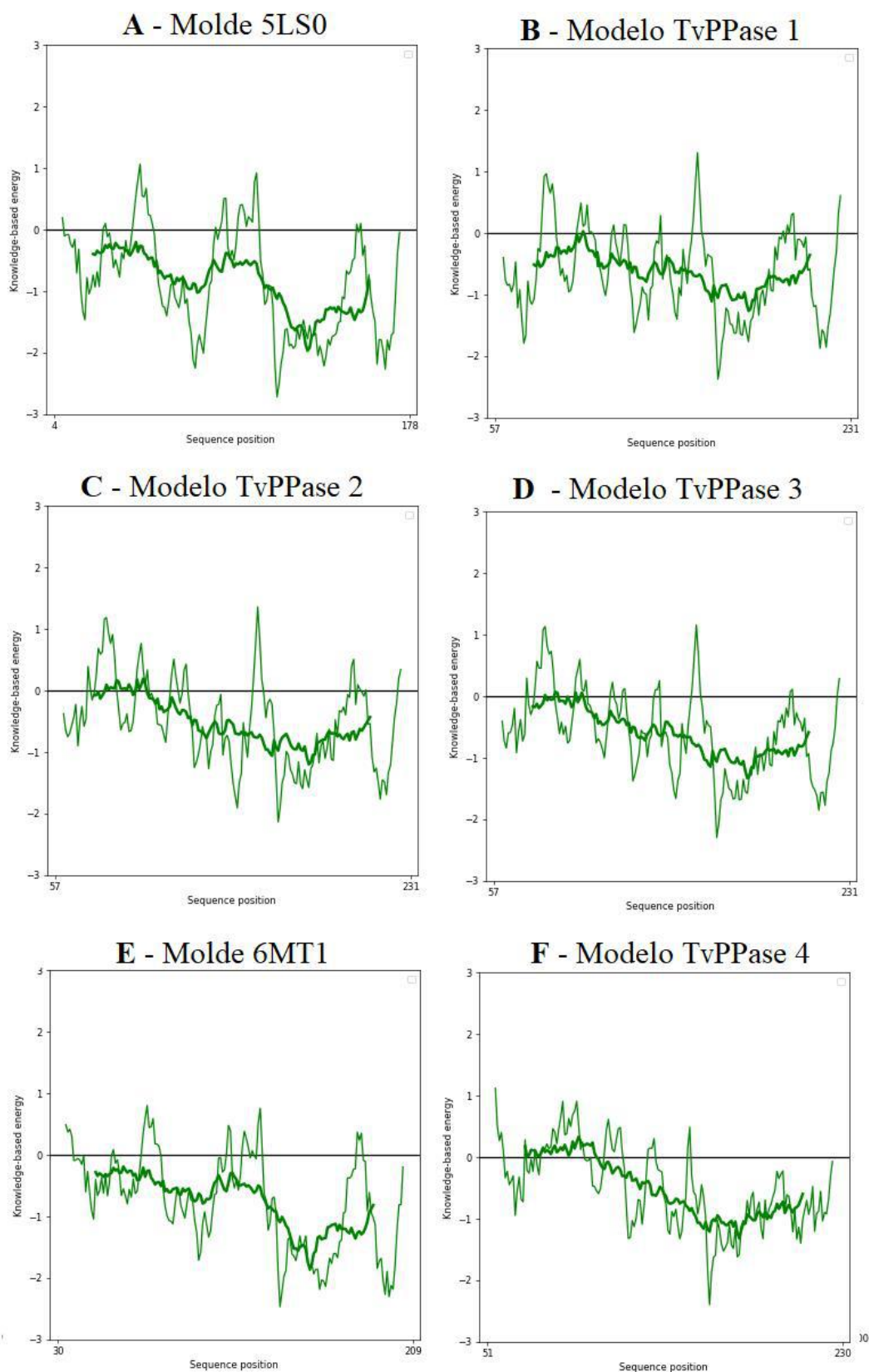


**Figura 12** - Gráfico da qualidade dos modelos baseados no *score-Z* (ProSA-web). A: molde 5LS0; B: modelo TvPPase 1; C: modelo TvPPase 2; D: modelo TvPPase 3; E: molde 6MT1 e F: modelo TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *ProSA-web*.

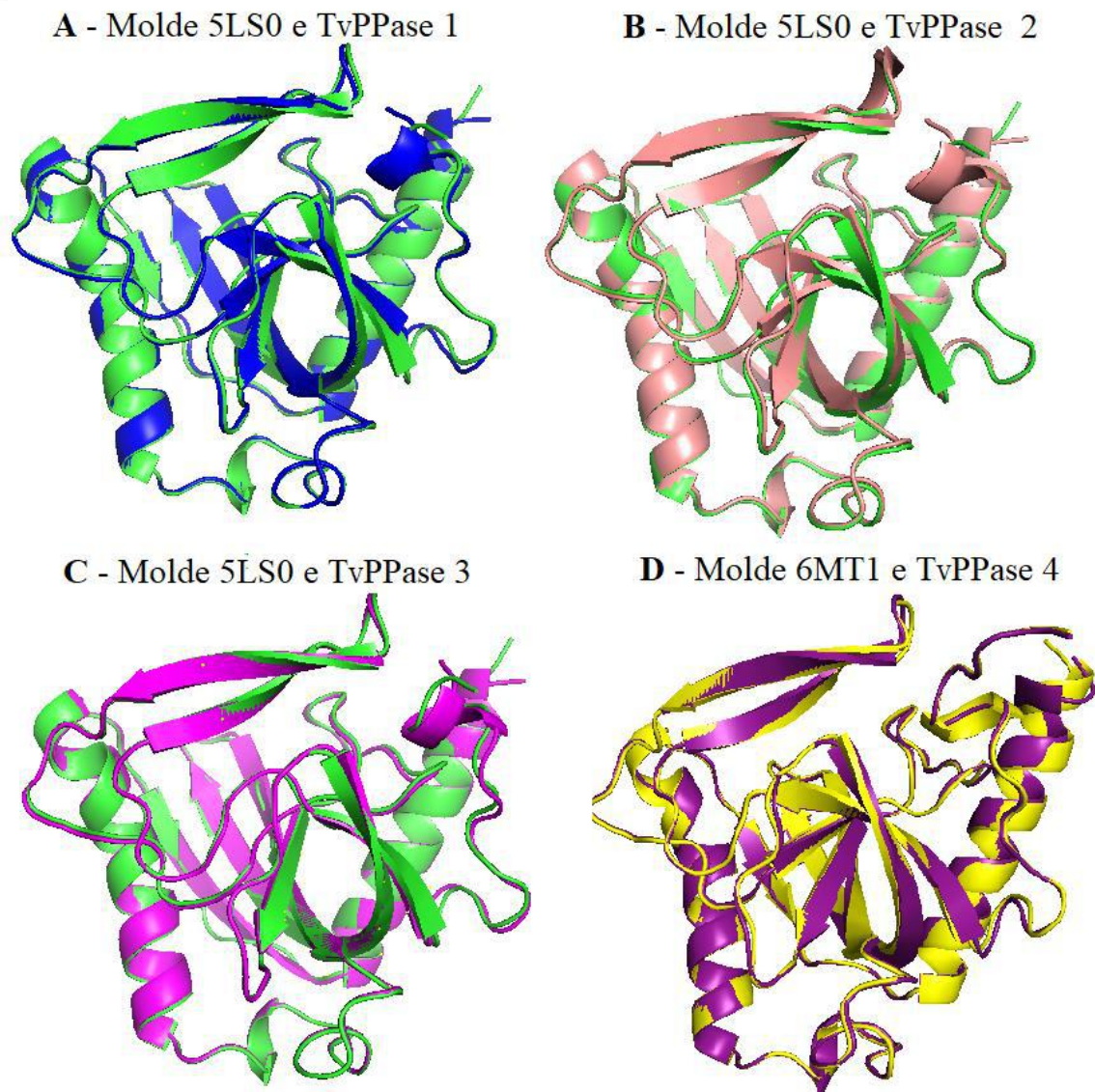
O servidor ProSA-web fornece também um panorama da qualidade energética local de um modelo estrutural, baseada na energia cada um dos resíduos de aminoácidos presentes na sua sequência, em janelas de 10 e 40 resíduos. Analisando-se os valores de energia notou-se que somente os modelos das TvPPases 2 e 4 apresentaram uma pequena região com resíduos de aminoácido com energia suavizada positiva (Figura 13), sendo os resíduos THR87 e ARG100 em ambos os modelos, GLU88, SER93 e VAL98 na TvPPase 2 e VAL70, GLU85, SER102 e TYR105, na TvPPase 4. É possível que essas regiões representem segmentos problemáticos ou que foram modelados de forma errônea. No entanto por serem alterações isoladas, de baixo valor e presentes em poucos resíduos de aminoácidos, estas regiões podem ser desprezadas (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Desta forma, analisando o conjunto de resultados obtidos no processo de validação dos modelos refinados, isto é, resultados obtidos nos gráficos de Ramachandram, Verify3D e ProSA-web, os modelos confeccionados para as quatro pirofosfatases inorgânicas de *T. vaginalis* são de qualidade satisfatória. Estes resultados oferecem confiabilidade aos modelos gerados através da modelagem comparativa, de forma que os mesmos podem ser utilizados para os estudos de *docking* molecular.

O alinhamento entre as estruturas dos genes TvPPases 1 – 4 e dos moldes 5LS0 (AtPPase) e 6MT1 (MtPPase) permitiu a comparação entre as estruturas, tornando mais fácil perceber quais as regiões estruturalmente bem conservadas, além das regiões variáveis nas estruturas dos moldes e dos modelos (Figura 14). É importante ressaltar que apesar das variações observadas entre as sequências peptídicas das TvPPases e dos moldes (Figura 7 e 8), suas estruturas tridimensionais possuem similaridade. Além disso, a sobreposição das estruturas do molde com os modelos tridimensionais forneceu os valores de RMSD de 0,51, 0,57 e 0,59 Å para as TvPPases 1, 2 e 3 respectivamente. Já a sobreposição do molde 6MT1 com o modelo tridimensional da TvPPase 4 (Figura 14) forneceu um valor de RMSD de 0,52 Å. Estes valores, abaixo de 1,0 Å, mostram boa similaridade entre as estruturas comparadas.

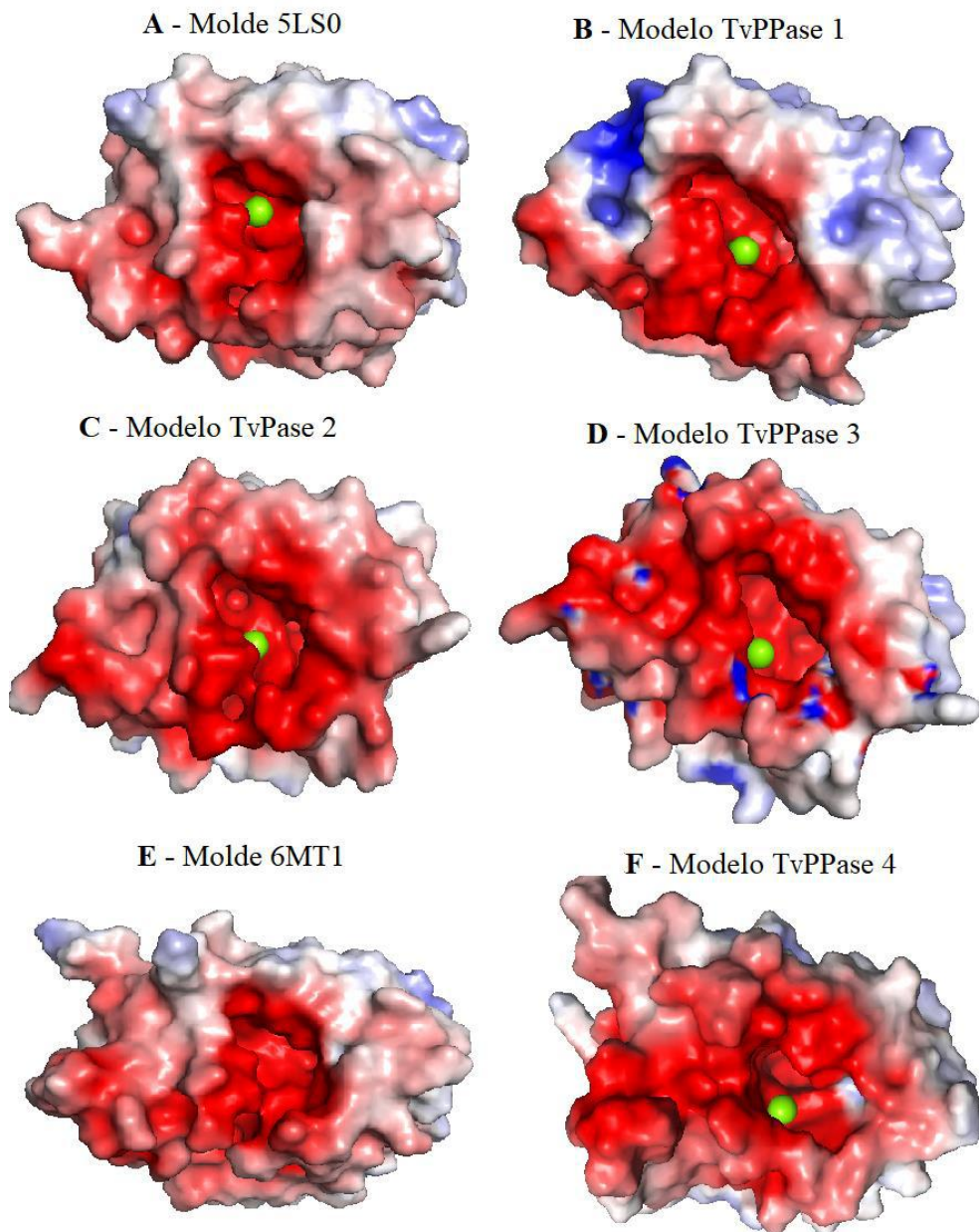


**Figura 13** - Gráfico da qualidade dos modelos baseada na energia dos resíduos de aminoácidos (ProSA-web). A: molde 5LS0; B: modelo TvPPase 1; C: modelo TvPPase 2; D: modelo TvPPase 3; E: molde 6MT1 e F: modelo TvPPase 4. A linha em verde claro corresponde à energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada segmento (janela) de 10 resíduos, enquanto a linha verde-escura corresponde a energia média suavizada atribuída ao átomo central com base em cada segmento (janela) de 40 resíduos. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *ProSA-web*.



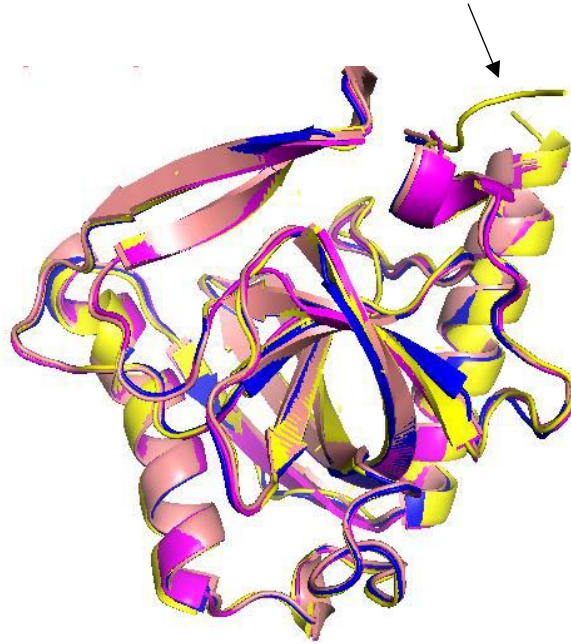
**Figura 14** - Alinhamento entre as estruturas tridimensionais dos moldes (5LS0 e 6MT1) e as TvPPases 1- 4. Estrutura em verde: molde 5LS0; Azul: modelo TvPPase 1. Rosa: modelo TvPPase 2; Magenta: modelo TvPPase 3; Roxo: molde 6mt1; Amarelo: modelo TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *PyMOL*.

Os mapas de potencial eletrostático dos modelos das TvPPase 1-4 mostraram uma distribuição de cargas bastante similar ao que é observado nos moldes (Figura 15). Em todos os modelos se observou uma menor distribuição de cargas positivas (em azul) e uma maior distribuição de carga negativas (em vermelho), principalmente na região do sítio ativo das proteínas, assim como apresentado em seus moldes, porém com menor intensidade. Esses resultados indicam mais uma vez a confiabilidade do modelo.



**Figura 15** - Mapa de potencial eletrostático dos moldes (5LS0 e 6MT1) dos modelos das TvPPases 1-4. Regiões de cargas negativas, regiões neutras e regiões de cargas positivas são representadas em vermelho, branco e azul, respectivamente. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ) e está localizada na região prevista para o sítio ativo. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *PyMOL*.

O alinhamento entre as estruturas tridimensionais dos genes TvPPases 1–4 permitiu a comparação entre as características de cada estrutura, tornando mais fácil a identificação de regiões que permaneceram estruturalmente bem conservadas apesar dos diferentes moldes utilizados. Além disso, possibilitou identificação das regiões variáveis de cada modelo (Figura 16). Todos os quatro modelos mostram possuir boa similaridade estrutural, onde apenas na TvPPase 4, foi observado uma região de alça (*loop*) (Figura 16), similar à que o seu molde 6MT1 possui.



**Figura 16** - Alinhamento entre as estruturas tridimensionais das TvPPases 1- 4. Azul: modelo TvPPase 1. Rosa: modelo TvPPase 2; Magenta: modelo TvPPase 3; Amarelo: modelo TvPPase 4. A seta preta mostra a região de alça (*loop*), presente apenas na estrutura da TvPPase 4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no *PyMOL*.

### 5.3 Validação por *redocking*

Os estudos de *docking* molecular foram realizados com os programas *Autodock v 4.2.6* e *Autodock Tools v 1.5.4* para avaliação das prováveis interações entre as TvPPases e o PPI ou a cadeias de poliP. É comum que ensaios de *docking* molecular sejam precedidos de ensaios de *redocking*, onde os parâmetros para o *docking* são definidos empregando como “controles” a estrutura molde e seu ligante cocrystalizado. Como as estruturas escolhidas como molde não possuíam ligantes cocrystalizados, esta etapa foi realizada através de um ensaio de *redocking* adaptado, promovendo a interação do PPI com a pirofosfatase inorgânica da archaea *Thermococcus thio-reducens* (código PDB: 5UCQ), cuja estrutura apresenta boa sobreposição com a estrutura dos moldes usados para confecção dos modelos das quatro TvPPases (RMSD = 1,01 Å). As TvPPases mostraram bons valores de identidade de similaridade com a PPase de *T. thio-reducens* (Tabela 3).

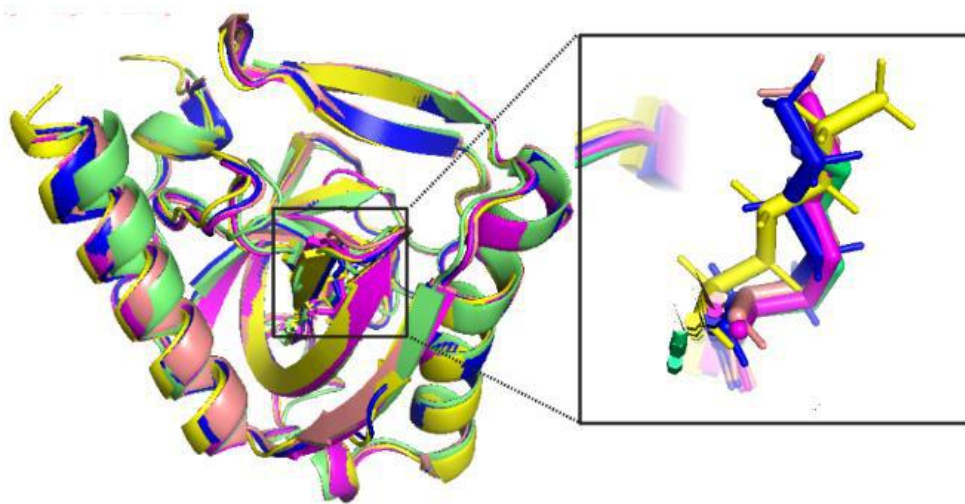
**Tabela 3** - Matriz de identidade e similaridade compartilhadas entre as quatro pirofosfatases de *T. vaginalis* e a PPase de *T. thio-reducens* (Código PDB: 5UCQ).

	TtPPase	TvPPase 1	TvPPase 2	TvPPase 3	TvPPase 4
TtPPase	100/100	32/51	33/50	34/51	30/48

Valores de identidade e similaridade respectivamente apresentados em porcentagem. Código dos *loci* no TrichDB: TVAG\_12660; TVAG\_472200; TVAG\_019690 e TVAG\_231330, para TvPPases 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Elaboração própria. Dados obtidos no *BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.5*.



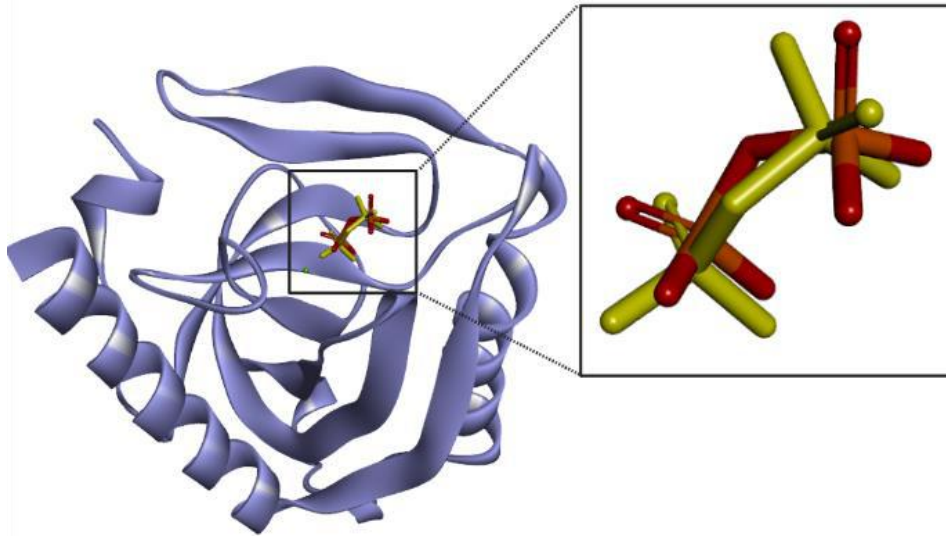
As caixas utilizadas foram centralizadas nas coordenadas do átomo de nitrogênio da cadeia lateral do resíduo de lisina conservado presente na região do sítio ativo, segundo descrito por Cruz e colaboradores (2018). Para o *redocking* foi usado o átomo de nitrogênio do resíduo LYS105 da enzima de *T. thioreducens*. Já para o *docking* com as TvPPases foram usados os átomos de nitrogênio dos resíduos LYS161 para as TvPPases 1-3, enquanto para a TvPPases 4 foi usado o mesmo átomo do resíduo LYS158 (Figura 17).



**Figura 17** – Localização do átomo de nitrogênio do resíduo de lisina usado para centralizar a caixa do *docking* das TvPPases. Em verde claro: *T. thioreducens* (código PDB: 5UCQ), Azul: TvPPase 1; Rosa: TvPPase 2; Magenta: TvPPase 3; Amarelo TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*.

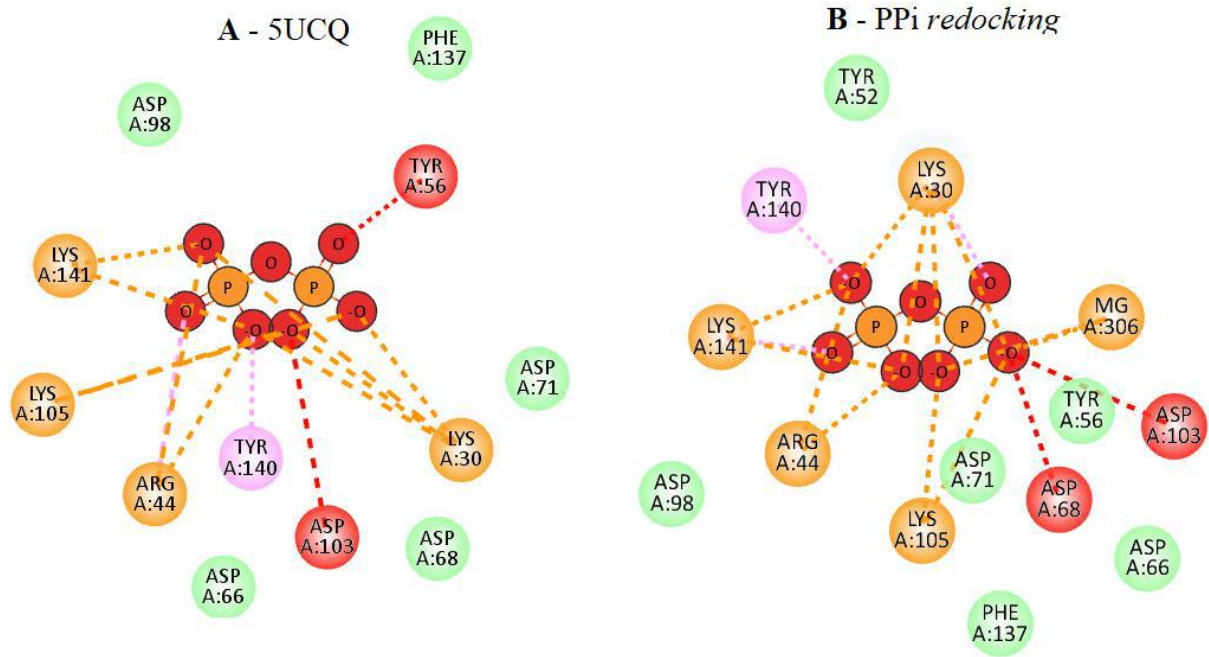
A escolha da melhor pose foi feita com base no padrão de interações mais favorável entre o ligante a proteína, isto é, na formação do complexo proteína-ligante que é caracterizada pela conformação de menor energia de ligação (MORGON; COUTINHO, 2007), dentre as 50 melhores poses solicitadas. A energia de ligação entre o ligante e a proteína é importante uma vez que possui relação com a atividade biológica da proteína, isso significa dizer que, quanto menor for esta energia de interação, mais fácil e mais estável é a formação do complexo proteína-ligante (BARROS, 2015).

Através do procedimento de *redocking* do PPI na pirofosfatase inorgânica de *T. thioreducens* (código PDB: 5UCQ), a melhor pose obtida mostrou que o PPI se ligou na mesma região de ligação na proteína cristalizada, mostrando uma boa sobreposição com valor de RMSD inferior a  $2,0 \text{ \AA}$  ( $0,9633 \text{ \AA}$ ), mostrando que não existe diferenças tão significativas entre a pose obtida e a pose de ligação do PPI na proteína cristalizada (Figura 18).



**Figura 18** – *Redocking* molecular do PPI na pirofosfatase inorgânica da archaea *T. thioreducens* (código PDB: 5UCQ). Em colorido, pirofosfato em sua pose original na 5UCQ; em amarelo pirofosfato na pose obtida com o *redocking*. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer*(BIOVIA).

Em seguida comparou-se tipos de interação e quais resíduos estão envolvidos na interação com o PPI da estrutura cristalizada e do procedimento de *redocking* (Figura 19). Notou-se que os mesmos resíduos então envolvidos em interações favoráveis por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas de atração, interação iônica e de Van der Waals. Com pequenas exceções como a que ocorreu no resíduo ASP68, que no *redocking* faz interação desfavorável com o PPI, enquanto que isso não ocorre na proteína cristalizada. Além disso, no cristal o resíduo TYR56 faz uma interação desfavorável com o PPI, enquanto no *redocking* este resíduo faz interação de Van der Waals (Figura 19 e Quadro 3). Em ambos os casos o resíduo ASP103 faz interação desfavorável do tipo acceptor-acceptor com PPI, mas apesar disso essa interação desfavorável não afeta significativamente a estabilidade do complexo proteína-ligante mostra um valor de energia de ligação (-9.11 kcal/mol) (Quadro 3). Estes resultados mostram que o procedimento de *redocking* manteve o PPI ligado na região observada no cristal e que por isso manteve-se o mesmo perfil de interação com os mesmos resíduos envolvidos.



**Figura 19** – Diagrama 2D de interações. Resíduos da 5UCQ que interagem com o pirofosfato. A: Pirofosfatase inorgânica de *T. thio reducens* com PPi cocristalizado (código PDB: 5UCQ); B: *Redocking*. Em Lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

**Quadro 3** – Interações obtidas no *redocking* do PPi na 5UCQ.

Resíduos e tipos de interações				
Substrato	Ligação de H	Van der Waals	Eletrostática	Desfavorável (Distância Å)
PPi	TYR140	ASP66; ASP71; ASP98; TYR52; TYR56; PHE137	LYS30; LYS105; LYS142; ARG44;	ASP68; ASP103

**Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer(BIOVIA)*.

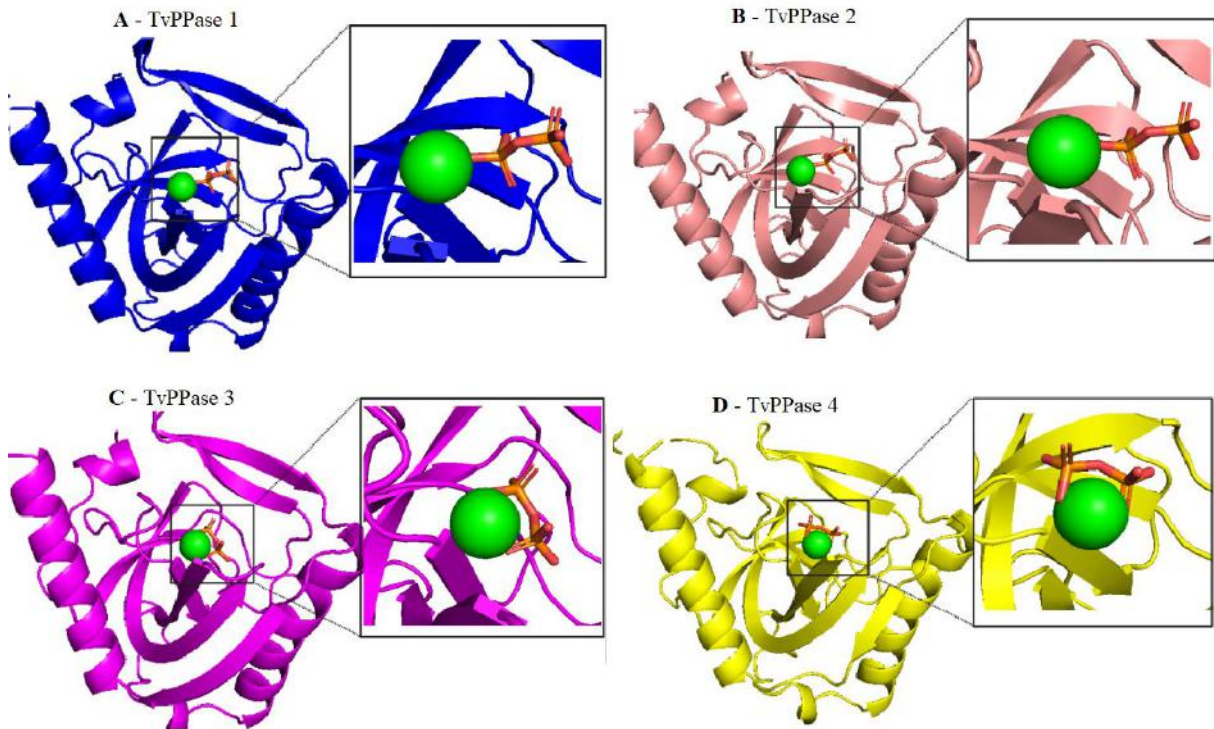
#### 5.4 Avaliação por *docking* molecular das interações do pirofosfato com as TvPPases

Após resultados satisfatórios obtidos com o *redocking* de PPi, realizou-se ensaio de *docking molecular* do PPi nos modelos refinados das TvPPases 1-4. Inicialmente as melhores poses obtidas foram analisadas levando em consideração o valor de energia de ligação para formação do complexo proteína-substrato (Tabela 4 e Figura 20) e em seguida foram analisados os tipos de interações que ocorrem entre os resíduos das TvPPases e o PPi.

**Tabela 4** – Valores de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o pirofosfato.

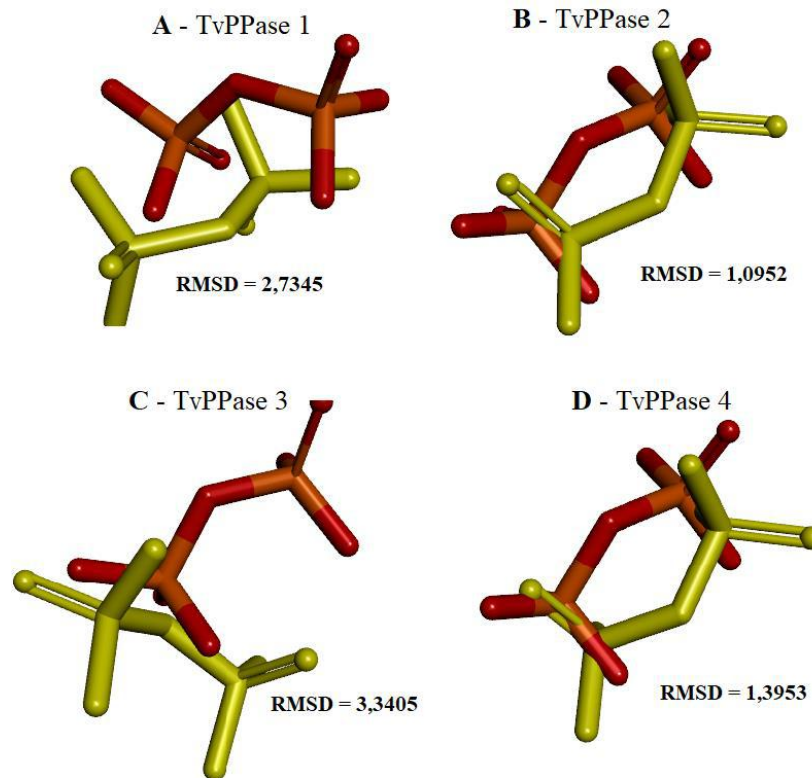
Ligante	Proteínas			
	TvPPase 1	TvPPase 2	TvPPase 3	TvPPase 4
Pirofosfato (PPi)				
Energia livre de ligação (kcal/mol)	-9,59	-9,63	-11,21	-10,26

Valores referentes às poses de menor energia. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock* 4.2.6.



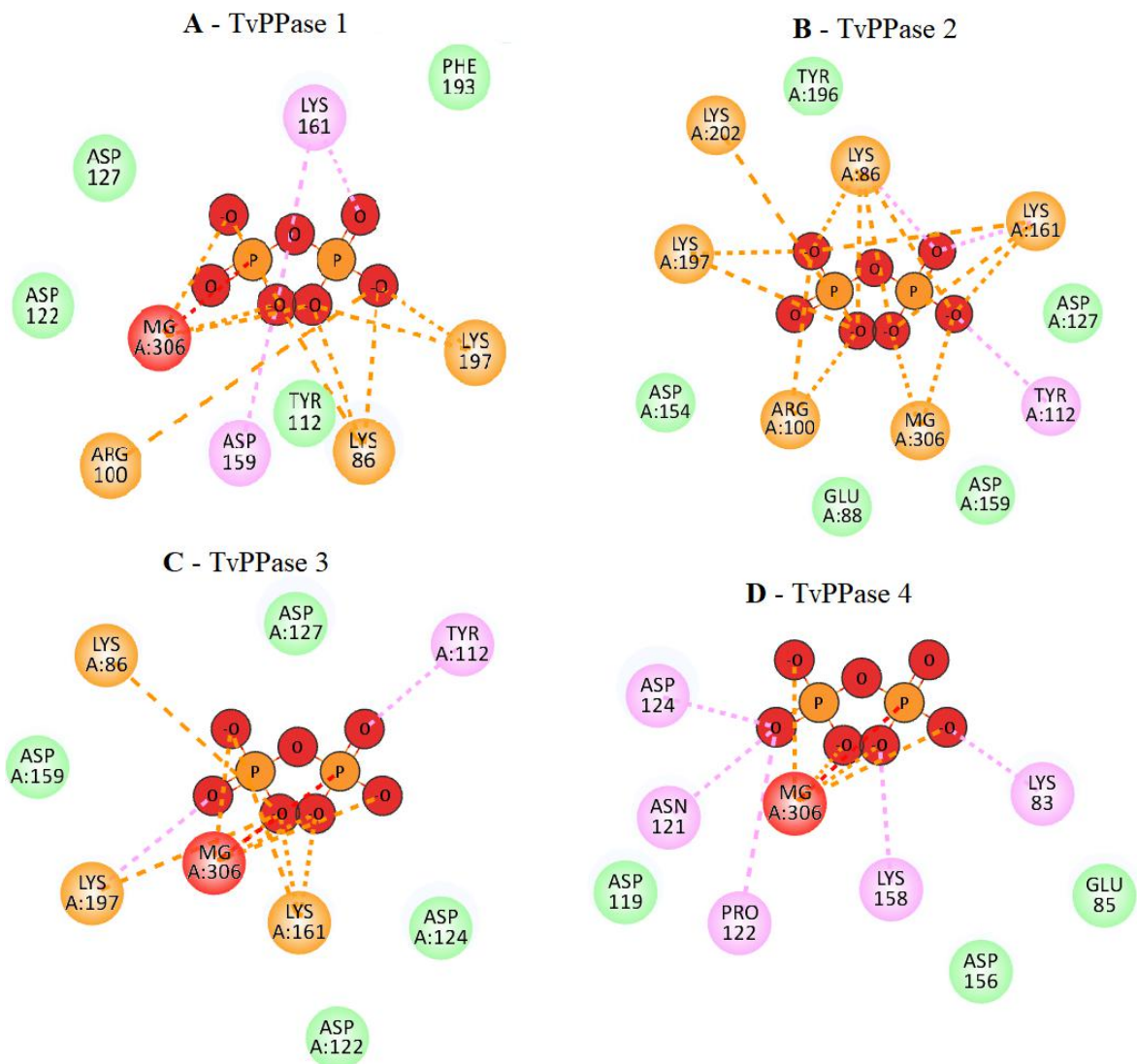
**Figura 20** - Melhor pose obtida por *docking* do pirofosfato (PPi) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3; D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no programa *PyMOL*.

A sobreposição dos PPi ligados nas TvPPases com o PPi da PPase da estrutura 5UCQ, apresentou valores de RMSD inferiores a 2 Å para a TvPPases 2 (1,0952) e 4 (1,3953). Já as TvPPases 1 (2,7345 Å) e 3 (3,3405 Å) mostraram valores de RMSD superiores a 2,0 Å (Figura 21), isso significa que há diferença entre a pose de ligação do PPi na proteína cristalizada e nos modelos da TvPPases 1 e 4. Neste estudo foram considerados valores RMSD próximos de 2,0 Å como satisfatórios. O PPi ligado à TvPPase 3 teve o valor de RMSD mais alto entre as quatro proteínas (3,3405 Å), e além disso o ligante apresentou orientação completamente distinta do observado nas demais estruturas. Desta forma, o processo de *redocking* adaptado para o PPi foi considerado satisfatório e validado somente em três das quatro proteínas (TvPPase 1, 2 e 4).



**Figura 21** - Sobreposição do PPI ligado por *docking* molecular às TvPPases 1-4 com o PPI ligado por *redocking* na PPase de *T. thioreducens*. Em colorido, pirofosfato na pose da estrutura 5UCQ; em amarelo pirofosfato na pose obtida no *docking*. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtidos no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

Em seguida foram analisados quais os resíduos de aminoácidos estavam envolvidos na interação proteína-substrato e quais os tipos de interações ocorreram (Figura 22 e Quadro 4). Os resíduos de aminoácidos em comum nas TvPPases 1, 2 e 3 envolvidos nas interações com o substrato foram LYS86, LYS161, LYS197, ASP127, ASP159 e TYR112. Além disso, houve interação com o resíduo ARG100, presente somente nas TvPPases 1 e 2, e com o resíduo ASP122, presente somente nas TvPPases 1 e 3 (Figura 22). A TvPPase 4 apresentou interações em resíduos de posições correspondentes às demais: LYS83, LYS58, ASP124, ASP119, ASP156. Isso é importante, visto que mostra semelhanças entre os resíduos que provavelmente compõem o sítio ativo dessas proteínas.



**Figura 22** - Diagrama 2D de interações dos resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o pirofosfato no *docking* molecular. Em A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em Lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer* (BIOVIA).

O complexo proteína-ligante é formado de acordo com a especificidade e afinidade de ligação entre o ligante e a proteína devido às interações moleculares que ocorrem. Estas interações são a parte entálpica da energia de ligação e dentre essas interações estão as ligações de hidrogênio, ligações covalentes, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals (GURYANOV *et al.*, 2016). As ligações de hidrogênio são interações bastante importantes, uma vez que são as principais responsáveis por sustentar a estrutura tridimensional das proteínas (BARREIRO *et al.*, 2015). Em todos os casos foram observadas interações favoráveis por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas de atração, interações iônicas e de Van der Waals. Com exceção das TvPPase 1, 3 e 4, que apresentaram interações desfavoráveis do tipo *bump* (colisão) entre o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ) e um fósforo do PPI (Figura 22), isso pode estar

ocorrendo devido à proximidade dos dois átomos, onde a distância é  $< 2,872 \text{ \AA}$  (Quadro 4), observada na TvPPase 2 que é a única que não mostrou este tipo de interação desfavorável. Essas interações desfavoráveis podem levar a uma repulsão entre o ligante e as proteínas, consequentemente levando a uma pequena instabilidade no complexo proteína-ligante. Ainda assim, a energia de ligação (Tabela 4) é menor para as TvPPases 1, 3 e 4, se comparadas com a TvPPase 2, isso pode ter relação com a mudança no seu perfil de interação entre essas proteínas.

**Quadro 4** – Interações observadas no *docking* molecular do PPI nas TvPPases 1-4.

Resíduos e tipos de interações				
Proteína	Ligação de H	Van der Waals	Eletrostática	Desfavorável (distância $\text{\AA}$ )
<b>TvPPase 1</b>	*LYS161; *ASP159;	*ASP122; *ASP127; *ASP159; *TYR112; PHE193	*LYS86; *LYS161; *LYS197; ARG100; Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> (2,101)
<b>TvPPase 2</b>	*LYS86; *LYS161; *TYR112	*ASP127; *ASP154, *ASP159; *TYR196; *GLU88	*LYS86; *LYS161; *LYS197; LYS202; ARG100; Mg <sup>2+</sup>	-
<b>TvPPase 3</b>	*LYS197; *TYR112	*ASP122; *ASP124; *ASP127; *ASP159	*LYS86; *LYS161; *LYS197	Mg <sup>2+</sup> (2,349)
<b>TvPPase 4</b>	*LYS83; *LYS158; *ASP124; ASN121; PRO122	*ASP119; *ASP126; GLU58	Mg <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> (2,313)

Os asteriscos (\*) indicam resíduos de aminoácidos do sítio ativo importantes para a função enzimática. Destacados em negrito estão os resíduos que pertencem ao motivo DXDXXD. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

### 5.5 *Docking* molecular e avaliação das interações de um polifosfato de cadeia curta (poliP3) com as TvPPases 1-4

Os estudos de *docking* molecular foram realizados com os programas *Autodock v 4.2.6* e *Autodock Tools v 1.5.4* para avaliação das interações entre as TvPPases e o polifosfato inorgânico de cadeia curta (poliP3), utilizando uma caixa com dimensões  $40 \times 40 \times 40$  pontos. Nesta etapa de *docking* as caixas utilizadas foram centralizadas em posições correspondentes as coordenadas do átomo de nitrogênio do resíduo LYS161 para as TvPPases 1-3 e LYS158 para TvPPase 4.

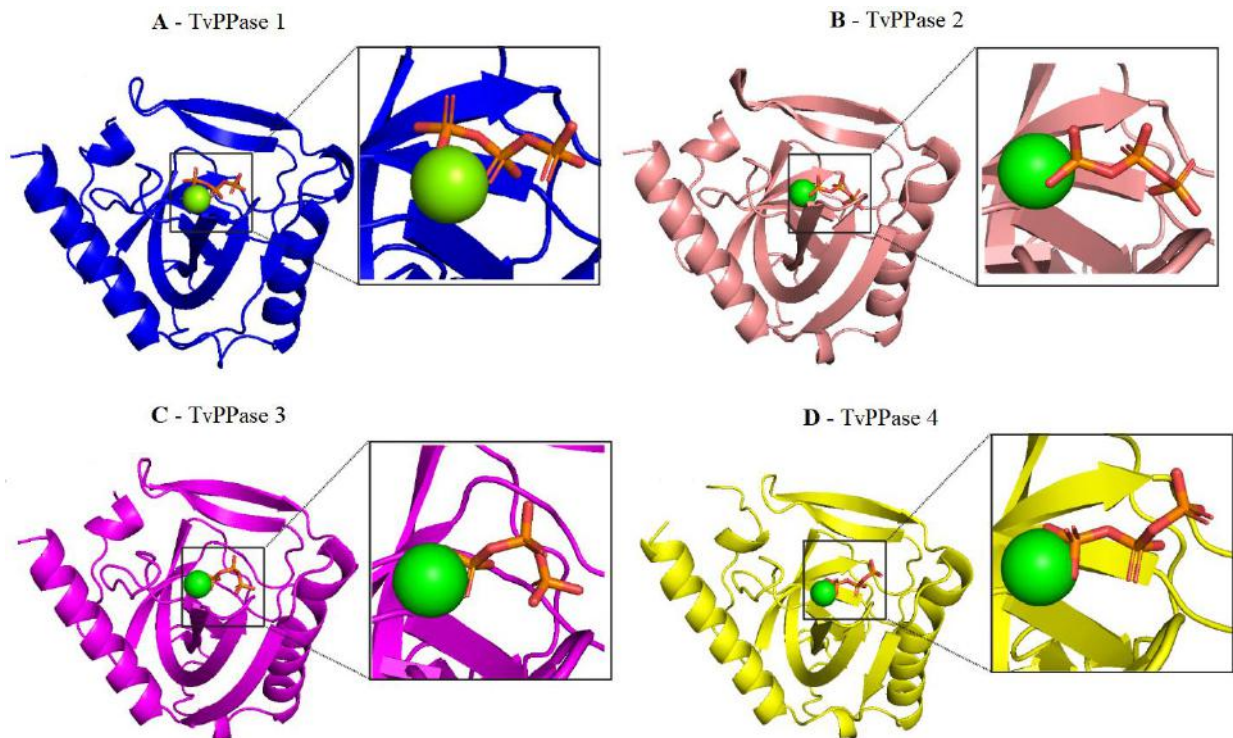
Mais uma vez, a escolha da melhor pose foi feita com base na conformação do complexo proteína-ligante com menor energia de ligação (MORGON; COUTINHO, 2007). Sendo assim as melhores poses selecionadas foram as que possuíam menor energia de ligação (Tabela 5). A TvPPase 3 apresentou a menor energia de ligação ( $-13,86 \text{ kcal/mol}^{-1}$ ), quando comparado com

as demais TvPPases (1, 2 e 4) com valores estimados de energia de ligação -10,0, -11,15 e -13,65 kcal/mol, respectivamente, significando que houve uma redução na afinidade ao poliP3 nestas três proteínas. Vale ressaltar que as variações nos valores teóricos de energia de ligação ocorrem devido principalmente à quantidade e aos tipos de interações intermoleculares que ocorrem entre a proteína e o ligante/substrato (HUEY *et al.*, 2007). Por isso, em seguida foram analisados quais os tipos de interações ocorrem e quais os resíduos estão envolvidos.

**Tabela 5** - Valores previstos de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o polifosfato de cadeia curta (poliP3).

Ligante	Proteínas			
	TvPPase 1	TvPPase 2	TvPPase 3	TvPPase 4
PoliP3				
Energia livre de ligação (kcal/mol)	-10,0	-11,15	-13,86	-13,65

**Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*

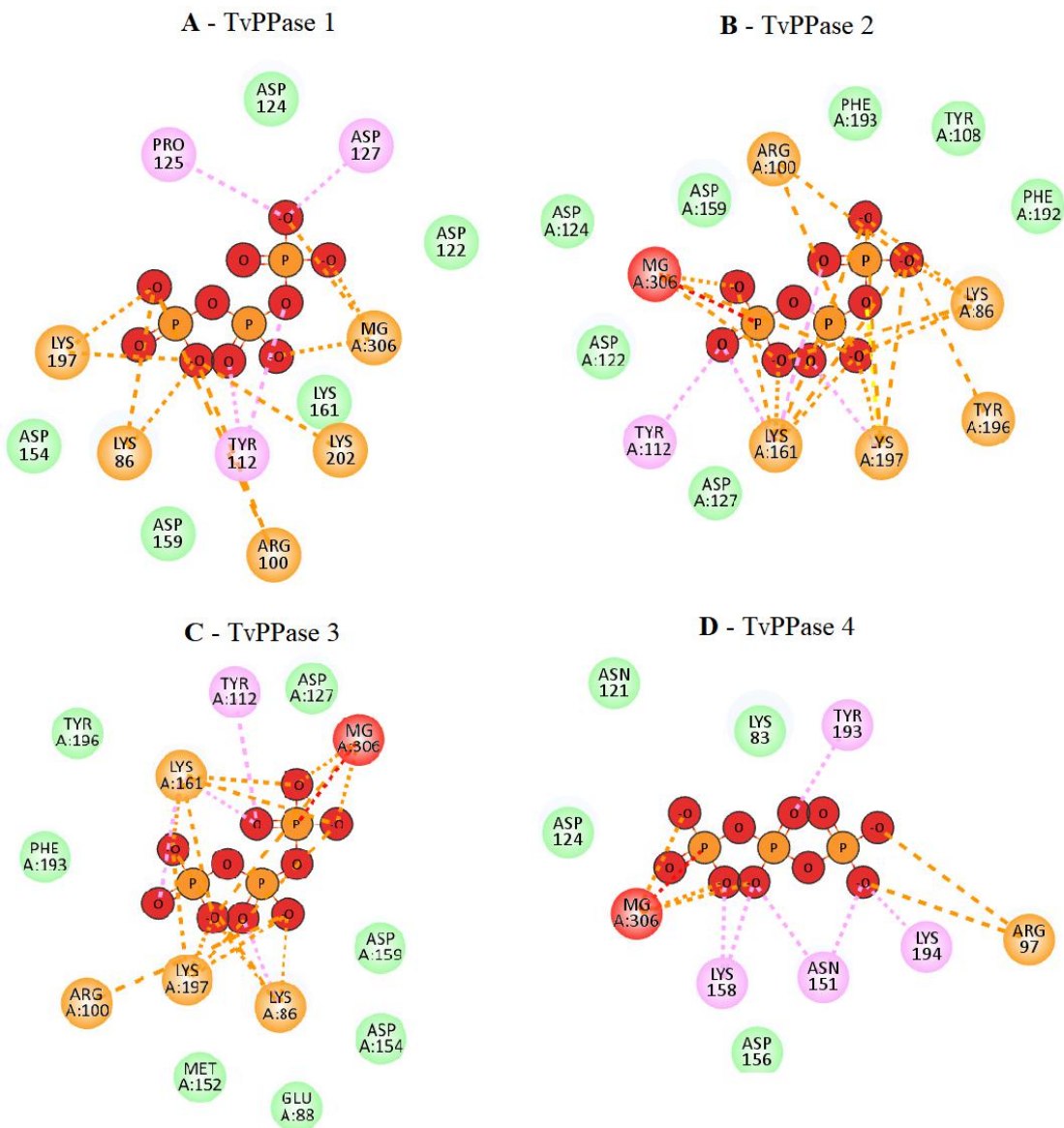


**Figura 23** - Melhor pose obtida por *docking* dos polifosfato de cadeia curta (PoliP3) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*.

Em seguida foram analisados quais os resíduos estavam envolvidos na interação proteína-substrato e quais os tipos de interações ocorreram (Figura e 24 e Quadro 5). Observou-se que, para todos os modelos, o poliP3 é capaz de interagir com o  $Mg^{2+}$ , sendo observadas interações favoráveis do tipo metal-aceptor com oxigênios do poliP3 e desfavoráveis do tipo *bump* com um átomo de fósforo da extremidade do poliP3. Esta interação desfavorável leva a uma repulsão entre o ligante e a proteína e, conseqüentemente, a uma provável instabilidade no



complexo proteína-ligante. Além disso, as TvPPases 1, 2 e 3 apresentaram resíduos em comum envolvidos nas interações com o substrato, sendo LYS86, LYS161, LYS197, ASP127, ASP159, TYR112 e ARG100 (assim como os resíduos correspondentes LYS83, LYS158, LYS194, ASP156 e ARG97 na TvPPase4). Além disso, alguns resíduos não estavam presentes em interações em todas as TvPPases, como PHE193, presente somente nas TvPPases 2 e 3, e ASP124 presente nas TvPPases 1, 2 e 4 (Quadro 5 e Figura 24). A presença de resíduos com carga positiva próximos ao sítio de ligação do poliP3 faz com que ocorram interações iônicas com os fosfatos carregados negativamente (CRUZ *et al.*, 2015), como LYS86, LYS161, LYS197 e ARG100 (e com os resíduos correspondentes LYS83, LYS158, LYS194 e ARG97 na TvPPase4).



**Figura 24** - Diagrama 2D de interações dos resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia curta (PoliP3) no *docking* molecular. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de

Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

Em todos os casos foram observadas interações favoráveis por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas de atração, interação iônica e de Van der Waals. Somente as TvPPase 2, 3 e 4 apresentaram interações desfavoráveis do tipo *bump* (colisão) entre o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ) e o fósforo do PoliP3 (Figura 24), isso pode estar ocorrendo devido à proximidade dos dois átomos, onde a distância é  $< 2,588 \text{ \AA}$  (Quadro 5), observada na TvPPase 1 que é a única que não mostrou este tipo de interação desfavorável. Essas interações desfavoráveis podem levar a uma repulsão entre o ligante e a proteínas, conseqüentemente levando a uma pequena instabilidade no complexo proteína-ligante. É importante ressaltar que alguns aminoácidos estavam participando de mais de um tipo de interação molecular.

**Quadro 5** – Interações observadas no *docking* molecular do poliP3 nas TvPPases 1-4.

Resíduos e tipos de interações				
Proteína	Ligação de H	Van der Waals	Eletrostática	Desfavorável (distância Å)
<b>TvPPase 1</b>	*ASP127; *TYR112; PRO125	*ASP122; *ASP124; *ASP154; *ASP159*LYS161	*LYS86; *LYS197; LYS202 ARG100; $Mg^{2+}$	-
<b>TvPPase 2</b>	*LYS161; *LYS197; *TYR112	*ASP122; *ASP124; *ASP127; *ASP159; TYR108; PHE192; PHE193	*LYS86; *LYS161; *TYR196; ARG100; $Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$ (2,115)
<b>TvPPase 3</b>	*LYS86; *TYR112	*ASP127; *ASP154; *ASP159; GLU88; MET152; PHE193	*LYS86; *LYS161; *LYS197; ARG100; $Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$ (2,064)
<b>TvPPase 4</b>	*LYS158; LYS194; *ASP151;	*ASP124; *ASP156; *LYS83; ASN121	ARG97; $Mg^{2+}$	$Mg^{2+}$ (2,144)

Os asteriscos (\*) indicam resíduos de aminoácidos do sítio ativo importantes para a função enzimática. Destacados em negrito estão os resíduos que pertencem ao motivo DXDXXD. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

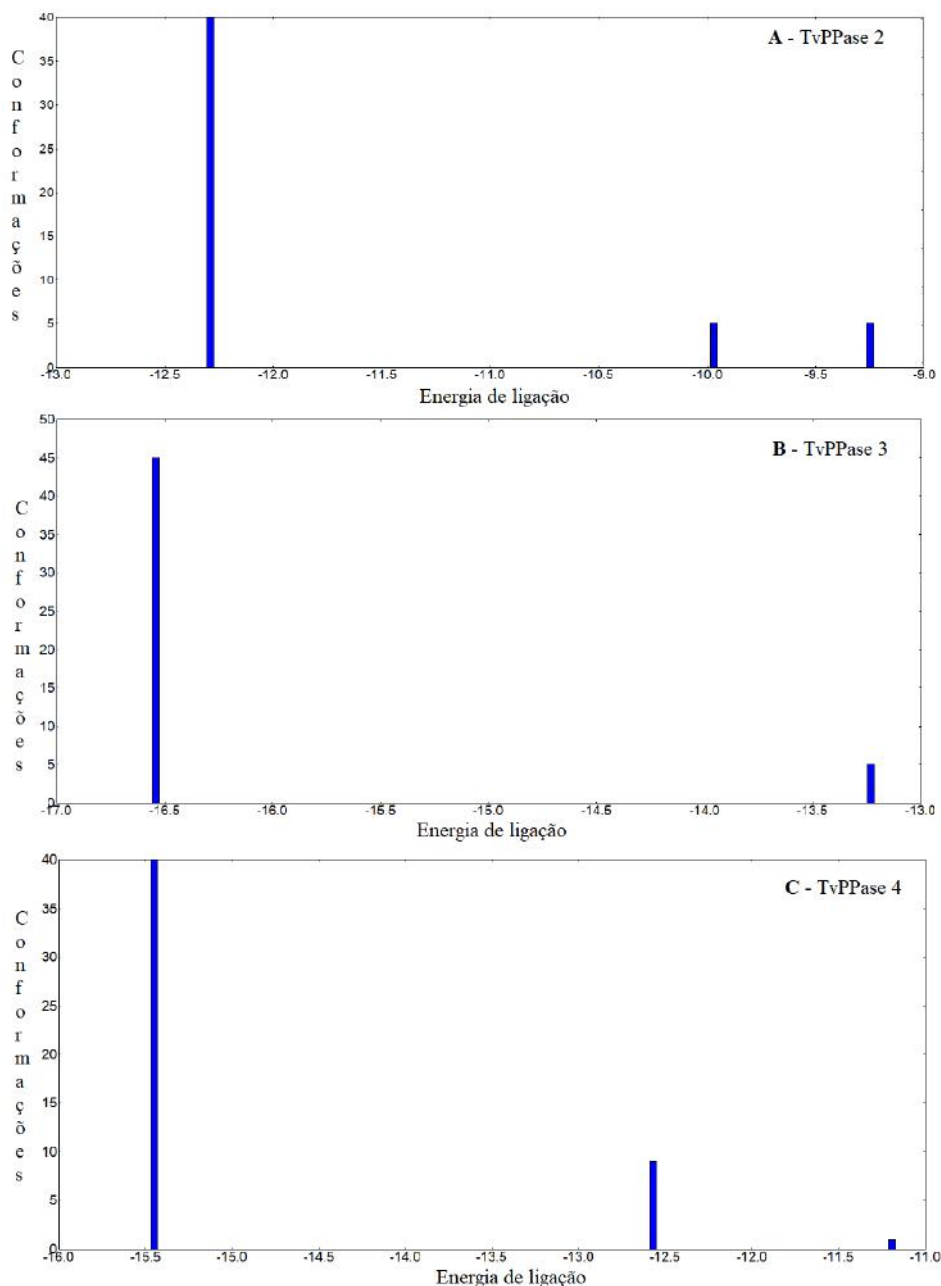
Apesar da TvPPase 1 não ter apresentado nenhuma interação desfavorável, a TvPPase 3 foi a proteína que teve a menor energia de ligação (-13,86 kcal/mol) do complexo proteína-ligante (Tabela 4). Isso pode estar relacionado com o perfil de interações dos resíduos da proteína. Sendo assim as TvPPase 1 e 3 são as melhores candidatas para uma possível interação com poliP3.

## 5.6 *Docking* molecular e avaliação das interações de um polifosfato de cadeia média (poliP5) com as TvPPases 1-4

Os estudos de *docking* molecular foram também realizados para avaliação das potenciais interações entre as TvPPases 1-4 e o polifosfato inorgânico de cadeia média (poliP5), utilizando uma caixa com dimensões  $40 \times 40 \times 40$  pontos, centralizada no átomo de nitrogênio do resíduo

de LYS161 para as TvPPases 1-3 e LYS158 para a TvPPase 4 (Figura 25), de maneira idêntica à realizada para o *docking* do poliP3.

As TvPPases 2, 3 e 4 mostraram possuir mais de um grupo de conformações (*clustering conformation*) com energia de ligação diferentes neste procedimento de *docking* (Figura 24). Dentre cada grupo de conformações, as poses escolhidas para análise foram aquelas que apresentaram menor energia de ligação na formação do complexo proteína-ligante. Como a TvPPase 1 foi a única que apresentou somente um grupo de conformações, a escolha da melhor pose foi feita com base na pose que possuía menor energia livre de ligação (-8,27 kcal/mol) (Tabela 6).



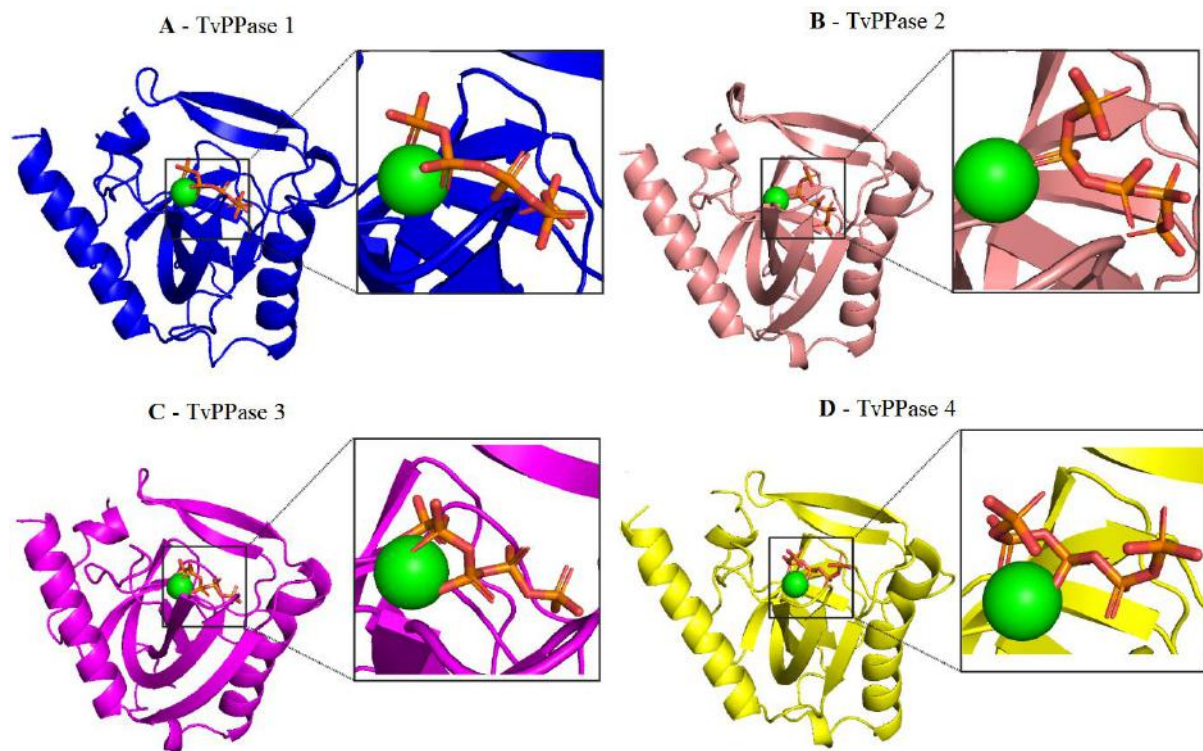
**Figura 25** – Grupos de poses obtidos no procedimento de *docking* molecular do poliP5 nas TvPPase 2-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*.

Sendo assim as melhores poses selecionadas foram as que possuíam menor energia de ligação (Tabela 6 e Figura 26). A TvPPase 3 apresentou a menor energia de ligação (-16,54 kcal/mol), quando comparado com as demais TvPPases (1, 2 e 4) com valores estimados de energia de ligação -8,27, -12,29 e -15,45 kcal/mol, respectivamente. É importante ressaltar que as variações nos valores teóricos de energia de ligação ocorrem devido principalmente à quantidade e aos tipos de interações intermoleculares que ocorrem entre a proteína e o ligante/substrato (HUEY *et al.*, 2007). Em seguida foram analisados quais os tipos de interações ocorrem e quais os resíduos estão envolvidos.

**Tabela 6** - Valores previstos de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o polifosfato de cadeia média (poliP5).

Ligante	Proteínas			
	TvPPase 1	TvPPase 2	TvPPase 3	TvPPase 4
PoliP5				
Energia de ligação (kcal/mol)	-8,27	-12,29	-16,54	-15,45

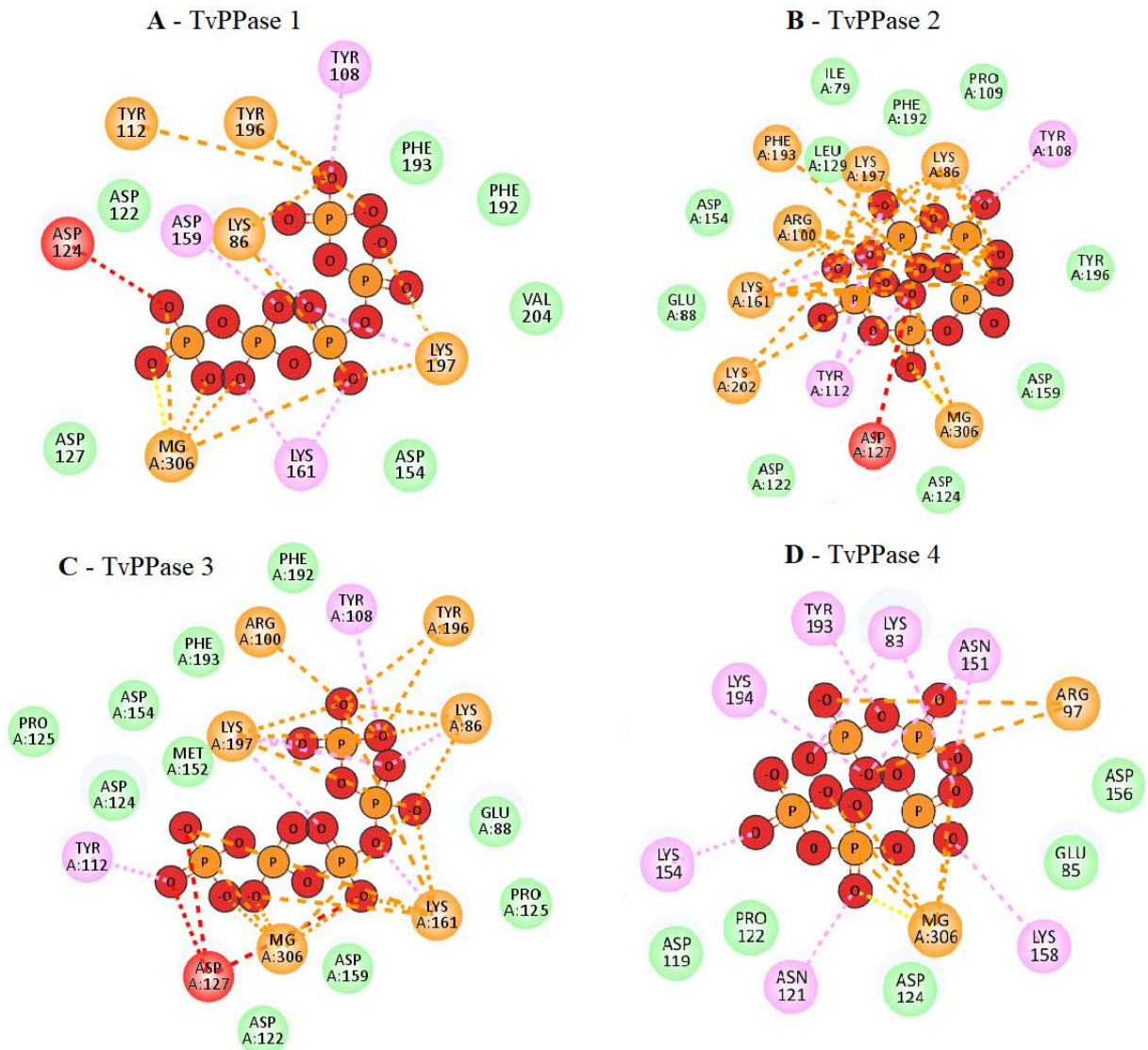
**Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*



**Figura 26** - Melhores poses obtidas por *docking* molecular dos polifosfato de cadeia média (poliP5) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*.

Em seguida foram analisados quais resíduos estavam envolvidos na interação TvPPase-poliP5 e quais os tipos de interações ocorrem (Quadro 6 e Figura 27). Observou-se que, para todas as proteínas, o ligante poliP5 é capaz de interagir com o  $Mg^{2+}$  devido à sua proximidade

e carga elétrica. Sendo assim, são observadas interações favoráveis do tipo eletrostáticas e também do tipo metal-acceptor com os oxigênios carregados do poliP5.



**Figura 27** - Diagrama 2D de interações dos resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia média (PoliP5). A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

Todas as quatro TvPPases apresentaram resíduos em comum envolvidos nas interações com o substrato (Quadro 6). Além disso, interações com os resíduos GLU88 e ASP124 foram observadas nas TvPPases 2 e 3 (Figura 27 e Quadro 6). Enquanto a TvPPase 4 possui também um ácido glutâmico em posição correspondente (GLU85) envolvido na interação com o poliP5, a posição correspondente ao ASP124 (pertencente ao motivo DXDXXD) sofre nessa proteína uma alteração não conservativa para asparagina (ASN121). É importante notar que a presença de resíduos com carga positiva próximos do sítio de ligação do poliP5 fazem com que ocorram

interações iônicas com os grupamentos de fosfato, carregados negativamente (CRUZ *et al.*, 2015), como LYS86, LYS161, LYS197 e ARG100 (e com os resíduos correspondentes LYS83, LYS154, LYS194 e ARG97 na TvPPase4).

**Quadro 6** – Interações observadas no *docking* molecular do poliP5 nas TvPPases 1-4.

Resíduos e tipos de interações				
Proteína	Ligação de H	Van der Waals	Eletrostática	Desfavorável (distância Å)
<b>TvPPase 1</b>	*LYS86; *LYS161; *LYS197; *ASP159; *TYR108;	* <b>ASP122</b> ; * <b>ASP127</b> ; *ASP154; PHE192; PHE193; VAL204	*LYS86; *LYS197; *TYR112; *TYR196; Mg <sup>2+</sup>	*ASP124 (2,542)
<b>TvPPase 2</b>	*LYS86; *LYS161; *TYR108; *TYR112	* <b>ASP122</b> ; * <b>ASP124</b> ; *ASP154; *ASP159; GLU88; LEU129; PRO109; TYR196; PHE192; ILE79	*LYS86; *LYS161; *LYS197; LYS202 *PHE193; ARG100; Mg <sup>2+</sup>	* <b>ASP127</b> (2,808)
<b>TvPPase 3</b>	*LYS86; *LYS161; *LYS197; *TYR108; *TYR112	* <b>ASP122</b> ; * <b>ASP124</b> ; *ASP154; *ASP159; GLU88; PRO125; MET152; PHE192; PHE193	*LYS86; *LYS161; *LYS197; TYR196; ARG100; Mg <sup>2+</sup>	* <b>ASP127</b> (2,447; 2,678 e 2,763)
<b>TvPPase 4</b>	*LYS83; LYS154; *LYS158; LYS194; <b>ASN121</b> ; *ASN154; TYR193	* <b>ASP119</b> ; * <b>ASP124</b> ; *ASP156; PRO122; GLU85	ARG97; Mg <sup>2+</sup>	-

Os asteriscos (\*) indicam resíduos de aminoácidos do sítio ativo importantes para a função enzimática. Destacados em negrito estão os resíduos que pertencem ao motivo DXDXXD. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

Em todos os casos foram observadas interações favoráveis por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas de atração ou ponte salinas, e de Van der Waals. Somente as TvPPase 1, 2 e 3 apresentaram interações desfavoráveis acceptor-acceptor entre os resíduos ASP124 (TvPPase 1) e ASP127 (TvPPases 2 e 3) e átomos de oxigênio do PoliP5 (Figura 27). Esse tipo de interação ocorre através da repulsão entre as cargas negativas do resíduo de aminoácido e dos átomos de oxigênio do poliP5. Assim, isso pode estar ocorrendo devido à proximidade entre os átomos envolvidos, onde a distância é  $< 2,905 \text{ \AA}$  (Quadro 6). Assim, essas interações desfavoráveis causam alguma instabilidade na formação de complexos TvPPase-poliP5. A TvPPase 4 que é a única que não mostrou este tipo de interação desfavorável, mas a TvPPase 3 foi a proteína que teve a menor energia de ligação (-16,54 kcal/mol) do complexo proteína-ligante (Tabela 6). Sendo assim as TvPPase 3 e 4 seriam as melhores candidatas para uma possível interação com poliP5.

Com estes resultados, pode-se notar que alguns tipos de interação são conservados entre os procedimentos de *docking* para poliP3 e poliP5, assim como são conservados os resíduos importantes para função de hidrólise do poliP pelas proteínas. Como seria de se esperar, é

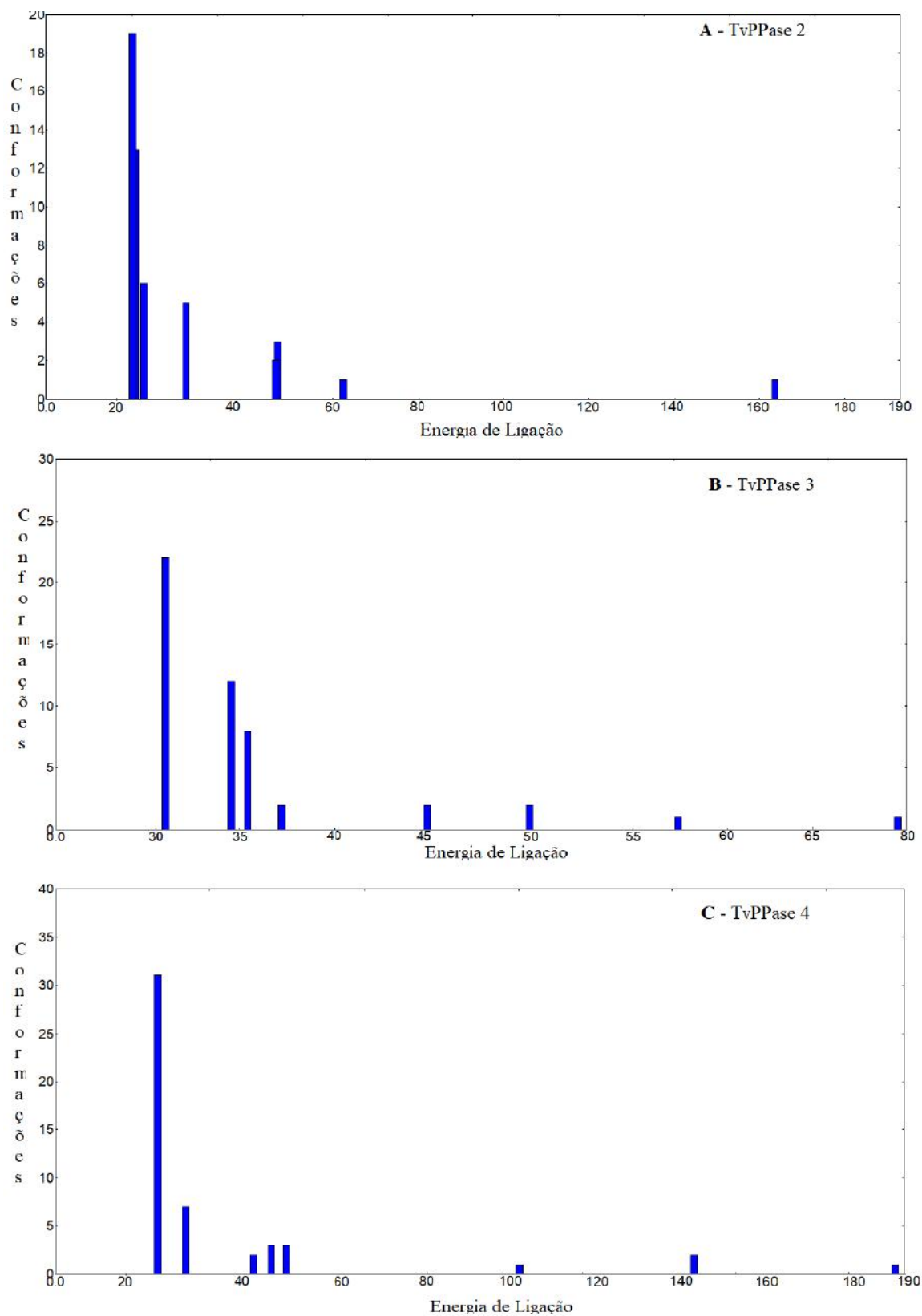
observado um maior número de interações intermoleculares para o poliP5 do que no procedimento com o poliP3.

### **5.7 Docking molecular e avaliação das interações dos polifosfatos de cadeia longa (poliP15) com as TvPPases 1-4**

Os estudos de *docking* molecular foram mais uma vez realizados para avaliação das interações entre as TvPPases e o polifosfato inorgânico de cadeia longa poliP15. Devido aos diferentes tamanhos das cadeias, em quem o poliP15 possui comprimento de 30,486 Å de uma extremidade a outra, fez-se necessário a utilização de caixa com dimensões diferentes (60 × 60 × 40 pontos) dos demais procedimentos de *docking* realizados anteriormente. A caixa utilizada foi centralizada no mesmo átomo de nitrogênio empregado nos ensaios anteriores.

As TvPPases 2, 3 e 4 mostraram possuir mais de um grupo de conformações (*clustering conformation*) (Figura 28), de forma semelhante ao observado no *docking* do poliP5. Dentre cada grupo de conformações, mais uma vez a melhor pose escolhida foi aquela do grupo que apresentou menor energia de ligação na formação do complexo proteína-ligante. Como a TvPPase 1 foi a única que apresentou somente um grupo de conformações, a escolha da melhor pose foi feita com base na pose que possuía menor energia livre de ligação (18,6 kcal/mol) (Tabela 7).

Sendo assim as melhores poses selecionadas foram as que possuíam menor energia de ligação (Tabela 7 e Figura 29). A TvPPase 1 apresentou a menor energia de ligação (18,6 kcal/mol), quando comparado com as demais TvPPases (2, 3 e 4) com valores estimados de energia de ligação 23,8 (TvPPase 2 e 4) e 32,2 kcal/mol, respectivamente. Devido ao tamanho do poliP15, é visível no *docking* que a formação do complexo proteína-substrato é bastante dificultada. As TvPPases podem não comportar interações com polifosfatos de cadeia longa, ou seja, é provável que essas interações não sejam favoráveis e por isso são observados os altos valores de energia de ligação. Pode-se comparar com o valor de energia de ligação (-7.8 kcal/mol) observado na pirofosfatase inorgânica de *R. microplus* (código PDB:1M38) (CRUZ, 2005; CRUZ *et al.*, 2018). Essa variação nos valores de energia de ligação tem relação com a afinidade das proteínas pelos substratos, mas também podem ocorrer devido a quantidade e aos tipos de interações intermoleculares que ocorrem entre a proteína e o substrato (HUEY *et al.*, 2007). Foram analisados quais os tipos de interações ocorrem e quais os resíduos estão envolvidos na interação TvPPase-poliP15 (Quadro 7 e Figura 28).



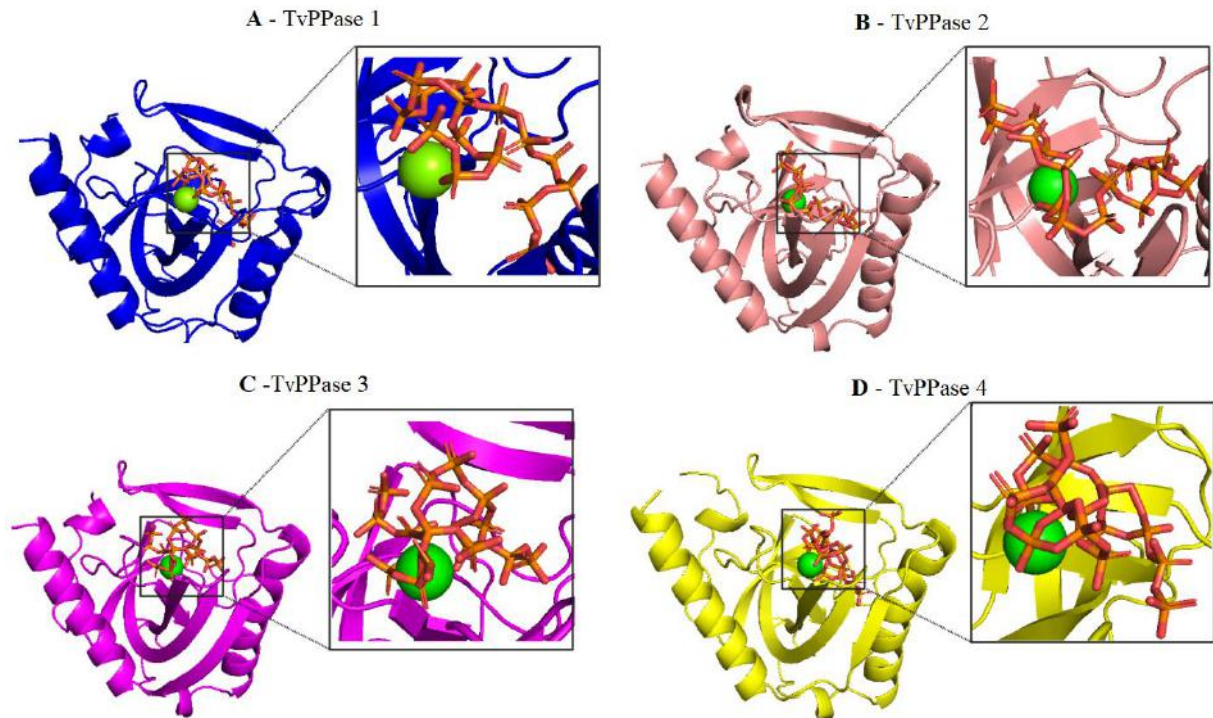
**Figura 28** – Grupos de poses obtidos no procedimento de *docking* molecular do poliP15 nas TvPPase 1-4. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*.



**Tabela 7** - Valores previstos de energias de ligação obtidos para cada uma das TvPPases e o polifosfato de cadeia longa (poliP15).

Ligante	Proteínas			
	TvPPase 1	TvPPase 2	TvPPase 3	TvPPase 4
PoliP15				
Energia livre de ligação (kcal/mol)	18,6	23,8	32,2	23,8

**Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Autodock 4.2*.



**Figura 29** - Melhor pose obtida por *docking* dos polifosfato de cadeia longa (PoliP15) nos modelos das TvPPases 1-4. A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. A esfera verde representa o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*.

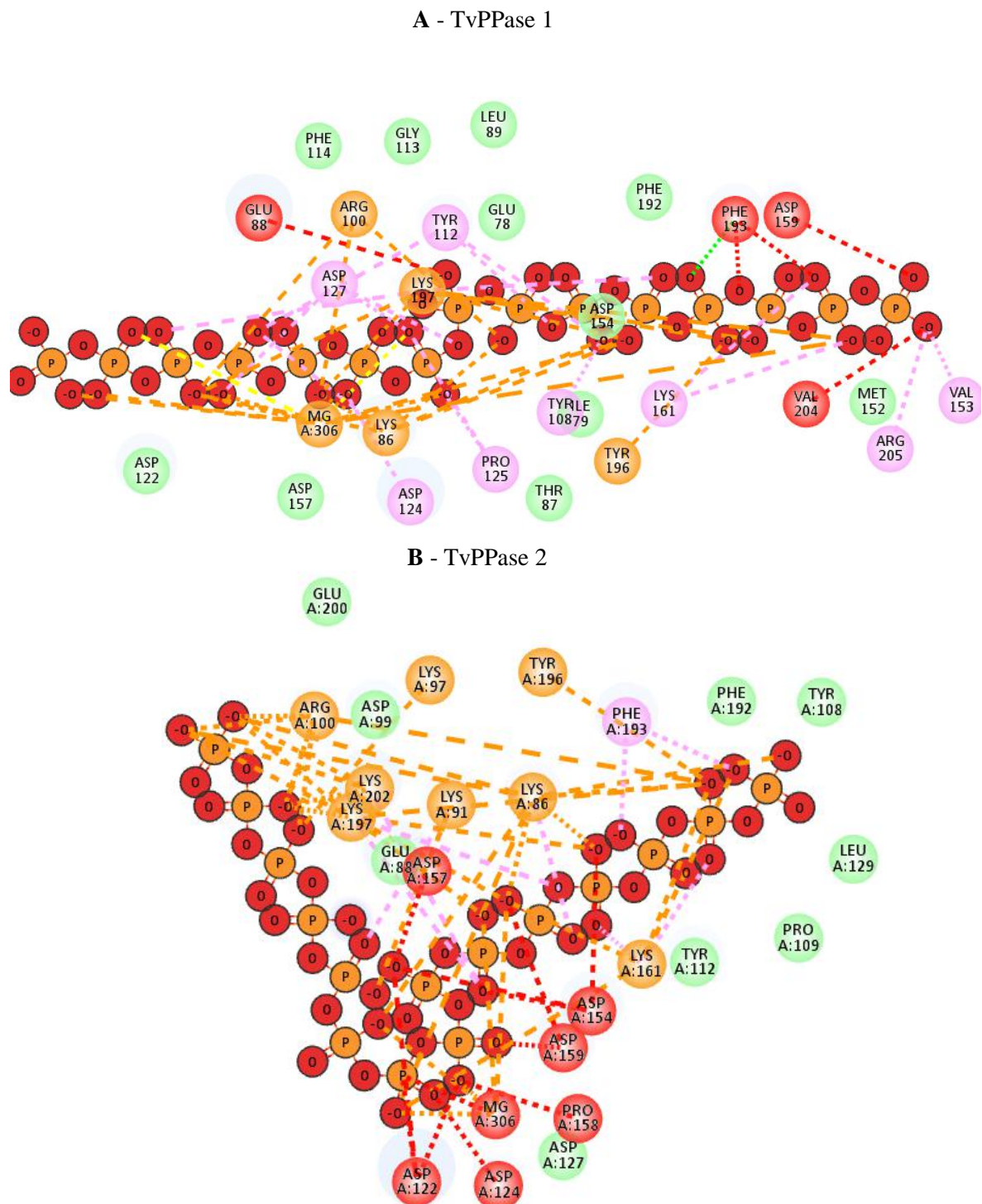
No geral observaram-se que para todas as TvPPases, o ligante poliP15 é capaz de interagir com o cofator metálico ( $Mg^{2+}$ ) devido à sua proximidade. São observadas interações favoráveis do tipo eletrostáticas e do tipo metal-acceptor e desfavoráveis do tipo *bump* (colisão) com um átomo de fósforo da extremidade do poli15. Todas as quatro TvPPases apresentaram os mesmos resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações com o substrato que foram observados nos procedimentos de *docking* anteriores, com alguns aminoácidos a mais (Quadro 7).

**Quadro 7** – Interações observadas no *docking* molecular do poliP15 nas TvPPases 1-4.

<b>Resíduos e tipos de interações</b>				
<b>Proteína</b>	<b>Ligação de H</b>	<b>Van der Waals</b>	<b>Eletrostática</b>	<b>Desfavorável (distância Å)</b>
TvPPase 1	*LYS161; *LYS197; * <b>ASP124</b> ; * <b>ASP127</b> ; *TYR108; *TYR112; PRO125	* <b>ASP122</b> ; ASP157; PHE192; LEU89; GLU78; GLY113; MET152; THR87	*LYS86; *LYS197; ARG100; *TYR196; Mg <sup>2+</sup>	*ASP159; GLU88; VAL204; *PHE193
TvPPase 2	*LYS86; *LYS161; *LYS197; LYS202; PHE193	* <b>ASP127</b> ; GLU88; GLU200; LEU129; PRO109; *TYR112; TYR108; PHE192;	*LYS86; LYS91; *LYS97; *LYS161; *LYS197; LYS202 *TYR196; ARG100; Mg <sup>2+</sup>	* <b>ASP122</b> ; * <b>ASP124</b> ; * <b>ASP127</b> ; *ASP154; ASP157; PRO158; Mg <sup>2+</sup>
TvPPase 3	*LYS86; *LYS197; *TYR108; *TYR112; ASP160; PRO158	*ASP154; *LYS97; PHE193; LEU128; MET152; ILE79	LYS91; *LYS161; ASP99 * <b>ASP124</b> ; ASP157; *ASP159; TYR196; ARG100; Mg <sup>2+</sup>	* <b>ASP122</b> ; * <b>ASP124</b> ; * <b>ASP127</b> ; *LYS86; *LYS197; PRO125; GLU88; Mg <sup>2+</sup>
TvPPase 4	*LYS158; * <b>ASP124</b> ; <b>ASN121</b> ; GLU85; TYR193	LYS154; <b>ASN121</b> ; ASN152; PRO122; GLU85; GLU110; LEU86. PHE111. PHE189, PHE190; VAL126; VAL201; VAL203; TYR105; ILEU 76; ILE125	* <b>ASP119</b> ; *ASP156; TYR109; ARG97; Mg <sup>2+</sup>	ASP96; * <b>ASP124</b> ; *ASP151; *ASP156; *LYS83; TYR193; GLU85; Mg <sup>2+</sup>

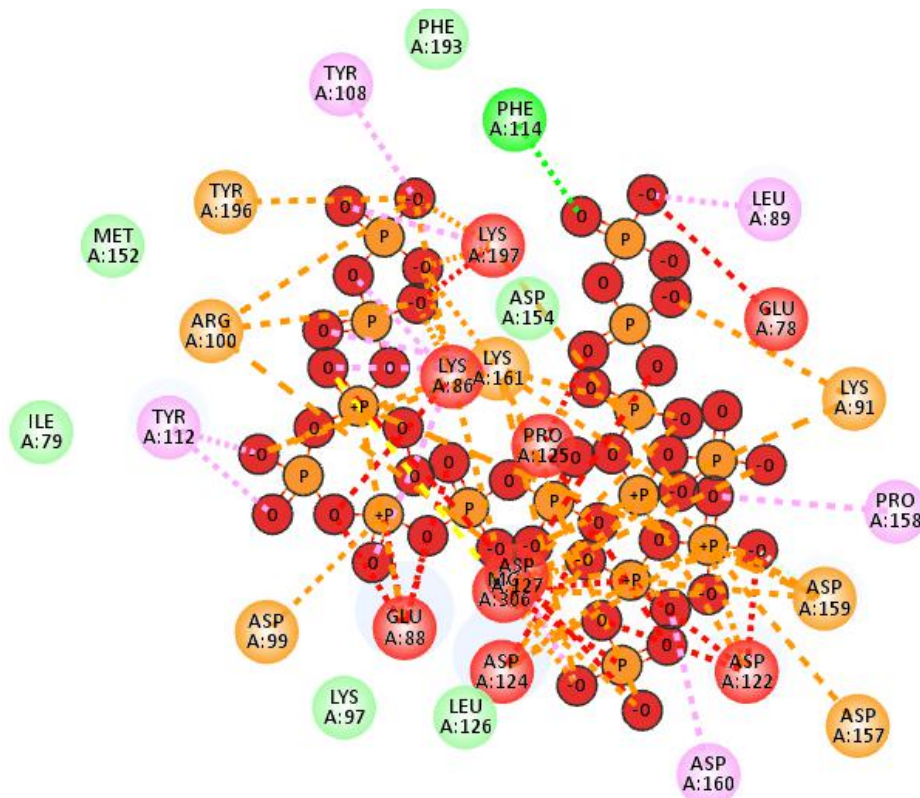
Os asteriscos (\*) indicam resíduos de aminoácidos do sítio ativo importantes para a função enzimática. Destacados em negrito estão os resíduos que pertencem ao motivo DXDXXD. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer*(*BIOVIA*).

Em todos os casos foram observadas interações favoráveis por meio de ligações de hidrogênio, eletrostáticas de atração/ponte salinas, e de Van der Waals. Em especial, foram observadas interações eletrostáticas do tipo  $\pi$ -*lone pair* (par solitário  $\pi$ ), uma interação estabilizadora entre um par solitário de elétrons e um sistema  $\pi$ , conferindo estabilidade à estrutura (NOVOTNÝ *et al.*, 2016). Todas as TvPPases apresentaram interações desfavoráveis (Figura 30), que podem estar ocorrendo devido à proximidade entre átomos, com impedimento estérico e até repulsão de cargas. Essas interações desfavoráveis causam instabilidade na formação de possíveis complexos TvPPase-poliP15. A TvPPase 1 apresentou menos interações desfavoráveis e também a menor energia de ligação (18,6 kcal/mol) (Tabela 7). Apesar disso, a sua energia de ligação é bastante alta quando comparada com a dos polifosfatos de cadeias menores. Como para todos os modelos das TvPPases os valores de energia de ligação com poliP15 são positivos, pode-se concluir que essa interação não é favorável, ou seja, essas enzimas não comportam interações com polifosfatos de cadeia longa.

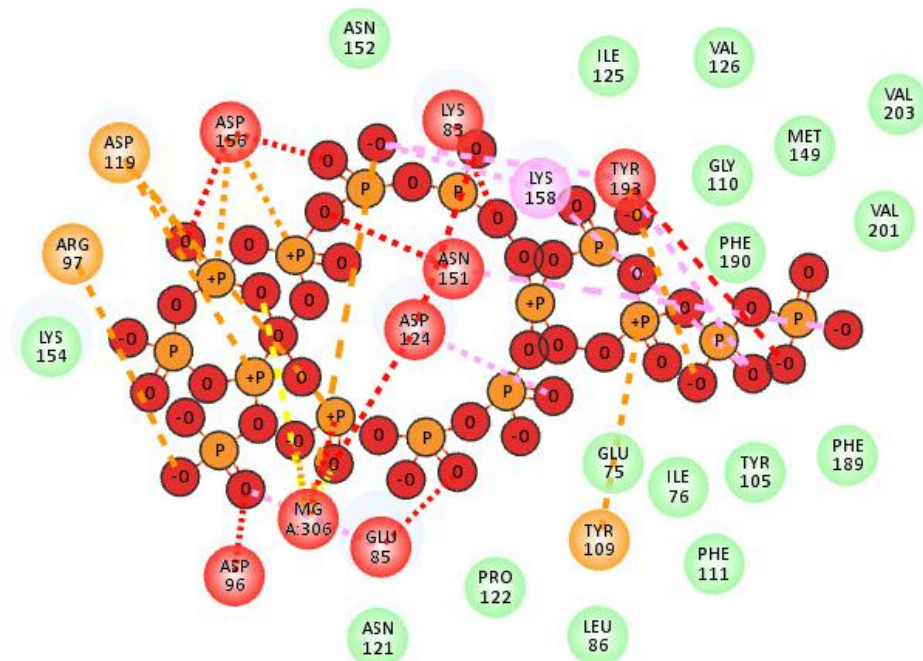


**Figura 30** - Diagrama 2D de interações dos resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia média (PoliP5). A: TvPPase 1; B: TvPPases 2. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável; Verde: interação do tipo *Pi-lone pair* (par solitário  $\pi$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer* (BIOVIA).

## C – TvPPase 3



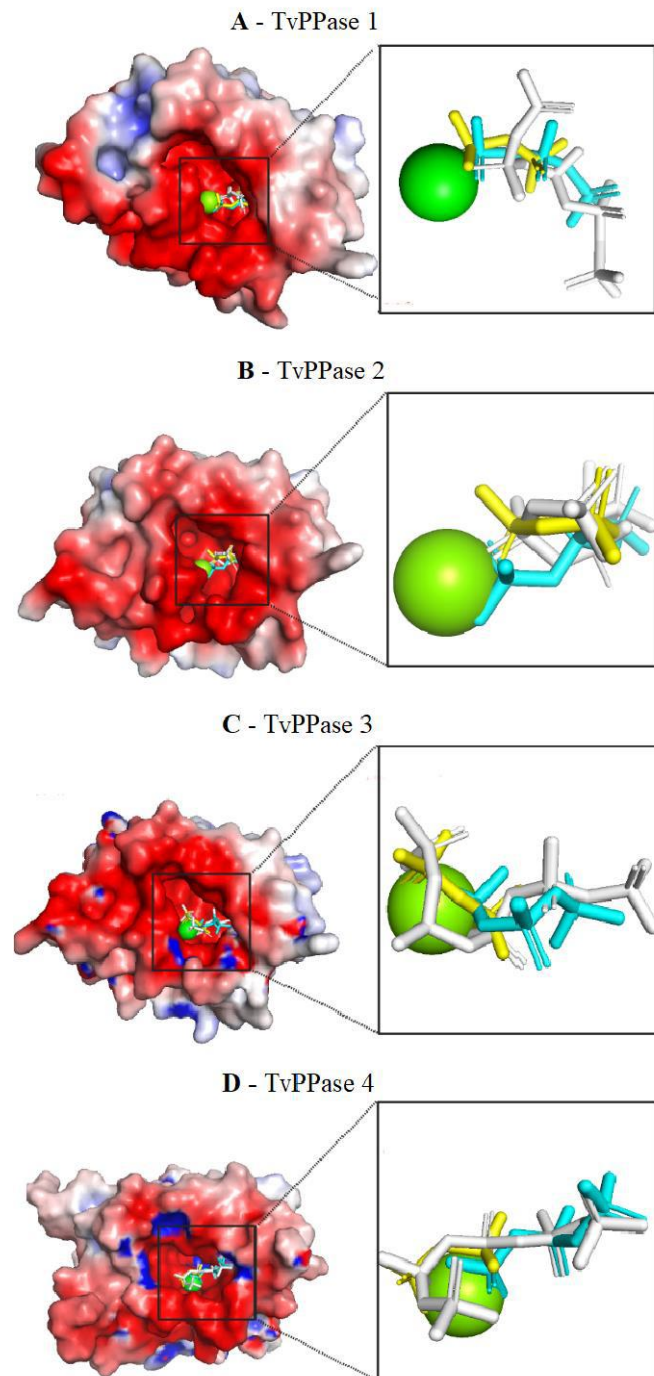
## D - TvPPase 4



**Figura 31** - Diagrama 2D de interações dos resíduos das TvPPases 1-4 que interagem com o polifosfato inorgânico de cadeia média (PoliP5). C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em lilás: ligações de hidrogênio convencionais; Laranja: interações eletrostáticas somente; Verde claro: interação de Van der Waals; Amarelo: ligação metal acceptor; Vermelho: interação desfavorável; Verde: interação do tipo Pi-lone pair (par solitário  $\pi$ ). **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)*.

Com estes resultados, pode-se afirmar que alguns tipos de interação são conservados entre os procedimentos de docking (PPI, poliP3 e poliP5), assim como os resíduos envolvidos

nestas interações. Por isso, avaliou-se a semelhança entre as poses de ligação destes três ligantes e como são acomodados na proteína através de alinhamento (Figura 31). É possível notar que ocorrem diferentes tipos de interação entre a proteína e os ligantes, devido a características específicas de ambos, mas principalmente devido às particularidades de tamanho de cada ligante. Porém, apesar desta diferença de tamanho, não foram observadas poses de ligação tão distintas com as proteínas (Figura 32).



**Figura 32** - Comparação das poses obtidas por *docking* dos polifosfatos TvPPases 1-4. Em A: TvPPase 1; B: TvPPases 2; C: TvPPase 3 e D: TvPPase 4. Em ciano: PoliP3; Branco: PoliP5; Amarelo: PPI. **Fonte:** Elaboração própria. Dados obtido no programa *PyMOL*.

Até o presente, não há descrição das vias envolvidas com o metabolismo de polifosfatos em *T. vaginalis*. Em vista da importância do metabolismo dos poliP em muitos seres vivos, incluindo microrganismos patogênicos (BOWLIN; GRAY, 2021; DENONCOURT; DOWNEY, 2021), é provável que polifosfatos existam e sejam importantes na fisiologia do parasito. Em particular, foi observado uma alta concentração de átomos de fósforo nos hidrogenossomos de *T. vaginalis* e do parasito relacionado *Tritrichomonas foetus*, especialmente em um subcompartimento eletrondenso do hidrogenossomo conhecido como vesícula periférica (CHAPMAN, *et al.*, 1985; BENCHIMOL, 2008). A forma como esse fósforo está armazenada é ainda desconhecida, sendo possível que se trate de depósitos de polifosfatos.

Com bases nos resultados do *docking* e levando em conta quais os tipos de interações ocorreram entre as proteínas e os ligantes (favoráveis/desfavoráveis e energia de ligação), as TvPPases mostraram condições potenciais de interação com cada um dos ligantes, exceto o poliP15. Assim, todas as quatro enzimas apresentaram condições favoráveis de interação com o PPI, como esperado, sendo a TvPPase 2 a que apresentou os melhores parâmetros. As TvPPases 1 e 3 apresentaram melhores condições de interação para o poliP3, enquanto as TvPPases 3 e 4 mostraram ter melhores parâmetros de interação com o poliP5. Sendo assim a TvPPase 3, foi a única proteína que mostrou potencial capacidade de interagir dois substratos de tamanho de cadeias distintos. Entretanto, foi visto também que a TvPPase 3 foi a única das quatro enzimas que não teve seu procedimento de *docking* do PPI validado, uma vez que os valores de RMSD foram superiores a 2,0 Å, não sendo satisfatórios e por isso não tão confiável como nas demais. Assim, como algumas dessas enzimas parecem comportar polifosfatos de cadeia curta e média em seu sítio ativo, é possível que alguma dessas proteínas esteja envolvida no metabolismo de polifosfatos de *T. vaginalis*.

Apesar da diferença entre o tamanho das cadeias dos polifosfatos utilizados neste estudo (exceto para o poliP15), não foram observadas poses de ligação tão distintas com as TvPPases. Estudos adicionais *in silico* e *in vitro* são necessários para determinar a especificidade de substrato dessas proteínas e seu papel na sobrevivência e patogenicidade do parasito.

## 6. CONCLUSÃO

A partir da busca por ortólogos da endopolifosfatase de *T. brucei* (TbVsp1) no genoma de *T. vaginalis*, foram identificados quatro genes que codificam pirofosfatases inorgânicas solúveis (sPPases) em *T. vaginalis* (TvPPases 1-4).

Os modelos tridimensionais das TvPPases 1-4 construídos através de modelagem comparativa, foram validados e possuem qualidade satisfatória e oferecem confiabilidade aos modelos.

A capacidade destas TvPPases interagirem com possíveis substratos PPi e poliP foi analisada através de *docking* molecular com quatro tipos de ligantes de tamanho de cadeias distintos (poliP3, poliP5 e poliP15). Enquanto todas acomodaram o PPi nas regiões previstas de seus sítios ativos, as TvPPases 1 3 e 4 apresentaram algum grau de interação favorável com poliP de cadeia curta e média.

As TvPPases não mostraram potencial capacidade de interação com o poliP15, indicando que caso estejam envolvidas na hidrólise de polifosfatos, esse envolvimento deve ser restrito à moléculas de cadeias curta e média.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 300-310, 1997.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª Edição. Editora ArtMed: Porto Alegre, 2015.
- BARROS, M.E.S. **Estudos de docking molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)-massoialactona e da combretastatina A-4**. 2015. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- BAYKOV, A. A. et al. Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *In*: Schröder, H. C.; Müller, W. E. G. (eds). **Inorganic Polyphosphates**. Progress in Molecular and Subcellular Biology, vol 23. Springer: Berlin/Heidelberg, Alemanha, 1999, p. 127-150.
- BAYKOV, A. A. et al. Inorganic pyrophosphatases of Family II—two decades after their discovery. **FEBS Letters**, v. 591, n. 20, p. 3225-3234, 2017.
- BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 10, n. 5, p. 528-550, 2004.
- BENCHIMOL, M. The hydrogenosome peripheral vesicle: similarities with the endoplasmic reticulum. **Tissue and Cell**, v. 40 n. 1, p. 61-74, 2008.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S. CE; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 71, n. 1, p. 261-277, 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, p.2-13, 2020.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, 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.
- BOWLIN, M.Q.; GRAY, M.J. Inorganic polyphosphate in host and microbe biology. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 1013-1023, 2021.
- BRAVO, R. S. et al. Tricomoníase: o que se passa? **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 22, n. 2, p. 73-80, 2010.
- BROWN, M. R. W.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, n. 46, p. 16085–16087. 2004.
- CARLTON, J. M. et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 207-212, 2007.



CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Trichomoniasis**. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (DPDx). 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>. Acesso em: 9 de out. 2022.

CHAPMAN, A. et al. Energy-dispersive X-ray microanalysis of membrane-associated inclusions in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. **Journal of General Microbiology**, v. 131, n. 11, p. 2933-2939, 1985.

CHEON, S.H. et al. The dimension of *Trichomonas vaginalis* as measured by scanning electron microscopy. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 2, p. 243-246, 2013.

CONRAD, M. D. et al. Getting trichy: tools and approaches to interrogating *Trichomonas vaginalis* in a post-genome world. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 17-25, 2013.

CORDEIRO, C. D. et al. NUDIX hydrolases with inorganic polyphosphate exo- and endopolyphosphatase activities in the glycosome, cytosol and nucleus of *Trypanosoma brucei*. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 5, p. 3-10, 2019.

CORI, G. T. et al. The metabolism of fructose in liver. Isolation of fructose-1-phosphate and inorganic pyrophosphate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 7, p. 304-317, 1951.

CRUZ, C. S. **Estudo funcional de uma pirofosfatase inorgânica envolvida no metabolismo de polifosfatos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produtos Bioativos e Biociências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2015.

CRUZ, C. S. et al. A soluble inorganic pyrophosphatase from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* capable of hydrolysing polyphosphates. **Insect Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 260-267, 2018.

DA SILVA, V.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, 2007.

DENONCOURT, A.; DOWNEY, M. Model systems for studying polyphosphate biology: a focus on microorganisms. **Current Genetics**, v. 67, n. 3, p. 331-346, 2021.

DESFOUGÈRES, Y; SAIARDI, A; AZEVEDO, C. Inorganic polyphosphate in mammals: where's Wally? **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 1, p. 95-101, 2020.

DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. suppl\_2, p. W665-W667, 2004.

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

ESPIAU et al. A soluble pyrophosphatase, a key enzyme for polyphosphate metabolism in *Leishmania*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1516-1523, 2006.

FANG, J.; et al. Overexpression of a Zn<sup>2+</sup>-sensitive soluble exopolyphosphatase from *Trypanosoma cruzi* depletes polyphosphate and affects osmoregulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 44, p. 32501-32510, 2007.

FICHOROVA, R. N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

FIGUEIREDO, D. F. **Comparação entre métodos de modelagem molecular aplicados à enzima alpha-L-iduronidase e análise dos mutantes R89W e R89Q**. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porte Alegre, 2013.

FRASSON, A. P. **Sistema purinérgico de *Trichomonas vaginalis*: envolvimento da ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase e da ecto-5'-nucleotidase na produção de adenosina e na secreção de óxido nítrico por neutrófilos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GALIZZI, M. et al. Evidence for the role of vacuolar soluble pyrophosphatase and inorganic polyphosphate in *Trypanosoma cruzi* persistence. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 699-715, 2013.

GDULA, D. A. et al. Inorganic pyrophosphatase is a component of the *Drosophila* nucleosome remodeling factor complex. **Genes & Development**, v. 12, n. 20, p. 3206-3216, 1998.

GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; LOSADA, M.; SERRANO, A. A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 395, n. 1, p. 211-221, 2006.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, n. S1, p. S162-S173, 2009.

GURYANOV, I.; FIORUCCI, S.; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, v.68, p.890–903, 2016.

GUTIÉRREZ-LUNA, F. M. et al. Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family I isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 253, p. 229-242, 2016.

HALGREN, T. A.; NACHBAR, R. B. Merck molecular force field. IV. Conformational energies and geometries for MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 587-615, 1996.

HEINONEN, J. K. **Biological role of inorganic pyrophosphate**. 2 ed. Kluwer Academic Publishers: Boston, EUA. 2001. p. 1-23.

HIRT, R. P. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 6, p. 439-443, 2013.

HIRT, R. P.; SHERRARD, Jackie. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 72-79, 2015.

HUEY, R. et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1145-1152, 2007.

- HUGHES, R. C. et al. Inorganic pyrophosphatase crystals from *Thermococcus thio-reducens* for X-ray and neutron diffraction. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 68, n. 12, p. 1482-1487, 2012.
- JIMENEZ, V.; DOCAMPO, R. TcPho91 is a contractile vacuole phosphate sodium symporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 911–925. 2015.
- JURRUS, E. et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112-128, 2018.
- KAJANDER, T.; KELLOSALO, J.; GOLDMAN, A. Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms. **FEBS Letters**, v. 587, n. 13, p. 1863-1869, 2013.
- KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2015.
- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- KORNBERG, A; RAO, N. N.; AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 89-125, 1999.
- KULAKOVSKAYA, T. V. et al. Enzymes of polyphosphate metabolism in yeast: Properties, functions, practical significance. **Biochemistry (Moscow)**, v. 86, n. 1, p. S96-S108, 2021.
- KUSDIAN, G.; GOULD, S. B. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 198, n. 2, p. 92-99, 2014.
- LANDER, N; ULRICH, P. N.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma brucei* vacuolar transporter chaperone 4 (TbVtc4) is an acidocalcisome polyphosphate kinase required for in vivo infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 47, p. 34205-34216, 2013.
- 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.
- LEE, H. N. et al. Simple but effective way to sense pyrophosphate and inorganic phosphate by fluorescence changes. **Organic Letters**, v. 9, n. 2, p. 243-246, 2007.
- LEITSCH, D. Recent advances in the molecular biology of the protist parasite *Trichomonas vaginalis*. **Faculty Reviews**, v. 10, 2021.
- LEMERCIER, G. et al. A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3420–3425. 2004.
- LEMOS, P. A. P.; GUILLO, L. A.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Citopatogenicidade de *Trichomonas vaginalis*: uma via de sinalização carboidrato-dependente. **Femina**, p. 129-134, 2014.

- LI, H.; ROBERTSON, A. D.; JENSEN, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, n. 4, p. 704-721, 2005.
- LIEBERMANN, L. Nachweis der metaphosphorsäure im nuclein der hefe. **Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. 47, n. 1, p. 155-160, 1890.
- 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.
- LUGINBUEHL, E. et al. The exopolyphosphatase TbrPPX1 of *Trypanosoma brucei*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011.
- MACHADO, E. R., SOUZA, L. DE P. Trichomoníase: Assistência de enfermagem na prevenção e controle. **Ensaios 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.
- MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular *docking*: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.
- MIELCZAREK, E.; BLASZKOWSKA, J. *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. **Infection**, v. 44, n. 4, p. 447-458, 2016.
- MORGON, N. H.; COUTINHO, K. R. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. 1 ed. Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007.
- MORETH, M., et al. Nitroimidazóis—uma promissora classe de substâncias para o tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.2, p.105-117, 2010.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11 ed., cap 13, Atheneu: São Paulo, 2005, p. 115-120,
- NOVOTNÝ, J. et al. Lone-pair- $\pi$  interactions: analysis of the physical origin and biological implications. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 28, p. 19472-19481, 2016.
- NYRÉN, P; LUNDIN, A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 504-509, 1985.
- OLIVEIRA, A. S. et al. *Trichomonas vaginalis*: an updated overview towards diagnostic improvement. **Acta Parasitologica**, v. 61, n. 1, p. 10-21, 2016.
- PETRIN, D. et al. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 300-317 Vol. 11, n. 2, 1998.
- 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.

- POSPISIL, P.; KUONI, T.; SCAPOZZA, L.; FOLKERS, G. Methodology and problems of protein ligand *docking*: case study of dihydroorotate dehydrogenase, thymidine kinase and phosphodiesterase 4. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 22, n. 1-4, p. 141-154, 2002.
- PREISNER, H. et al. The cytoskeleton of parabasal parasites comprises proteins that share properties common to intermediate filament proteins. **Protist**, v. 167, n. 6, p. 526-543, 2016.
- RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 108, n. supplement\_1, p. 4680-4687, 2011.
- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010, p. 391, 2010
- RHODES, G. Tutorial for DeepView – Swiss-PdbViewer. a guide for users of macromolecular models. 3 ed. Academic Press. 2006. Disponível em: <https://spdbv.unil.ch/TheMolecularLevel/SPVTut/index.html>. Acesso em: 20 de jun, de 2022.
- ROWLEY, J. et al. *Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis*: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 97, n. 8, p. 548–562, 2019.
- RYAN, C. M. et al. *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host–parasite interactions. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 161-175, 2011.
- SAKRU, N. et al. Increased sensitivity of *Trichomonas vaginalis* isolation from vaginal secretions by subsequent blind passage of preliminary negative cultures. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 1, p. 75-76, 2005.
- SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253-259, 2003.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.
- SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v. 17, n. 4, p. 355-362, 1993.
- TAMMENKOSKY, M. et al. An Unusual His – dependent Family I Pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 51, p. 41819 – 41826, 2005.
- TERKELTAUB, R. A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 281, n. 1, p. C1-C11, 2001.
- ULRICH, P. N. et al. The acidocalcisome Vacuolar Transporter Chaperone 4 catalyzes the synthesis of polyphosphate in insect-stages of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 155–165, 2014.
- WHEELER, D. Selecting the right protein-scoring matrix. **Current Protocols in Bioinformatics**, n. 1, p. 3.5. 1-3.5. 6, 2003.

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, p. W407-410, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008**. World Health Organization, 2012.

XU, D.; ZHANG, Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 10, p. 2525-2534, 2011.

YANG, S. et al. Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 12, p. 3045-3055, 2017.

YI, Y. J. et al. Identification of the inorganic pyrophosphate metabolizing, ATP substituting pathway in mammalian spermatozoa. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34524, 2012.

YURIEV, E; AGOSTINO, M; RAMSLAND, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 2, p. 149-164, 2011.

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl\_2, p. W407-W410, 2007.