



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus Professor Aloísio Teixeira



**Estudo por modelagem molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo
hidrolase de *Trichomonas vaginalis***

Autor: Juliana do Nascimento Silva

**Macaé
Maio de 2014**

Juliana do Nascimento Silva

**Estudo por modelagem molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo
hidrolase de *Trichomonas vaginalis*.**

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus* Professor Aloísio Teixeira como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Magdalena Nascimento Rennó

**Macaé,
Maio de 2014**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde, força e capacidade para superar todas as dificuldades e alcançar o meu objetivo. O que seria de mim sem a fé que tenho Nele.

A minha mãe Lecilda e ao meu pai Waldemir pelo amor, carinho e dedicação, tudo que sou hoje devo a vocês que sempre fizeram o impossível para me dar o melhor e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu irmão Rafael, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado Guilherme, obrigado pelo carinho, a paciência, compreensão e pela sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre.

À toda minha família, por me amar e sempre acreditar na minha capacidade.

Aos amigos pelo incentivo e pelo apoio constante, e que sempre entenderam a minha ausência.

À minha orientadora Professora Dra. Magdalena Nascimento Rennó por todo carinho, amizade e conhecimento transmitido. Posso dizer que a minha formação, não teria sido a mesma sem a sua presença, sem dúvidas a profissional que estou me tornando hoje é reflexo dos seus ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa.

À todos os professores do curso de Farmácia da UFRJ-*Campus* Professor Aloísio Teixeira, que foram de extrema importância em minha vida acadêmica.

À todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Modelagem Molecular e Pesquisa em Ciências Farmacêuticas (LamCiFar), pelos momentos de alegria, aprendizagem e companheirismo, vocês foram fundamentais.

E a todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta deste trabalho. Muito obrigada!

Lista de figuras

Figura 1: (A) O parasito <i>T. vaginalis</i> visto em meio de cultura, onde o axóstilo, a membrana ondulante e os flagelos são visíveis. (B) O protozoário na superfície de uma célula epitelial vaginal.....	2
Figura 2: Estrutura química do metronidazol.....	7
Figura 3: Ativação do metronidazol no hidrogenossomo.....	8
Figura 4: Estrutura química do tinidazol.....	11
Figura 5: Inibidores de nucleosídeo hidrolase derivados da estrutura 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol. (A) Immucillin-H, (B) Immucillin-A, (C) Immucillin-ACAP, (D) DADMe-ImmucillinH, (E) DADMe-ImmucillinA, (F) pAPIR	17
Figura 6: Inibidores de nucleosídeo hidrolase. (A) Riboamidrazona, (B) <i>p</i> -nitrofenilriboamidrazona	17
Figura 7: Alinhamento entre as sequências do molde (NH de <i>L. major</i> Código PDB 1EZR) e do modelo de (NH de <i>T. vaginalis</i>). Marcado em amarelo os resíduos de aminoácidos que são idênticos nas duas sequências (32%).	25
Figura 8: Alinhamento entre a sequência primária do modelo de <i>TvgNH</i> e do molde de <i>LmNH</i> (Código PDB 1EZR). Marcado em vermelho as regiões de α -hélice, em verde as folhas- β e em azul as alças.	26
Figura 9: Gráficos de Ramachandran mostrando a confiabilidade do molde (1EZR) e modelo. A) Minimização 1 do modelo de <i>TvgNH</i> B) Minimização 2 do modelo de <i>TvgNH</i> .C) Minimização 3 do modelo de <i>TvgNH</i> D) Molde <i>LmNH</i> (1EZR).....	27
Figura 10: Análise do perfil no Verify_3D mostrando a confiabilidade do molde a NH de <i>L. major</i> (em azul) e do modelo da enzima NH de <i>T. vaginalis</i> (em vermelho). ...	28
Figura 11: Valores de Score-Z obtido do programa ProSa-Web: molde a NH de <i>L. major</i> Código PDB 1EZR (em preto); modelo de NH de <i>T. vaginalis</i> (em vermelho).29	
Figura 12: Os valores de energia dos resíduos em função de um resíduo central (verde escuro) e a energia independente de cada resíduo (verde claro) do molde a NH de <i>L. major</i> (A) e modelo da enzima NH de <i>T. vaginalis</i> (B).	30
Figura 13: Estrutura secundária do: (A) modelo de NH de <i>T. vaginalis</i> e (B) molde a NH de <i>L. major</i> (1EZR).....	30
Figura 14: Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias da enzima <i>TvgNH</i> , e dos moldes: <i>C. fasciculata</i> (PDB 2MAS), <i>L. major</i> (PDB 1EZR), <i>T. b. brucei</i> (PDB	

3FZ0), *T. vivax* (PDB 2FF2), *B. anthracis* (PDB 2C40). Em verde os resíduos conservados.....32

Figura 15: Alinhamento múltiplo das sequências primárias do modelo de NH de *T. vaginalis*, de *L. major* (PDB 1EZR), *T. b. brucei* (PDB 3FZ0), *T. vivax* (PDB 2FF2), *B. anthracis* (PDB 2C40) e do molde *C. fasciculata* (PDB 2MAS).....33

Figura 16: Gráficos de Ramachandran das minimizações do modelo e molde. A) Minimização 1 do modelo de *TvgNH*. B) Minimização 2 do modelo de *TvgNH*. C) Minimização 3 do modelo de *TvgNH*. D) Minimização 4 do modelo de *TvgNH*. E) Minimização 5 do modelo de *TvgNH*. F) Minimização 6 do modelo de *TvgNH*. G) Minimização do molde a NH de NH de *C. fasciculata* (PDB 2MAS).....35

Figura 17: Gráfico da análise do perfil 3D_1D no programa Verify_3D do molde a NH de *C. fasciculata* (código PDB 2MAS) (cinza escuro) e do modelo da enzima NH de *T. vaginalis* (cinza claro).....37

Figura 18: Valores de Score-Z obtido do programa ProSa-Web. A) o molde a NH de *C. fasciculata* (preto) e o modelo de NH de *T. vaginalis* (amarelo).37

Figura 19: Resultado da média da energia dos resíduos em função de um resíduo central (verde escuro) e a energia independente de cada resíduo (verde claro) do modelo da enzima NH de *T. vaginalis* (A) e o molde a NH de *C. fasciculata*, PDB 2MAS (B).....38

Figura 20: Estrutura secundária do modelo de: (A) NH de *T. vaginalis* e (B) molde da NH de *C. fasciculata*.....39

Figura 21: Potencial inibidor da enzima NH de *C. fasciculata*: *p*-nitrofenilriboamidrazona.44

Figura 22: Potenciais inibidores da NH de *L. donovani*: (A) composto 1, (B) composto 2.44

Figura 23: Perfil de toxicidade in silico relativo à mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito irritante e efeito na reprodução de potenciais inibidores de NH descritos na literatura onde 1, 2 e 3 representam, respectivamente baixo, médio e alto risco.....45

Figura 24: Perfil *druglikeness* dos potenciais inibidores de NH descritos na literatura. Onde Imm representa immucillin, *pAPIR* representa *p*-aminofenilminoribitol e *pNFRA* representa *p*-nitrofenilriboamidrazona.46

Figura 25: Drug-score dos potenciais inibidores de NH descritos na literatura. Onde Imm representa immucillin, *p*APIR representa *p*-aminofeniliminoritol e *p*NFRA representa *p*-nitrofenilriboamidrazona.....47

Figura 26: A) *Redocking* molecular do *p*APIR na IU-NH de *C. fasciculata*. (B) Sobreposição: em azul representa a conformação original do PDB e em amarelo o *redocking*.....49

Figura 27: (A) *Redocking* molecular do Immucillin-H na IAG-NH de *T. vivax*. (B) Sobreposição: em vermelho representa a conformação original do PDB e em verde o *redocking*.....51

Figura 28: Sobreposição dos substratos obtidos no docking molecular dos mesmos na IAG-*Tv*NH. Em vermelho a inosina, em verde a adenosina, em azul a guanosina, em rosa a uridina e em verde o *p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo.....54

Figura 29: Resíduos de aminoácidos que interagiram com o inibidor *p*-nitrofenilriboamidrazona (*p*NFR) no *docking* molecular na *Tvg*NH.....60

Figura 30: Resíduos de aminoácidos que interagiram com o composto 1 (A) e composto 2 (B), no *docking* molecular na *Tvg*NH.61

Lista de tabelas

Tabela 1: Percentual de resíduos de aminoácidos presentes em regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis obtido com gráfico de Ramachandran: do molde (Código PDB 1EZR) e das minimizações do modelo de <i>TvgNH</i>	27
Tabela 2: Percentual de resíduos de aminoácidos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis obtidos no gráfico de Ramachandran, do molde a IU-CfNH (PDB 2MAS) e das minimizações do modelo de <i>TvgNH</i>	36
Tabela 3: Características dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da NH de <i>C. fasciculata</i> e da NH de <i>T. vaginalis</i>	40
Tabela 4: Potenciais inibidores das nucleosídeos hidrolases descritos na literatura derivados da estrutura 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol e suas respectivas constantes de inibição.	43
Tabela 5: Avaliação da biodisponibilidade oral dos potenciais inibidores de NH, segundo a “Regra dos cinco” de Lipinski.	48
Tabela 6: Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o pAPIR, no <i>redocking</i> molecular na IU-NH de <i>C. fasciculata</i>	50
Tabela 7: Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o Immucillin-H, no <i>redocking</i> molecular na IAG-NH de <i>T. vivax</i>	51
Tabela 8: Resultados obtidos com o <i>docking</i> molecular dos substratos na IU-NH de <i>C. fasciculata</i>	53
Tabela 9: Resultados obtidos com o <i>docking</i> molecular dos substratos na IAG-NH de <i>T. vivax</i>	55
Tabela 10: Resultados obtidos com o <i>docking</i> molecular dos substratos no modelo de NH de <i>T. vaginalis</i>	56
Tabela 11: Comparação entre os valores de K_M obtidos experimentalmente e valores de K_d obtidos no estudo teórico de <i>docking</i> molecular para substratos da NH.	58
Tabela 12: Resultados do <i>docking</i> molecular dos potenciais inibidores no modelo de <i>TvgNH</i>	62

Lista de Abreviações

- DNA - Ácido desoxirribonucleico;
- DST – Doenças sexualmente transmissíveis;
- FDA – *Food and Drug Administration*;
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana;
- IAG-*Tv*NH – Inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase de *Trypanosoma vivax*;
- Imm – Immucillin;
- IU-*Cf*NH – Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de *Crithidia fasciculata*;
- mRNA – RNA mensageiro;
- K_d – Constante de dissociação;
- NH – Nucleosídeo hidrolase;
- nOHNH - Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio;
- nON - Número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio número de grupos aceitadores de ligação de hidrogênio;
- OMS – Organização Mundial de Saúde;
- PFOR – Piruvato-ferredoxina oxidoreductase;
- p*APIR – *p*-aminofeniliminoribitol;
- p*-NPR – *p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo
- RMSD - Desvio da raiz média quadrada;
- Tvg*NH – Nucleosídeo hidrolase de *Trichomonas vaginalis*;

Sumário

1	Introdução	1
1.1	O parasito: <i>Trichomonas vaginalis</i>	1
1.2	A doença	3
1.3	Diagnóstico para a tricomoníase humana	5
1.4	Tratamentos para a tricomoníase humana	7
1.5	A nucleosídeo hidrolase como um alvo terapêutico em tricomoníase.....	12
1.6	Potenciais inibidores para a enzima nucleosídeo hidrolase	15
2	Justificativa.....	18
3	Objetivos	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	Metodologia.....	19
4.1	Modelagem comparativa	19
4.2	Potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase.....	21
4.3	Avaliação das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade “ <i>in silico</i> ”.....	22
4.4	Estudos de <i>docking</i> molecular	23
4.4.1	Estudos de <i>docking</i> molecular de substratos e potenciais inibidores da enzima nucleosídeo hidrolase de <i>T. vaginalis</i>	23
5	Resultados e Discussão	25
5.1	Modelagem comparativa	25
5.2	Potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase.....	41
5.3	Avaliação das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade “ <i>in silico</i> ”	44
5.4	Estudos de <i>docking</i> molecular	48
5.4.1	Estudos de <i>docking</i> molecular de substratos da enzima nucleosídeo hidrolase de <i>T. vaginalis</i>	48
6	Conclusões.....	64
7	Referências bibliográficas	65

Resumo

O protozoário *Trichomonas vaginalis* é o parasita causador da tricomoníase humana, que é uma doença sexualmente transmissível. O fármaco de primeira escolha para o tratamento desta doença é o metronidazol, mas casos de resistência têm sido relatados. Como este protozoário não possui a via biossintética *de novo* de purinas depende da captação de purinas do hospedeiro para a síntese de seu DNA e RNA. Neste contexto, a nucleosídeo hidrolase (NH), enzima chave na rota de captação de purinas, é considerada um alvo excelente para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, pois esta enzima não foi identificada em mamíferos. Os objetivos deste trabalho foi a construção do modelo tridimensional da enzima NH de *T. vaginalis* (*TvgNH*), avaliar, “*in silico*”, as interações da enzima com os substratos, realizar o estudo das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade de potenciais inibidores de NH descritos na literatura, e realizar o estudo de *docking* molecular. Foram construídos dois modelos de *TvgNH*, um com base no alinhamento simples e o outro no alinhamento múltiplo entre as sequências primárias da enzima NH de microrganismos e a de *T. vaginalis*. Nos estudos de toxidez “*in silico*” o potencial inibidor, *p*-nitrofenilriboamidrazona, que é um inibidor descrito na literatura para a enzima NH, apresentou alto alerta de risco tumorigênico e médio para causar mutagênicidade. O modo de interação entre os potenciais inibidores e o sítio ativo do modelo foi estudado através de estudos de *docking* molecular, onde o *p*-nitrofenilriboamidrazona apresentou o melhor resultado na inibição da *TvgNH*. A partir dos estudos de *docking* molecular realizado na *TvgNH* com os substratos das NHs, sugere-se que a *TvgNH* seja do tipo base não-específica inosina-uridina nucleosídeo hidrolase.

Palavras chaves: inibidores enzimáticos, tricomoníase, nucleosídeo hidrolase.

1 Introdução

As doenças infecciosas e parasitárias representam um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, e aparecem nas estatísticas epidemiológicas entre as principais causas de morte no mundo (FAUCI *et al.*, 2005).

Os protozoários são os responsáveis pela maioria das infecções parasitárias que afetam os humanos. Algumas destas doenças são consideradas negligenciadas ou extremamente negligenciadas, tais como, a doença do sono, malária, Chagas e as leishmanioses (MORAN *et al.*, 2009).

Uma estimativa feita em 2002 sobre as principais causas de mortes em todo o mundo, das 57 milhões de mortes anuais, quase 15 milhões (26%) são causadas por doenças infecciosas e parasitárias (OMS, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre as principais doenças infecciosas que mais causam morte no mundo, estão as doenças sexualmente transmissíveis (DST) (OMS, 2000). As DST constituem um importante problema de saúde pública mundial, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, desta forma o diagnóstico precoce, mediante técnicas sensíveis e específicas, e o tratamento adequado, são cruciais para a redução da transmissão e das sequelas das DST (VÁSQUEZ *et al.*, 2008).

Dentre as DST, encontra-se a tricomoníase, uma doença infecciosa com incidência anual mundial superior a 180 milhões de casos, causada pelo protozoário parasita *Trichomonas vaginalis* (OMS, 2001).

1.1 O parasito: *Trichomonas vaginalis*

O *Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado, parasita do trato urogenital e agente etiológico da tricomoníase em humanos (PETRIN *et al.*, 1998; SWYGARD *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2011). Este parasito é membro da família Trichomonadidae, da subfamília Trichomonadinae e da ordem Trichomonadida (NEVES *et al.*, 2005).

É uma célula polimórfica, podendo se apresentar na forma elipsoide ou oval e algumas vezes esférica. Apresenta em média 9,7µM de comprimento por 7,0 µM de largura. Possui cinco flagelos, quatro que estão localizados no complexo granular basal anterior e um recorrente incorporado a membrana ondulante do parasita, além

do axóstilo, uma estrutura rígida e hialina, que se origina no centro e prolonga-se até a extremidade posterior (PETRIN *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2005).

O núcleo é elipsoide próximo à extremidade anterior, com uma dupla membrana nuclear. Organelas como mitocôndrias encontram-se ausentes nesses protozoários, entretanto apresentam hidrogenossomos, que são grânulos densos, com função semelhante a das mitocôndrias, que possuem a enzima piruvato ferredoxina-oxidoreductase, responsável por transformar piruvato em acetato e liberar adenosina-trifosfato (ATP) e hidrogênio (PETRIN *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2005). A Figura 1, a seguir, ilustra o protozoário *T. vaginalis*.

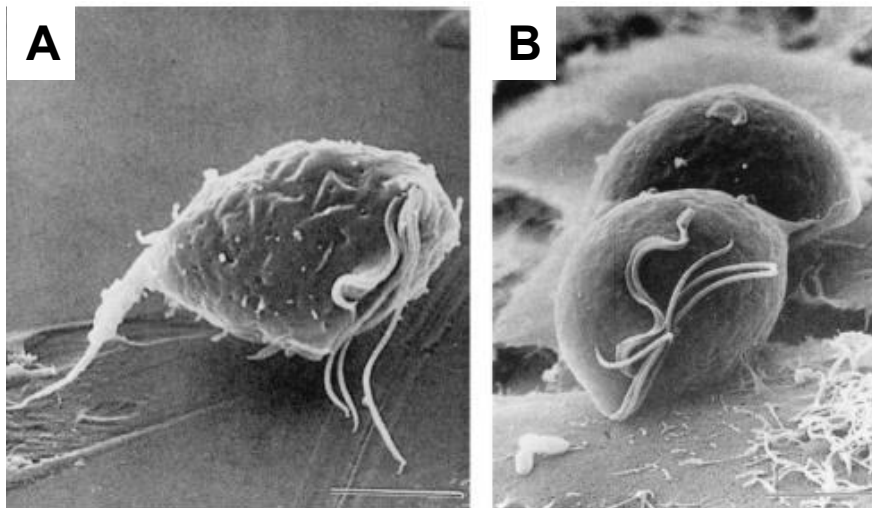


Figura 1: (A) O parasito *T. vaginalis* visto em meio de cultura, onde o axóstilo, a membrana ondulante e os flagelos são visíveis. (B) O protozoário na superfície de uma célula epitelial vaginal. Fonte: PETRIN *et al.*, 1998.

O *T. vaginalis* é um parasito anaeróbico facultativo, cresce muito bem na ausência de oxigênio, na faixa de pH de 5 a 7,5, em temperaturas entre 20°C e 40°C. Utiliza como fonte de energia, carboidratos como glicose, frutose, glicogênio e amido (NEVES *et al.*, 2005).

O ciclo de vida deste protozoário é simples, no qual a forma trofozoítica é transmitida através da relação sexual, não apresentando a forma cística. Os trofozoítos dividem-se por divisão binária, dando origem a uma população celular no lúmen ou na superfície das mucosas do trato urogenital, onde se encontram (SCHWEBKE & BURGESS, 2004; NEVES *et al.*, 2005).

A forma trofozoítica é afetada pelas condições físico-químicas, como pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica (PETRIN *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2005).

1.2 A doença

A tricomoníase é a doença sexualmente transmissível mais comum no mundo, com incidência anual mundial superior a 180 milhões de casos (OMS, 2001).

A taxa de prevalência desta doença está relacionada a muitos fatores, entre eles estão a idade, a atividade sexual e hábitos de higiene, a fase do ciclo menstrual, a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, os métodos de diagnóstico, fatores socioeconômicos, entre outros (PETRIN *et al.*, 1998).

Segundo a OMS a prevalência de tricomoníase em 2005, por regiões do mundo, foi de 21,94% na África, 16,23% nas Américas, 6,84% na Europa, 6,14% no sudeste da Ásia e no leste do Mediterrâneo, e 5,44% no Pacífico Ocidental. Estas estimativas indicam que em 2005 havia aproximadamente 153 milhões de adultos infectados por tricomoníase no mundo. Para a incidência, em 2005 foi estimado 248 milhões de novos casos de tricomoníase entre adultos de 15 a 49 anos de idade (OMS, 2011).

Em 2008 a OMS estimou 276,4 milhões de casos de incidência de infecção por *T. vaginalis*, representando um aumento de 11,2% em relação às estimativas globais de 2005 (OMS, 2012; HOBBS & SEÑA, 2013).

Existe certa dificuldade em se obter os dados referentes à prevalência da tricomoníase, uma vez que a infecção não é de notificação compulsória. No Brasil, soma-se o fato do emprego de técnicas de diagnóstico de baixa sensibilidade, o que acaba subestimando esses dados (GRAMA *et al.*, 2013).

Entretanto, no Brasil, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de estimar a prevalência da tricomoníase em grupos populacionais de várias regiões do país. Miranda *et al.* (2000), encontraram prevalência de 30% para *T. vaginalis* estudando 121 mulheres presidiárias do presídio estadual de Vitória, Espírito Santo (MIRANDA *et al.*, 2000).

Em estudo realizado por Adad *et al.* (2001), durante quatro décadas com 20.356 pacientes, atendidas no Ambulatório de Ginecologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, para identificar a frequência de tricomoníase utilizando a técnica de Papanicolau, foram encontrados índices de prevalência de 10,0%, 17,3%, 9,8% e 3,4% nos anos de 1968, 1978, 1988 e 1998, respectivamente (ADAD *et al.*, 2001).

Em Brasília, Simões-Barbosa *et al.* (2002), encontraram uma prevalência de tricomoníase que variou de 4,9% a 10,0%, em estudo realizado para verificar a distribuição das DST mais comuns, entre os pacientes atendidos pelas clínicas ginecológicas dos principais hospitais públicos de Brasília e do Distrito Federal durante o período de 6 anos (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2002).

Michel *et al.* (2006), realizaram pesquisa para determinar a prevalência da tricomoníase entre mulheres residentes na Vila dos Papeleiros, em Porto Alegre no Rio Grande do Sul, e obteve 20% de prevalência entre as participantes (MICHEL *et al.*, 2006).

Em 2009, Zorati e De Melo verificaram a incidência do protozoário *T. vaginalis* e estabeleceram a faixa etária mais atingida por este parasita em mulheres pacientes do Sistema Único de Saúde de Cascavel e na região Oeste do Paraná. Foi encontrado que a maior incidência está na faixa etária entre 20 e 49 anos, tendo um declínio após os 50 anos (ZORATI & DE MELO, 2009).

A transmissão da tricomoníase ocorre por meio de relação sexual, e embora seja considerada uma doença principalmente de mulheres, também se observa a infecção em homens. Apresenta uma variedade de manifestações clínicas, como sintomas de severa inflamação e irritação na mucosa genital, assim como também pode apresentar-se de forma assintomática (PETRIN *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2000; BARRIO *et al.*, 2002). Trata-se de uma doença que ocorre durante a idade reprodutiva, e raramente observam-se manifestações clínicas antes da menarca e após a menopausa (MACIEL *et al.*, 2004, PETRIN *et al.*, 1998).

As mulheres infectadas podem apresentar estágios assintomáticos até vaginites, que são severas inflamações na mucosa da vagina (BARRIO *et al.*, 2002). Sendo assim, as mulheres com vaginite aguda, frequentemente exibem corrimento amarelado, decorrente da infiltração por leucócitos, que pode ser fino e escasso ou espesso e abundante. Outro sintoma específico da tricomoníase é a mulher apresentar a cérvix com aspecto de morango, entretanto é observado apenas em 2 a 5% das mulheres infectadas (LEHKER & ALDERETE, 2000). Na infecção crônica, a mulher apresenta sintomas mais leves, com secreção vaginal escassa (PETRIN *et al.*, 1998).

Nos homens, a doença pode-se manifestar de três maneiras: a forma assintomática, a forma aguda, caracterizado por uretrite purulenta abundante, e

doença assintomática leve, clinicamente indistinguível de outras causas de uretrites (PETRIN *et al.*, 1998).

Este parasita é um dos principais patógenos do homem e da mulher, estando associado a uma série de complicações, como o aumento da transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), causa de baixo peso em bebês, nascimentos prematuros, doença inflamatória pélvica, neoplasia cervical e infertilidade (HEINE & MCGREGOR, 1993; LEHKER & ALDERETE, 2000; MACIEL *et al.*, 2004).

Vários mecanismos podem estar relacionados com o aumento da susceptibilidade ao HIV causada pela presença do *T. vaginalis*, entre elas estão às alterações provocadas pelo processo inflamatório e o comprometimento da resposta imune (THURMAN & DONCEL, 2011; SHAFIR *et al.*, 2009).

O parasita normalmente induz uma resposta imune celular local, de maneira exacerbada levando a inflamação do epitélio vaginal nas mulheres e da uretra nos homens, e também provoca a alteração da flora normal e do pH local, gerando um ambiente favorável para o vírus HIV passar através do epitélio e infectar o sistema imune do hospedeiro (THURMAN & DONCEL, 2011; SHAFIR *et al.*, 2009).

O protozoário *T. vaginalis* facilita a transmissão e/ ou infecção pelo HIV, além de aumentar a replicação local do vírus, favorecendo, assim à penetração do vírus na mucosa, por isso o mesmo tem sido associado ao aumento da transmissão do HIV (KHARSANY, 1993; COHEN *et al.*, 1997; SEBITLOANE, 2005).

Estudos como o de Oliveira *et al.* (2008) descrevem a associação da presença do *T. vaginalis* e o aumento da transmissão do HIV. Neste estudo foi constatado que a prevalência da tricomoníase em mulheres infectadas por HIV varia de 9,5 a 38%, enquanto em mulheres não infectadas esta foi observada em 1,4 a 4,5% (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Entre as doenças sexualmente transmissíveis, a tricomoníase é a de maior prevalência e incidência, desta forma o seu controle pode contribuir consideravelmente com a incidência do HIV (BOWDEN & GARNETT, 1999; SORVILLO *et al.*, 2001).

1.3 Diagnóstico para a tricomoníase humana

A tricomoníase apresenta-se de forma assintomática ou sintomática, sendo assim a realização do diagnóstico somente com bases nas manifestações clínicas

da doença não é seguro, uma vez que os sintomas clínicos podem ser confundidos com os de outras doenças sexualmente transmissíveis. Desta forma a investigação laboratorial torna-se necessária e fundamental para o diagnóstico correto, assim como para o tratamento adequado da tricomoníase (PETRIN *et al.*, 1998; LEHKER & ALDERETE, 2000; MICHEL *et al.*, 2006).

Segundo Fouts e Kraus (1980), se as manifestações clínicas fossem utilizadas isoladamente para o diagnóstico da tricomoníase, 88% das mulheres infectadas não seriam diagnosticadas e 29% das mulheres não infectadas seriam diagnosticadas falsamente como tendo a infecção (FOUTS & KRAUS, 1980).

Diferentes métodos são utilizados para a realização do diagnóstico laboratorial da tricomoníase, entre eles estão os métodos direto a fresco, métodos de coloração como Papanicolau, o método de cultura, métodos imunológicos, como ELISA e também técnicas moleculares de diagnóstico, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (WENDEL *et al.*, 2002; GARBER, 2005; FEITOSA & CONSOLARO, 2005).

O método de diagnóstico mais comumente utilizado é a técnica do exame microscópico a fresco, pois possui uma série de vantagens, entre elas estão à velocidade e a facilidade com que pode ser realizada, uma vez que se o parasita estiver presente os resultados são obtidos no mesmo dia, além de possuir baixo custo (SOPER, 2004).

O método de cultura possui alto grau de sensibilidade e especificidade para diagnóstico de tricomoníase, identifica até 95% das infecções por *T. vaginalis*. Sendo vantajosa, uma vez que para iniciar o crescimento, é necessária apenas uma pequena quantidade do parasita, cerca de 300 a 500 *Trichomonas*/mL de inóculo. Entretanto o tempo de demora de alguns dias para se obter um diagnóstico definitivo apresenta-se como uma desvantagem desta técnica, o que leva a sua não utilização rotineiramente, assim como também o fato das culturas serem mais caras para serem executadas (SOPER, 2004).

A cérvix com aspecto de morango é um sintoma clássico da tricomoníase, mas é observado somente em 2,0% das pacientes, e o corrimento espumoso em apenas 20,0% das mulheres infectadas, o que facilita a tricomoníase ser confundido com outras DST. Desta forma o diagnóstico laboratorial é de extrema importância para permitir o tratamento apropriado e assim o controle desta infecção (FOUTS & KRAUS, 1980; PETRIN *et al.*, 1998).

1.4 Tratamentos para a tricomoníase humana

Atualmente o fármaco de primeira escolha para o tratamento da tricomoníase é o metronidazol (Figura 2), um composto heterocíclico com um grupo nitro como substituinte no carbono 5 do anel imidazol. Pertence à classe dos nitroimidazóis, apresenta espectro de atividade antimicrobiana, abrangendo exclusivamente microrganismos anaeróbios (DRUGBANK3.0, 2014; DRUGS.COM, 2014).

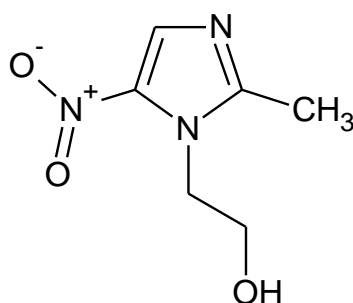


Figura 2: Estrutura química do metronidazol.

O metronidazol é um pró-fármaco, sendo assim convertido em formas citotóxicas *in vivo*, a sua ação tricomonocida envolve a geração de radicais nitro livres, que causam danos no DNA e conseqüentemente leva a morte celular (LLOYD & KRISTENSEN, 1985; CUDMORE *et al.*, 2004; DRUGBANK3.0, 2014).

O parasito *T. vaginalis* possui hidrogenossomos, que são organelas portadoras da enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR), que catalisa a descarboxilação do piruvato à acetil-CoA, tendo como produto final o acetato, a adenosina 5'-trifosfato (ATP) e hidrogênio molecular. A atividade da PFOR está associada à ferredoxina, uma pequena proteína que contém ferro e enxofre, e atua recebendo os elétrons liberados pela enzima PFOR (KERSCHER & OESTERHELT, 1982; LAND & JOHNSON, 1997; PETRIN *et al.*, 1998; KULDA, 1999; DUNNE *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2004).

Em condições normais o piruvato gerado através da glicólise é transportado para o hidrogenossomo e descarboxilado pela PFOR para formar acetil-CoA, e os elétrons derivados da descarboxilação são transferidos para a ferredoxina. Por meio de hidrogenases os pares de elétrons são transferidos para os íons de hidrogênio formando hidrogênio molecular (KULDA, 1999; UPCROFT & UPCROFT, 2001).

O metronidazol penetra na célula através de difusão e é ativado nos hidrogenossomos do *T. vaginalis* (Figura 3) (KERSCHER & OESTERHELT, 1982; PETRIN *et al.*, 1998). A ativação do metronidazol ocorre através da sua redução pela ferredoxina. Assim acontece à transferência de elétrons da ferredoxina para o grupo nitro do metronidazol formando radicais reduzidos, que são quimicamente reativos e citotóxicos, que podem se ligar a macromoléculas intracelulares como DNA e proteínas, causando assim a morte celular (CHAPMAN *et al.*, 1985; LAND & JOHNSON, 1997; KULDA, 1999; UPCROFT & UPCROFT, 2001; MENDZ & MÉGRAUD, 2002; DUNNE *et al.*, 2003; CUDMORE *et al.*, 2004; MACIEL *et al.*, 2004).

Nos hidrogenossomos o metronidazol age como um receptor preferencial de elétrons, competindo eficientemente com a hidrogenase pelos elétrons. Conseqüentemente, a produção de hidrogênio é inibida e o transporte de elétrons mediado pela ferredoxina é direcionado para o fármaco (LAND & JOHNSON, 1997; KULDA, 1999; UPCROFT & UPCROFT, 2001).

Ativação do metronidazol

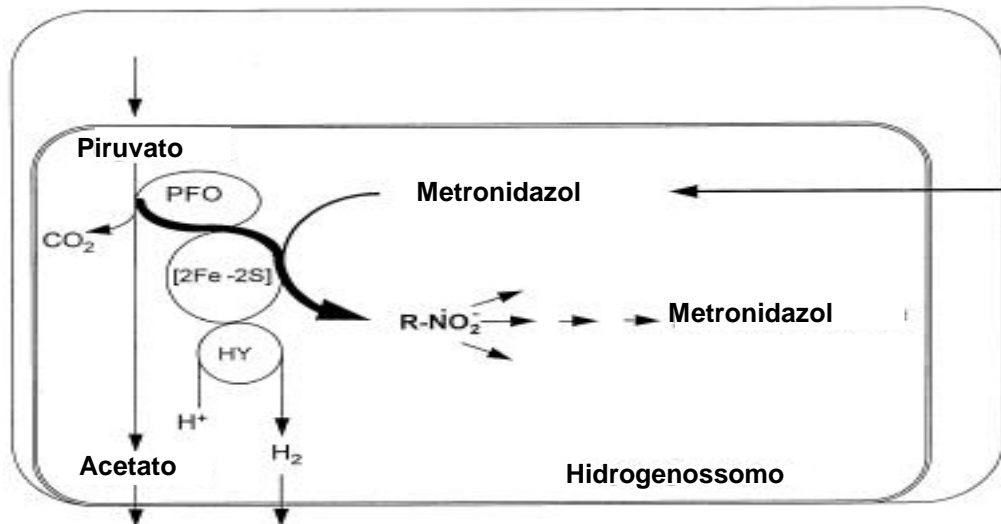


Figura 3: Ativação do metronidazol no hidrogenossomo. Fonte: Adaptado de KULDA, 1999.

Recomenda-se que este fármaco seja administrado por via oral, em dose única de 2g ou em regime de dose de 250 mg duas vezes ao dia durante 10 dias (ANVISA, 2014; CUDMORE *et al.*, 2004). Deve sempre ser administrado na

posologia preconizada, no entanto nas mais baixas doses possíveis, assim como não deve ser utilizado indiscriminadamente (PETRIN *et al.*, 1998).

Devido as suas características o metronidazol é capaz de atravessar a barreira placentária, não sendo indicado para o tratamento de mulheres grávidas que apresentam a tricomoníase, no primeiro trimestre de gestação. Além disso, é considerado segunda linha para o tratamento da tricomoníase durante a última fase da gravidez (LINDMARK & MULLER, 1976; CONNOR *et al.*, 1977; PETRIN *et al.*, 1998; CUDMORE *et al.*, 2004).

Estudos já relataram também que o metronidazol tem efeito mutagênico em bactérias e carcinogênico em camundongos (LINDMARK & MULLER, 1976; CONNER *et al.*, 1977). Diante disso o *Food and Drug Administration* (FDA) passou a classificar o metronidazol como fator de risco classe B para gravidez, devido a um possível risco ao feto, apesar do mesmo ainda não estar confirmado (CUDMORE *et al.*, 2004; DRUGS.COM, 2014).

No Brasil, os medicamentos desenvolvidos a base de metronidazol, atualmente estão sob o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação, a partir da Resolução-RDC N° 20, de 5 de maio de 2011 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Esta legislação visa controlar o uso irracional de antimicrobianos e estabelece os critérios para a prescrição, dispensação, controle, embalagem e rotulagem de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associação, e o metronidazol faz parte desta lista (BRASIL, 2011).

Desde 1962, já se relata a resistência clínica ao metronidazol (ROBINSON, 1962), e com o passar dos anos tem sido descrito um aumento no número de casos de resistência a este fármaco (KULDA, 1999; DUNNE *et al.*, 2000; MERI *et al.*, 2000; CROWELL *et al.*, 2003; CUDMORE *et al.*, 2004). Esta resistência do *T. vaginalis* ao metronidazol pode ser classificada como aeróbia ou anaeróbia (LAND & JOHNSON, 1997; KULDA, 1999; MERI *et al.*, 2000; UPCROFT & UPCROFT, 2000; DUNNE *et al.*, 2003; CUDMORE *et al.*, 2004).

A resistência aeróbia ocorre apenas na presença de alguma concentração intracelular de oxigênio. Acredita-se que vias de remoção de oxigênio, e possivelmente a ferredoxina, estejam envolvidas (QUON *et al.*, 1992; UPCROFT & UPCROFT, 2001; VIDA KOVIC *et al.*, 2003). Desta forma, são propostos alguns

mecanismos de resistência, como uma deficiência na capacidade de eliminação de oxigênio, levando ao aumento da sua concentração intracelular, indicando que o oxigênio intracelular pode interferir com a via de ativação do fármaco, devido à competição do oxigênio com o metronidazol pelos elétrons ligados a ferredoxina (YARLETT *et al.*, 1986; LLOYD *et al.*, 1988).

QUON *et al.* (1992) demonstraram em seu estudo *in vitro* que a transcrição do gene da ferredoxina é reduzida em quatro cepas de *T. vaginalis* aerobiamente resistentes, onde os níveis intracelulares da proteína ferredoxina e do seu RNAm foram reduzidos em cerca de 50% (QUON *et al.*, 1992). Esta redução da transcrição do gene resulta na diminuição dos níveis intracelulares de ferredoxina, e este, por sua vez, pode limitar a capacidade da célula em ativar o metronidazol (QUON *et al.*, 1992; LAND & JOHNSON, 1997; VIDAKOVIC *et al.*, 2003).

Também é sugerida a ocorrência da re-oxidação dos radicais nitro livres ou a remoção competitiva de elétrons pelo oxigênio intracelular (MEINGASSNER *et al.*, 1979).

O desenvolvimento da resistência anaeróbia nos pacientes em tratamento com o metronidazol, ainda é discutido, e muitos estudos propõem que este tipo de resistência possa apenas ser desenvolvida *in vitro* (KULDA, 1999; DUNNE *et al.*, 2003). Entretanto, estudos já descreveram a obtenção de isolados clínicos com resistência anaeróbia de pacientes com tricomoníase em tratamento com o metronidazol (VOOLMANN & BOREHAM, 1993; DUNNE *et al.*, 2003).

Já foi relatada a indução do desenvolvimento da resistência anaeróbia ao metronidazol *in vitro*. Kulda *et al.* (1993) desenvolveram cepas de *T. vaginalis* com resistência anaeróbia ao metronidazol, através do cultivo do parasita em condições anaeróbias, aumentando gradualmente a concentração do fármaco (1 a 100 mg/ml) durante um período de 12 a 21 meses (KULDA *et al.*, 1993). Foi observado que as cepas de *T. vaginalis* com este tipo de resistência apresentam diminuição ou ausência da atividade da enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase (KULDA *et al.*, 1993; LAND & JOHNSON, 1997; DUNNE *et al.*, 2003; CUDMORE *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de resistência pelo parasita leva à necessidade do uso de doses elevadas do metronidazol, aumentando o risco de toxicidade relacionada a este fármaco (PETRIN *et al.*, 1998).

Outro fármaco utilizado no tratamento da tricomoníase é o tinidazol (Figura 4), que é estruturalmente derivado do metronidazol, sendo também um pró-fármaco (FUNG & DOAN, 2005; DRUGBANK3.0, 2014; DRUGS.COM, 2014).

O seu mecanismo de ação, assim como o metronidazol, envolve a geração de radicais nitro citotóxicos, por meio da redução do grupo nitro do fármaco através de sistema transportadores de elétrons mediado por ferredoxina, onde sugere-se que estes radicais tóxicos vão se ligar ao DNA, causando danos que vão resultar na morte celular do parasito (GARDNER & HILL, 2001; FUNG & DOAN, 2005; DRUGBANK3.0, 2014).

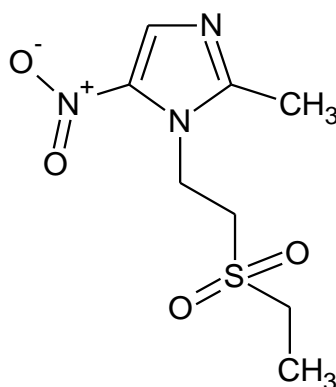


Figura 4: Estrutura química do tinidazol.

O tinidazol e o metronidazol possuem mecanismos de ação semelhantes, o que pode levar a uma resistência cruzada de *T. vaginalis* aos mesmos (NARCISI & SECOR, 1996; CUDMORE *et al.*, 2004; FUNG & DOAN, 2005). Ele vem sendo utilizado nos casos de resistência ao metronidazol, entretanto pode ocorrer o rápido desenvolvimento de resistência ao fármaco (CUDMORE *et al.*, 2004).

A dose recomendada de tinidazol é uma única dose oral de 2g administrada com alimentos. Sendo importante o tratamento simultâneo dos parceiros sexuais, com a mesma dose, uma vez que a tricomoníase é uma doença sexualmente transmissível (DRUGS.COM, 2014).

Em relação ao tratamento de pacientes grávidas, não foi realizado estudo do uso de tinidazol em pacientes grávidas. Entretanto como este fármaco é capaz de atravessar a barreira placentária e alcançar a circulação do feto, o mesmo não deve ser administrado durante o primeiro trimestre de gestação em pacientes grávidas que estejam com a infecção (DRUGS.COM, 2014).

Outros fármacos que também são utilizados no tratamento da tricomoníase são: o ornidazol, nimorazol, carnidazol, secnidazol e flunidazol (PETRIN *et al.*, 1998).

1.5 A nucleosídeo hidrolase como um alvo terapêutico em tricomoníase

As graves complicações da tricomoníase, a frequência da infecção na gravidez, o aparente desenvolvimento de resistência pelo parasita aos fármacos utilizados e o risco de toxicidade do metronidazol relacionado ao seu uso em doses elevadas, traduzem a necessidade da busca por novos alvos moleculares, sendo de extrema importância para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento desta doença (HEINE & MCGREGOR, 1993; PETRIN *et al.*, 1998; BOWDEN e GARNETT, 1999; KULDA, 1999; DUNNE *et al.*, 2000; LEHKER & ALDERETE, 2000; MERI *et al.*, 2000; CROWELL *et al.*, 2003; CUDMORE *et al.*, 2004; MACIEL *et al.*, 2004).

O protozoário *T. vaginalis* assim como outros parasitas, não possui a via biossintética *de novo* de purinas, e por isso dependem exclusivamente da captação de purinas do seu hospedeiro para a síntese de seu DNA e RNA (MILLER & LINDSTEAD, 1983; WANG & CHENG, 1984).

Dentro deste contexto encontra-se a nucleosídeo hidrolase (NH), uma enzima chave na rota de captação de purinas (BERENS *et al.*, 1995), altamente distribuída na natureza, presente em bactérias (PETERSEN & MOLLER, 2001; OGAWA *et al.*, 2001) leveduras (KURTZ *et al.*, 2002), insetos (RIBEIRO & VALENZUELA, 2003), mesozoários (VERSÉES *et al.*, 2003) e protozoários (HAMMOND & GUTTERIDGE, 1984; PELLÉ *et al.*, 1998; CUI *et al.*, 2001), como o *T. vaginalis* (MILLER & LINDSTEAD, 1983).

Entretanto a atividade da nucleosídeo hidrolase não foi detectada em mamíferos, pois estes possuem uma alternativa para a geração das nucleobases purínicas e pirimidínicas através do uso de outras enzimas (MITTERBAUER *et al.*, 2002). O que a torna um excelente alvo molecular para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos.

As nucleosídeos hidrolases ou nucleosídeos *N*-ribohidrolases compreendem uma superfamília de metaloproteínas, estruturalmente relacionadas com uma topologia única de folhas- β (MURZIN *et al.*, 1995; ORENGO *et al.*, 1997). Estas enzimas são glicosidases que quebram a ligação *N*-glicosídica de β -

ribonucleosídeos liberando a ribose e a sua respectiva base nitrogenada (HAMMOND & GUTTERIDGE, 1984; VERSÉES & STEYAERT, 2003).

Todos os membros desta família de proteínas caracterizados até o momento possuem uma rigorosa especificidade pela porção ribose, do nucleosídeo, mas apresentam uma variabilidade em suas preferências pela natureza da base nucléica (VERSÉES & STEYAERT, 2003).

Estas enzimas podem ser classificadas pela especificidade em relação aos substratos que hidrolisam, como: bases não-específicas inosina-uridina nucleosídeo hidrolase (IU-NH) (PARKIN *et al.*, 1991; SHI *et al.*, 1999), purina-específica inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase (IAG-NH) (PARKIN, 1996; VERSÉES *et al.*, 2001) e inosina-guanosina nucleosídeo hidrolase (IG-NH) (ESTUPIÑÁN & SCHRAMM, 1994). Dados recentes indicam que esta classificação é um tanto inadequada, e algumas NH não se enquadram em nenhum desses três grupos (PETERSEN & MOLLER, 2001; VERSÉES & STEYAERT, 2003; MITTERBAUER *et al.*, 2002).

Diante disto, já foi proposto que as NH podem ser agrupadas segundo a homologia entre as sequências de aminoácidos, em função da presença de determinados resíduos de aminoácidos no sítio ativo, em: grupo I, que são aquelas que apresentam a histidina conservada no interior da cavidade do sítio, em grupo II, no qual a histidina é substituída pelo triptofano e em grupo III, onde a histidina é substituída por outro resíduo de aminoácido (GIABBAI & DEGANNO, 2004).

Algumas estruturas de NH foram cristalizadas com o substrato ou inibidor por meio de cristalografia de raios X. As subunidades estruturais das NH são bastante variáveis, a IU-NH de *Crithidia fasciculata* e *Leishmania major* são homotetrâmeros, a IG-NH de *C. fasciculata* é um homotrímero, a IAG-NH de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma brucei brucei* trata-se de um homodímero (PARKIN *et al.*, 1991; SHI *et al.*, 1999; ESTUPIÑÁN & SCHRAMM, 1994; VERSÉES *et al.*, 2001; PARKIN, 1996).

A inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de *Crithidia fasciculata* (IU-CfNH) foi obtida co-cristalizada com o inibidor *p*-aminofeniliminoribitol (*p*APIR) (DEGANNO *et al.*, 1996).

A estrutura tridimensional de IU-CfNH é caracterizada como um homotetrâmero, apresentando uma estrutura α e β composta de uma mistura de oito fitas rodeadas por seis α -hélices e um pequeno lóbulo na porção C-terminal,

composto de quatro α -hélices e duas pequenas fitas β antiparalelas envolvidas em contatos intermoleculares (DEGANO *et al.*, 1996).

A cavidade do sítio ativo é formada por resíduos das fitas β 1, β 2, β 4 e β 5, pelas hélices α 2 e α 9 e também pelas cadeias laterais dos resíduos: Leu13, Asn39, Phe167, Asn168, Ile171, Tir224, Ile228, Tir229 e His241 (DEGANO *et al.*, 1996). Cada subunidade da estrutura da IU-C β NH é funcional, possuindo um sítio ativo estreito e profundo com o íon Ca^{2+} fortemente ligado no fundo da cavidade do sítio ativo (DEGANO *et al.*, 1998).

Este cátion é octa-coordenado por uma rede de interações envolvendo os oxigênios da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos Asp10, Asp15 e Asp242 e com o oxigênio da carbonila da Thr126, e mais três moléculas de água, quando na ausência de um ligante. Com a formação do complexo enzima-substrato, as duas moléculas de água são substituídas pelas hidroxilas dos carbonos C2' e C3' do anel ribose do substrato (DEGANO *et al.*, 1996; DEGANO *et al.*, 1998; VERSÉES & STEYAERT, 2003).

Com base na sua localização no sítio catalítico, propõe-se que o resíduo His241 faça a protonação do N7 da base purínica, etapa que antecede a formação do estado de transição. Desta forma este resíduo seria um doador de prótons, que facilitaria a quebra da base purínica. A importância da presença do resíduo His241 para a manutenção da atividade catalítica da enzima, já foi estudada por Gopaul *et al.* (1996) que realizaram uma mutação sítio dirigida His241Ala, e observaram que a mesma diminuiu de forma significativa a taxa de hidrólise da inosina pela IU-NH de *C. fasciculata* (GOPAUL *et al.*, 1996).

Outra nucleosídeo hidrolase identificada foi a inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase de *Trypanosoma vivax* (IAG-TvNH), em complexo com a 3-deaza adenosina. Estruturalmente é formada por um homodímero, contendo assim dois sítios ativos, localizados um em cada dímero, que são estruturalmente indistinguíveis. Os sítios ativos estão localizados na extremidade C-terminal da proteína e no meio de oito fitas β (VERSÉES *et al.*, 2001).

A abertura do sítio ativo da purina-específica IAG-TvNH é formada pelas fitas β 1, β 2, β 4 e β 5 e pelas hélices α 1, α 3, α 10 e a α 11. Assim como nas nucleosídeos não-específicas, o íon Ca^{2+} também é encontrado no fundo da cavidade do sítio ativo da IAG-TvNH, octa-coordenado por uma rede de interações com os grupos

carboxilas dos resíduos Asp15, Asp10 e Asp261 e com o oxigênio da carbonila da Thr137. Da mesma forma que na IU-C β NH as outras três coordenações do cálcio, na ausência de um ligante encontram-se ocupadas por três moléculas de água (VERSÉES *et al.*, 2001).

A hidroxila do carbono C5' do anel ribose interage com Asn173 e Glu184, enquanto a Asn186 e o Asp261 interagem com o hidrogênio do grupo hidroxila do C3' do anel ribose (VERSÉES *et al.*, 2001).

O ácido aspártico (Asp40) está localizado a 3.5Å do átomo de N-9, estando assim localizado de forma apropriada para protonar o N-9 da base purínica, formando o grupo de saída. O Trp260, juntamente com Trp83, interage com a base purínica através de uma interação do tipo π - π stacking (VERSÉES *et al.*, 2001).

A rigorosa especificidade das NH pela ribose é estabelecida através de uma conservada rede de interações que envolvem as hidroxilas do C2', C3' e C5' da ribose e os resíduos que são conservados nos diferentes grupos de NHs, no caso de IAG-T β NH são Asp14, Asn173, Glu184, Asn186 e Asp261 e o íon Ca²⁺, para IU-C β NH Asp14, Asn160, Glu166, Asn168 e Asp242 e o íon Ca²⁺ (VERSÉES & STEYAERT, 2003).

1.6 Potenciais inibidores para a enzima nucleosídeo hidrolase

A nucleosídeo hidrolase é a enzima chave na rota de captação de purinas para *T. vaginalis*, e para diversos outros protozoários parasitas, logo a inibição desta enzima interrompe esta via de recuperação de purinas do parasita, causando conseqüentemente a sua morte. Por isso, as NH têm sido extensivamente estudadas como potencial alvo para o desenvolvimento de candidatos a fármacos (MILLER & LINDSTEAD, 1983; HAMMOND & GUTTERIDGE, 1984; PELLÉ *et al.*, 1998).

Diante disso, nos últimos anos diversos inibidores de NH foram e vêm sendo sintetizados com o objetivo de se alcançar o planejamento de novos candidatos a fármacos para o tratamento de diversas doenças (EVANS *et al.*, 2003; FURNEAUX *et al.*, 1999; HORENSTEIN *et al.*, 1993; BOUTELLIÉ *et al.*, 1994).

Furieux *et al.* (1999) obtiveram promissores inibidores de nucleosídeo hidrolase, derivados da estrutura 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol. Alguns destes análogos de iminoribitol substituídos são: Immucillin-H, Immucillin-A, Immucillin-

ACAP e os DADMe-immucillins ou 2'-dideoxi-ribonucleosídeos (DADMe-ImmucillinA, DADMe-ImmucilinH) (Figura 5) (FURNEAUX *et al.*, 1999).

Esses análogos de iminoribitol vêm sendo sintetizados, e já foram testados experimentalmente em IU-NH de *Crithidia fasciculata* e em IAG-NH de *T. vivax* e de *Trypanosoma brucei brucei* alguns apresentaram bons valores de constante de inibição (MILES *et al.*, 1999; VERSÉES *et al.*, 2006).

O Immucillin-H, o Immucillin-A e o Immucillin-ACAP mostraram-se bons inibidores diante dos resultados apresentados frente às NHs testadas experimentalmente, entre eles pode-se destacar o immucillin-A que apresentou constante de inibição de 0,9 nM para IAG-NH de *T. brucei. brucei* (EVANS *et al.*, 2003, VERSSÉS *et al.*, 2006).

Entretanto os DADMe-immucillins ou 2'-dideoxi-ribonucleosídeos (DADMe-ImmA, DADMe-ImmH) não se mostraram bons inibidores, o que pode ser justificado pelo fato destas não possuírem a hidroxila no carbono 2' do anel iminoribitol, uma vez que estas são fundamentais para o mecanismo catalítico da enzima, pois mantém uma conservada rede de interações que envolvem as hidroxilas do C2', C3' e C5' da ribose e os resíduos de aminoácidos que são conservados nos diferentes grupos de NH (VERSÉES *et al.*, 2006).

O *p*-aminofeniliminoribitol ou *p*APIR (Figura 5-F) também é um inibidor derivado da estrutura de 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol, que foi co-cristalizado na inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de *Crithidia fasciculata*. Foi testado experimentalmente apresentando constante de inibição de 30 nM (PARKIN *et al.*, 1991).

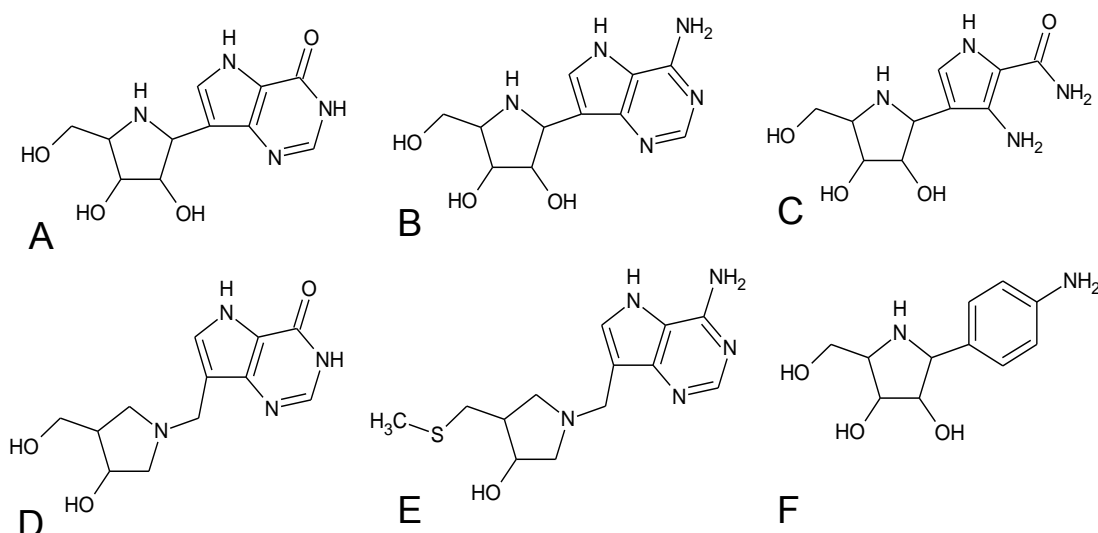


Figura 5: Inibidores de nucleosídeo hidrolase derivados da estrutura 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol. (A) Immucillin-H, (B) Immucillin-A, (C) Immucillin-ACAP, (D) DADMe-ImmucillinH, (E) DADMe-ImmucillinA, (F) *p*APIR (PARKIN *et al.*, 1991; FURNEAUX *et al.*, 1999)

Inibidores promissores também são os derivados da riboamidrazona (Figura 6-A) obtida por Boutellier *et al.* (1994), sendo que o análogo substituído, *p*-nitrofenilriboamidrazona (Figura 6-B) apresentou constante de dissociação em torno de 2nM (BOUTELLIER *et al.*, 1994).

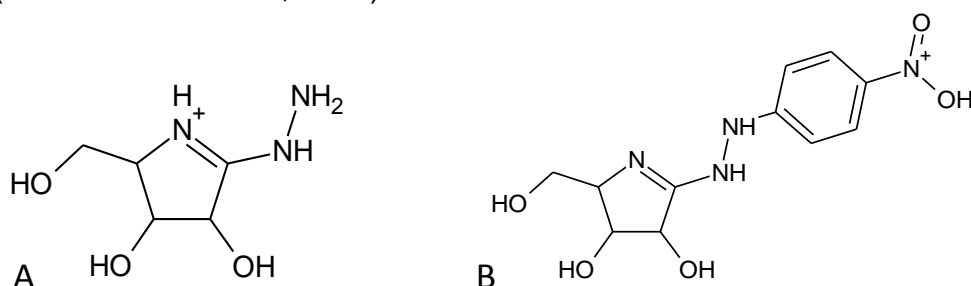


Figura 6: Inibidores de nucleosídeo hidrolase. (A) Ribamidrazona, (B) *p*-nitrofenilriboamidrazona (BOUTELLIER *et al.*, 1994).

Recentemente, Rennó *et al.* (2012), testaram a atividade inibitória de dois análogos de nucleosídeos para esta enzima. Estes compostos apresentaram afinidade com a enzima com valores de K_i de 1.6 ± 0.2 e 17.0 ± 2.1 μM , respectivamente, bem como 271 e 26 vezes com afinidade mais alta do que o substrato inosina. O tipo de inibição foi determinada como sendo competitiva e os parâmetros da inibição foram obtidos a partir de Lineweaver-Burk. Adicionalmente, foram realizados estudos de *docking* molecular, demonstrando os possíveis modos de ligação destes protótipos inibidores no sítio ativo da enzima revelando resíduos de aminoácidos essenciais para a inibição destes ligantes (RENNÓ *et al.*, 2012).

2 Justificativa

Nos últimos anos houve um enorme aumento na compreensão da bioquímica e biologia molecular e celular dos patógenos responsáveis por importantes doenças parasitárias, com a atenção centrada na caracterização dos caminhos metabólitos e estruturas celulares que diferem o parasita do hospedeiro (HAMMOND & GUTTERIDGE, 1984; BERENS *et al.*, 1995; SHI *et al.*, 1999).

O *Trichomonas vaginalis* é um protozoário parasita causador da tricomoníase, que é a doença sexualmente transmissível mais comum no mundo (PETRIN *et al.*, 1998; SWYGARD *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2011; OMS, 2011). Além disso, esta parasitose está associada a diversas complicações de saúde (HEINE & MCGREGOR, 1993; LEHKER & ALDERETE, 2000; MACIEL *et al.*, 2004).

Atualmente o fármaco de escolha para o tratamento da tricomoníase é o metronidazol, que deve ser administrado de acordo com a posologia preconizada, no entanto nas mais baixas doses possíveis (PETRIN *et al.*, 1998; DRUGBANK3.0, 2013; DRUGS.COM, 2013). Todavia, tem sido relatado o aumento do número de casos de resistência ao metronidazol, o que leva a necessidade do uso de doses elevadas, aumentando o risco de toxicidade relacionada a este fármaco, traduzindo-se na necessidade da busca por novos alvos moleculares para o tratamento desta doença (HEINE & MCGREGOR, 1993; PETRIN *et al.*, 1998; BOWDEN e GARNETT, 1999; KULDA, 1999; DUNNE *et al.*, 2000; LEHKER & ALDERETE, 2000; MERI *et al.*, 2000; CROWELL *et al.*, 2003; CUDMORE *et al.*, 2004; MACIEL *et al.*, 2004).

O *T. vaginalis* assim como outros parasitas, não possui a via biossintética *de novo* de purinas, e por isso dependem da captação de purinas do hospedeiro para a síntese de seu DNA e RNA (MILLER & LINDSTEAD, 1983; WANG & CHENG, 1984). Diante disso, como a nucleosídeo hidrolase é uma importante enzima do ciclo de vida do parasito, e encontra-se presente neste protozoário e ausente em mamíferos, o que a torna um excelente alvo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (BERENS *et al.*, 1995; MILLER & LINDSTEAD, 1983; MITTERBAUER *et al.*, 2002).

Como não há descrito na literatura a estrutura tridimensional (3D) desta enzima, a construção do modelo tridimensional por modelagem comparativa torna-se essencial para possibilitar o entendimento das interações, visando explorar e propor novos agentes para a quimioterapia antiparasitária para *T. vaginalis*.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar por modelagem molecular a enzima nucleosídeo hidrolase como alvo para a quimioterapia da tricomoníase humana e seus substratos e potenciais inibidores.

3.2 Objetivos específicos

Realizar a construção e a validação do modelo tridimensional, por modelagem comparativa, da enzima NH de *T. vaginalis* (*TvgNH*);

Avaliar o modo de ligação e interações a partir do modelo tridimensional, da enzima construída, com os substratos conhecidos das NH encontradas em outros organismos;

Analisar as propriedades físico-químicas dos diferentes resíduos de aminoácidos do sítio ativo desta enzima comparando com as outras NH;

Realizar o estudo das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade “*in silico*” de potenciais inibidores de NH descritos na literatura;

Realizar estudos por *docking* molecular para estudar as interações entre a macromolécula, e os potenciais inibidores.

4 Metodologia

4.1 Modelagem comparativa

Primeiramente foi feita uma busca no Protein Data Bank (PDB) para verificar se a estrutura tridimensional da NH de *T. vaginalis* já havia sido elucidada, assim foi observado que a mesma não estava disponível no PDB, portanto não possui sua estrutura 3D elucidada. Desta forma, foi realizada a construção do modelo tridimensional desta enzima utilizando a técnica de modelagem comparativa.

Para a construção do modelo foi feita a busca da sequência de aminoácidos (FASTA) da NH de *T. vaginalis* no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Em seguida foi feita a busca de proteínas moldes, com base na similaridade da sequência de aminoácidos e na semelhança funcional, para que se identificasse qual seria utilizada como molde para a construção do modelo, utilizando o servidor

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), que realiza o alinhamento entre a sequência alvo e sequências depositadas no banco de dados de proteínas (PDB).

Assim foram construídos dois modelos da enzima *TvgNH*, o primeiro com base no alinhamento simples entre a sequência da NH de *Leishmania major* e a de *T. vaginalis* e o segundo com base no alinhamento múltiplo entre a sequência de NH de *T. vaginalis* e a de outros microrganismos.

Foram construídos dois modelos, pois se tem descrito na literatura, que o alinhamento múltiplo é considerado como sendo mais confiável que o alinhamento simples, uma vez que o mesmo permite identificar com facilidade as características estruturais semelhantes entre proteínas homólogas. Sendo assim, quando se há dúvidas em relação ao alinhamento recomenda-se a construção de mais de um modelo para se escolher o mais satisfatório, uma vez que existe uma facilidade em se analisar a estrutura tridimensional do modelo construído em relação ao alinhamento de sequências (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003).

O molde selecionado para a construção do modelo com base no alinhamento simples foi à estrutura cristalográfica da enzima NH de *Leishmania major* disponível sobre o código PDB 1EZR. Após a seleção do molde, foi realizado um alinhamento, entre a sequência de aminoácidos do modelo e a do molde escolhido (1EZR), utilizando o servidor ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Para construção do segundo modelo de *TvgNH* o molde selecionado foi a estrutura cristalográfica da enzima NH de *Crithidia fasciculata* disponível pelo código PDB 2MAS. Também se utilizou o servidor ClustalW para a realizar um alinhamento múltiplo das sequências primárias da enzima NH de *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Bacillus anthracis* e *Crithidia fasciculata*, e a sequência primária da NH de *T. vaginalis*.

Para predição da estrutura secundária do modelo e do molde selecionado para a construção dos dois modelos de *TvgNH* foi utilizado o servidor JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>).

A partir dos alinhamentos realizados a estrutura tridimensional do primeiro modelo foi construída pelo modo automático disponível no servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>). E o segundo modelo foi construído pelo modo alinhamento disponível no servidor Swiss-Model.

Após a construção dos modelos foi feita a otimização da sua geometria, no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0, com o objetivo de minimizar contatos desfavoráveis entre os resíduos de aminoácido.

A validação dos modelos foi realizada utilizando o servidor PROCHECK (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) onde através da obtenção do gráfico de Ramachandran é possível realizar a avaliação da qualidade estereoquímica do modelo, também se utilizou o Verify3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/). A partir deste programa foi realizada a análise individual de cada resíduo, verificando-se o ambiente em torno de cada resíduo.

E por último realizou-se a análise do Score-Z e do gráfico de energia obtido pelo programa ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), que permite realizar a avaliação da energia de interação entre os resíduos de aminoácidos.

A análise dos resíduos de aminoácidos dos modelos, da estrutura secundária, assim como a determinação do sítio ativo foi realizada no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0.

A nucleosídeo hidrolase, é uma metaloproteína, desta forma a estrutura tridimensional do molde selecionado possui em seu sítio ativo um átomo de cálcio, que é imprescindível para a atividade catalítica desta enzima. Sendo necessário fazer o posicionamento do cálcio no sítio ativo dos modelos construídos, para isso foi realizado o *docking* manual do cálcio também no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0.

Foram realizados estudos físico-químicos *in silico* dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo que não são equivalentes, para avaliarmos se estas diferenças podem ser significativas para a atividade da enzima.

4.2 Potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos para o planejamento e síntese de inibidores de nucleosídeo hidrolase, assim através de busca bibliográfica nas bases de dados, foram selecionados potenciais inibidores de NH descritos na literatura.

Foram escolhidos na literatura inibidores testados experimentalmente nas enzimas NH de *C. fasciculata*, de *T. b. brucei*, de *L. major* e de *T. vivax*, (PARKIN *et al.*, 1997; MILES *et al.*, 1999; VERSÉES *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 1999)

4.3 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade “*in silico*”.

O programa *Osiris Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) foi utilizado para realizar cálculos de toxicidade *in silico*, *druglikeness* e *drug-score* dos potenciais inibidores selecionados.

O cálculo da toxicidade *in silico* avalia a presença de grupos com alerta de risco na molécula, ou seja, grupos que possam ter atividade mutagênica, tumorigênica, irritante ou ter efeitos sobre a reprodução (SANDER, 2001).

O processo de predição conta com uma base pré-calculada de fragmentos estruturais que se estiverem presentes na estrutura originam alertas toxicológicos, e a frequência com que estes fragmentos aparecem são comparados com a presença destes em fármacos comerciais. Assim qualquer fragmento encontrado com alta frequência no banco de fármacos comerciais é considerado como não-tóxico, entretanto, o fato de ser encontrado frequentemente no banco de compostos químicos, pode ser considerado como um fator de risco (SANDER, 2001).

Esta toxicidade *in silico* de um composto pode ser avaliada em 3 diferentes níveis: baixo risco igual a 1, médio risco igual a 2 e alto risco igual a 3 (SANDER, 2001).

O perfil *druglikeness* é o cálculo da semelhança da molécula com fármacos que já se encontram no mercado farmacêutico, feito com base em um banco de dados de fármacos comerciais, além de relacionar com propriedades como cLogP, peso molecular, e também em dados estruturais, enquanto o potencial *drug-score* fornece uma pontuação de 0-1 para predizer o potencial de uma molécula se tornar um fármaco (SANDER, 2001).

Os potenciais inibidores de NH disponíveis na literatura também foram analisados de acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski. Esta avalia o potencial de compostos apresentarem uma boa biodisponibilidade oral, sendo este um importante atributo para os novos candidatos a fármacos.

Desta forma, para um composto apresentar boa absorção oral este deve obedecer, ao menos três das regras a seguir: (1) apresentar massa molecular ≤ 500 Da; (2) número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; (3) número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (grupos OH ou NH) ≤ 5 ; (4) Log do coeficiente de partição óleo/água (cLog P) ≤ 5 , (LIPINSKI *et al.*, 2001). Para a

realização desta predição, utilizou-se o programa Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

4.4 Estudos de *docking* molecular

4.4.1 Estudos de *docking* molecular de substratos e potenciais inibidores da enzima nucleosídeo hidrolase de *T. vaginalis*

Os estudos de *docking* molecular de substratos de NH foram realizados a fim de determinar as possíveis interações para predizer a especificidade de substrato da NH de *T. vaginalis*, construída a partir de um molde, por modelagem por homologia.

Para o estabelecimento dos parâmetros dos estudos de *docking* molecular foi realizado o *redocking* molecular, que é uma metodologia que visa recuperar a posição original de um ligante presente em uma estrutura cristalográfica de um complexo proteína-ligante, sendo utilizada como forma de validação do *docking* molecular.

Os programas AutoDock 4.2 e AutoDock Tools versão 1.5.4 foram utilizados para realização do *redocking* molecular (MORRIS *et. al.*, 2009; SANNER, 1999).

Como os arquivos de macromoléculas vêm em formato pdb, e normalmente, não possuem hidrogênios, realiza-se o preparo da proteína através da adição de hidrogênios polares e cargas Gasteiger, obtendo-se assim o arquivo final com a extensão .pdbqt.

O ligante também foi preparado, através da adição de cargas e do cálculo do número de ligações rotavéis, obtendo-se o arquivo final com a extensão .pdbqt

Para a realização de tal método é necessário à determinação do mapa de grade que foi calculado pelo *Autogrid4*. Este mapa de grade ou *Grid* consiste em uma caixa com três dimensões com espaçamentos de 0,375 Å entre cada ponto da caixa, no qual as dimensões são determinadas a fim de delimitar a interação do ligante com o sítio de ligação, podendo assim reproduzir a estrutura do complexo proteína-ligante depositado no banco de dados de proteínas (PDB).

Os parâmetros foram utilizados para realizar o *redocking* molecular do *p*-aminofenilminoribitol (*p*APIR) na estrutura cristalográfica da IU-NH de *Crithidia fasciculata*, o Grid (caixa) determinado possui as dimensões de 59 x 62 x 59 pontos e distância entre os pontos de 0,375 Å, e foi centralizado no átomo de hidrogênio (HD1) da histidina 241.

Estes mesmos parâmetros utilizados para a IU-C¹NH, também foram utilizados para realizar o *redocking* molecular do inibidor Immucillin-H na estrutura cristalográfica da IAG-NH de *T. vivax*, entretanto foi centralizado no átomo de carbono (CD2) do triptofano 260.

Após foram ajustados os parâmetros para o cálculo do *docking* pelo Autodock 4.2 onde foram pedidas 50 poses (runs), utilizou-se o algoritmo genético Lamarckiano e os demais parâmetros foram os padrões do programa.

Posteriormente ao cálculo foi obtido um gráfico de distribuição das poses em agrupamentos (“clusters”) cluster, no qual cada coluna indica o número de poses obtidas com o RMS menor que 2.0 Å, sendo que as poses são agrupadas de acordo com a semelhança entre elas.

Assim após o *redocking*, foi realizado o *docking* molecular dos substratos naturais da NH e de um substrato sintético, no modelo de *TvgNH* construído, na IU-C¹NH e na IAG-T¹NH. Para que assim através dos resultados obtidos, fosse possível propor a especificidade de substrato por meio da comparação com resultados experimentais já descritos na literatura.

Para a IU-C¹NH e a IAG-T¹NH, foram utilizados os mesmos parâmetros do *redocking*, e para o modelo construído as dimensões da caixa também foram 59 x 62 x 59, sendo centralizado no átomo de hidrogênio (HE) da histidina 86.

Vale ressaltar que a codificação HD1, CD2 e HE referem-se a posição do átomo na estrutura química do resíduo do aminoácido descrito.

Também foram realizados estudos de *docking* molecular com os potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase descritos na literatura, no modelo construído de NH de *T. vaginalis*, utilizando os parâmetros estabelecidos anteriormente.

Para realização dos estudos de *docking* molecular, as estruturas dos substratos e dos potenciais inibidores foram construídas e minimizadas no programa Spartan¹⁰.

O critério utilizado para avaliação e análise dos resultados obtidos, foi a distâncias das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio, e o número de interações entre o substrato, os inibidores e o sítio ativo da enzima. Utilizando os programas Autodok Tools, Swiss PDB-Viewer versão 4.1.0 e o PDBsum Generate (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>)

5 Resultados e Discussão

5.1 Modelagem comparativa

O conhecimento da estrutura terciária das proteínas é um ponto importante para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, uma vez que as proteínas, por muitas vezes, são alvos terapêuticos, por isso o conhecimento de sua estrutura permite conhecer as possíveis interações entre o fármaco (ligante) e a proteína (macromolécula).

Desta forma com o objetivo de construir um modelo da estrutura tridimensional da enzima *TvgNH*, foi utilizado o servidor SWISS-MODEL para comparar as sequências de aminoácidos do alvo molecular com sequências de estruturas 3D de proteínas que serão usadas como molde. A estrutura selecionada como molde para modelar a *TvgNH*, foi a estrutura tridimensional da enzima NH de *Leishmania major* (*LmNH*), que está disponível sobre o código PDB 1EZR, no banco de dados do *Protein Data Bank*, e o resultado mostrou 32% de identidade e 52% de similaridade.

Foi realizado no programa ClustalW, o alinhamento entre a sequência primária de aminoácidos da proteína alvo, *TvgNH*, e a sequência de aminoácidos do molde (1EZR) (Figura 7).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Modelo MSTPKKLWIDTDCGIDDSTAILLICLACFDYEVVGISCLGGNASLANVHVNVNRTLKVVGH 60
Molde  --MFRKIILCDPGIDDVAIFLAHGNPEIELLAITTVVGNQSLKQVTONARLVADVAG- 57
      *: *: * * *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
      *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

Modelo GAEKI FVYAGCADA LVVKQMHA PT IHGK DGLGDI DDSVFDYDLNDTVQTEHAVNALIN-- 118
Molde  -IVGV PVAAGCTKP LV RGV RNA SH IHGET GMGNVS---Y PPEFKTKLDGRHAVOLI IDLI 113
      **: **: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
      *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

Modelo AANTI PDLTLLTLG PLTNIAIAFRMNFVAMNKLKEIWMGGTSDHVGNC TKWAEFNIRAD 178
Molde  MSHEPKTII TLVPTGGLTNIAIAVRLEPRIVDRVKEVVL MGG-GYHTGNASPVAEFNVFID 172
      ::  *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
      *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

Modelo PEEAQAI FRDYD NSKITIISWILTQMNRLKPEVTRLTGREDTIIAKWMHHTWATMIKFC 238
Molde  PEEAHIVFNE SWN--VTMVGLDLT H LALATP-AVQKRVRV EGT KPAAFMLQILD F YTKVY 229
      ****: *: *: * *: *: . ****: . * * : . . *. * * : *
      *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

Modelo AKTVNDGTIATADPVA AFCMCYADKGVKKWERFKVNVV L HGEQIG-----MIDAVDPDN 292
Molde  EKEHD TYGKVHDP CAVVAVI---DPTVM TTERV PVDIELNGAL TGM TVADFRYPRPKNC 286
      * : . . . *: *: : * * . ** . *: *: *
      * : . . . *: *: : * * . ** . *: *: *

Modelo GIRYAMEIDHEMYLQTLDNLMADH---- 316
Molde  RIQVA VKLDFDKFWCLVIDALERIGDPQ 314
      : ****: *: : : : :
  
```

Figura 7: Alinhamento entre as sequências do molde (NH de *L. major* Código PDB 1EZR) e do modelo de (NH de *T. vaginalis*). Marcado em amarelo os resíduos de aminoácidos que são idênticos nas duas sequências (32%).

Para a predição da estrutura secundária, as estruturas primárias da NH de *T. vaginalis* e do molde *L. major* foram submetidas ao servidor JPRED sendo possível perceber que a estrutura secundária, de maneira geral está conservada (Figura 8).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Modelo MSTPKKLWIDTDCGIDDSTAILLICLACPDYEVVGISCLGGNASLANVVHNVNRTLKVWGH 60
Molde  --MPRKTIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEIELLAITVVGNQSLEKVTQARLIVADVAG- 57
      *::: * * *****:****: . * : *:::* : ** ** :*:.. . * *

Modelo GAEKI PVYAGCADALVVKQMHAPT IHGKDGLGDIDDSVFDYDLNDTVQTEHAVNALIN-- 118
Molde  -IVGVPVAAGCTKPLVRGVRNASHIHGETGMGNVS---YPFFKTKLDGRHAVQLIIDLI 113
      **: **:::..** :*. ****: *:::.. : ::: ::: :****: **:

Modelo AANTI PDLTLLLTLGPLTNI AIAFRMNFVAMNKLKEIWVMGGTSDHVGNCTKWAEFNIRAD 178
Molde  MSHEPKTITLVPTGGLTNI AMAVRLEPRIVDRVKEVVMGG-GYHTGNASPVAEFNV ID 172
      :: :***: . * *****:*:*:* :::***: *** . *.*: : ****: *

Modelo PEAAQAIFRDYNSKITISSWTLQMNRLKPNEVTRLTGREDTIAKWMHHTWATMIKFC 238
Molde  PEAAHIVFNESWN--VIMVGLDLTHLALATP-AVQKRVREVGTKPAAFMLQILDFYTKVY 229
      ****: :*: . * :*: . **:: . * * : . . . * . * : *

Modelo AKTVNDGTIATADPVAAFCMCYADKGVKKWERFKVNVLHGEQIG-----MTDAVPDPN 292
Molde  EKEHDYGKVHDPCAVAYVI---DPTVMTTERVPVDIELNGALTTGMTVADFRYPRPKNC 286
      * : . .*: : * * . ** . *:: ** : : . *

Modelo GIRYAMEIDHEMYLOTLDNIMADH---- 316
Molde  RTQVAVKLDFDKFWCLVIDALERIGDPQ 314
      : *::*:..: : : :

```

Figura 8: Alinhamento entre a sequência primária do modelo de *Tvg*NH e do molde de *Lm*NH (Código PDB 1EZR). Marcado em vermelho as regiões de α -hélice, em verde as folhas- β e em azul as alças.

O modelo de *Tvg*NH foi construído pelo modo automático disponível no servidor SWISS-MODEL. Para a avaliação da qualidade do modelo construído, foi realizada a otimização do mesmo, através de minimizações, para assim melhorar a geometria da molécula, diminuindo a sua energia. Para isso então, o modelo foi submetido a três etapas de otimização da geometria utilizando o programa Swiss Pdb Viewer versão 4.1.0.

As minimizações realizadas foram avaliadas através do gráfico de Ramachandran obtido no PROCHECK, sendo possível perceber que a terceira minimização do modelo obtido foi a que apresentou a melhor estereoquímica, uma vez que apresentou 82,1% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis, 14,2% em regiões permitidas, e apenas 0,7% em regiões desfavoráveis (representando dois resíduos de aminoácidos Ala 62 e Thr246). Estes resíduos não fazem parte do sítio ativo proposto para o modelo de *Tvg*NH. E estes valores obtidos foram semelhantes aos resultados obtidos para o molde (1EZR) (Figura 9).

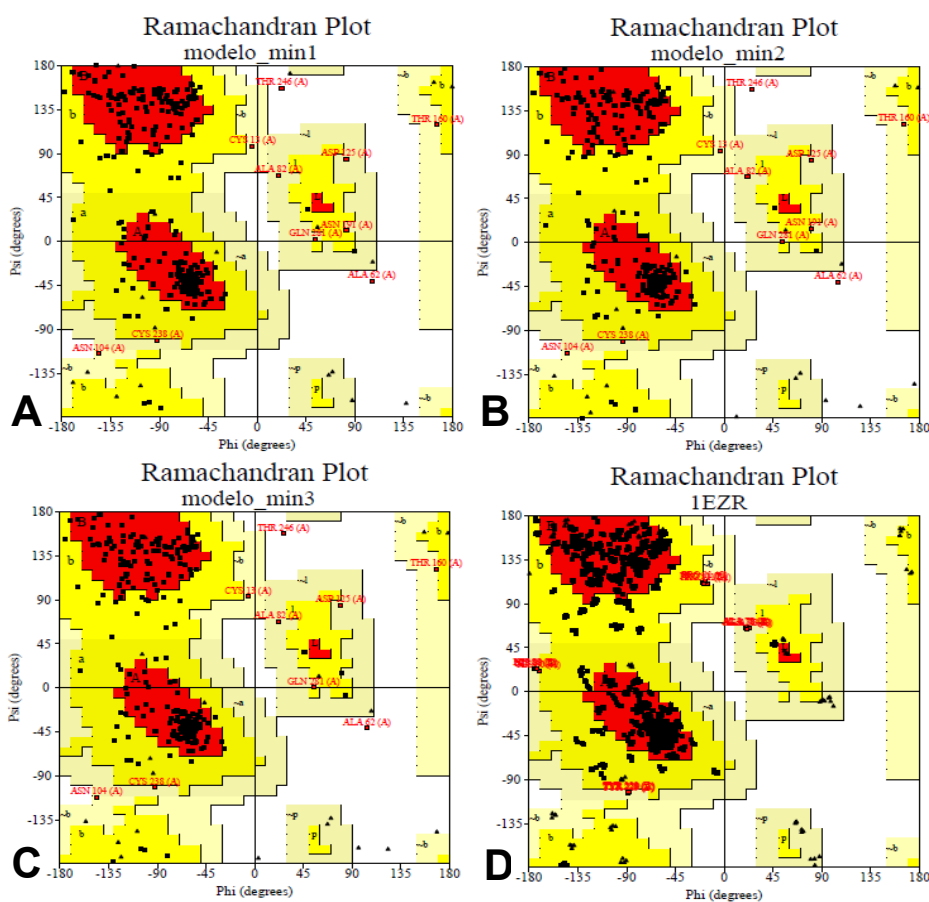


Figura 9: Gráficos de Ramachandran mostrando a confiabilidade do molde (1EZR) e modelo. A) Minimização 1 do modelo de *TvgNH* B) Minimização 2 do modelo de *TvgNH*. C) Minimização 3 do modelo de *TvgNH* D) Molde *LmNH*(1EZR).

A Tabela 1 apresenta os dados do gráfico de Ramachandran obtidos no programa PROCHECK, e conforme foi dito anteriormente mostra a terceira minimização como sendo a melhor.

Tabela 1: Percentual de resíduos de aminoácidos presentes em regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis obtido com gráfico de Ramachandran: do molde (Código PDB 1EZR) e das minimizações do modelo de *TvgNH*

Estruturas	Regiões favoráveis	Regiões permitidas	Regiões generosamente permitidas	Regiões desfavoráveis
Molde (1EZR)	85,3%	14,6%	1,1%	0%
Minimização 1	81,8%	14,6%	2,9%	0,7%
Minimização 2	82,1%	14,3%	2,9%	0,7%
Minimização 3	82,1%	14,6%	2,5	0,7%

Outra análise realizada para a validação do modelo construído foi à análise do perfil no Verify3D-1D pelo programa Structure Analyses and Verification Server (SAVES) (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), onde foi analisada a compatibilidade da estrutura tridimensional com a sua sequência primária de aminoácidos, e então é fornecida uma pontuação (*score*) relacionada à qualidade do modelo. Os valores de *score* 3D-1D acima de 0,2 significa que a estrutura 3D tem grandes possibilidades de apresentar boa qualidade e estar correta.

Assim após a análise no Verify3D-1D, o modelo da enzima *TvgNH* apresentou em média 80,6% dos resíduos de aminoácidos com *score* 3D_1D maiores ou iguais a 0,2, enquanto o molde (Código PDB 1EZR) apresentou em média 80%, desta forma estes resultados sugerem que o modelo apresentou valores semelhantes e relativamente favoráveis em relação ao molde (Figura 10).

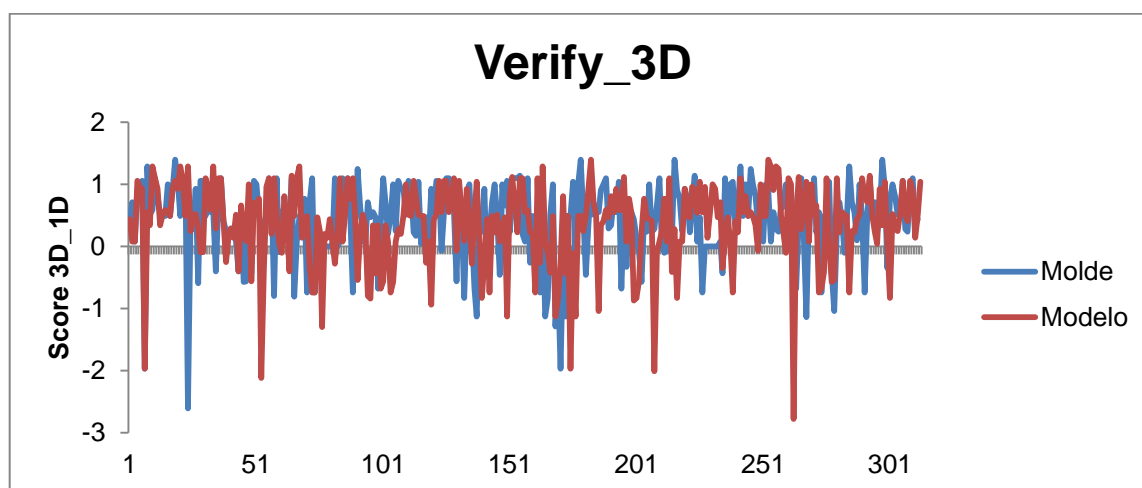


Figura 10: Análise do perfil no Verify_3D mostrando a confiabilidade do molde a NH de *L. major* (em azul) e do modelo da enzima NH de *T. vaginalis* (em vermelho).

Outra etapa da validação foi realizada no programa Prosa-Web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), através da obtenção do *Score-Z* e do gráfico de energia.

O *Score-Z* permite a avaliação da qualidade global do modelo construído, que compara os resultados com estruturas tridimensionais de proteínas disponíveis no PDB, que foram obtidas e elucidadas por métodos experimentais, como cristalografia de difração de raios X e a Ressonância Magnética Nuclear, onde a qualidade do modelo é confirmada através da sua presença na faixa azul do gráfico.

A partir do gráfico, sugere-se que o modelo é confiável, pois o valor de Score-Z do modelo (-7,83) foi semelhante ao do molde (-8,66) e também semelhante a proteínas do PDB. Desta forma, os valores obtidos indicam que o modelo possui uma boa qualidade estrutural (Figura 11).

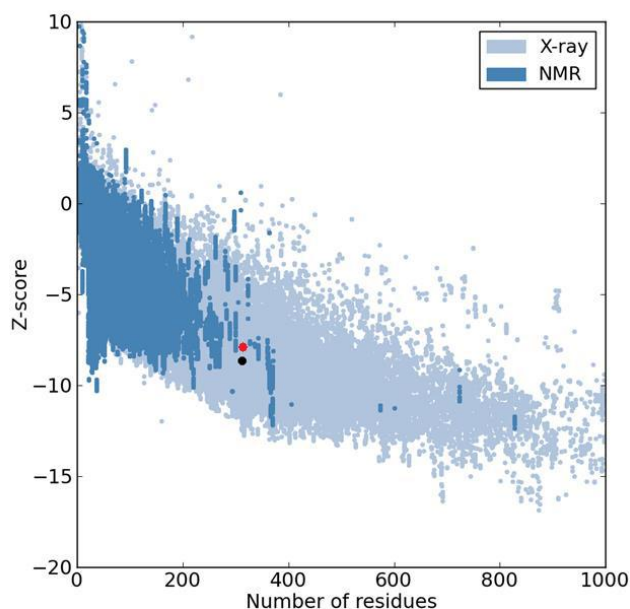


Figura 11: Valores de Score-Z obtido do programa ProSa-Web: molde a NH de *L. major* Código PDB 1EZR (em preto); modelo de NH de *T. vaginalis* (em vermelho).

O gráfico de energia do programa ProSa-Web oferece a qualidade do modelo em função da posição do aminoácido na sequência proteica. Geralmente os valores acima de zero correspondem a partes do modelo que estejam com algum problema. Na representação gráfica dos resíduos de acordo com a energia, o modelo da enzima *TvgNH* apresentou-se apropriado, por possuir poucos resíduos com energia acima de zero, indicando a boa qualidade do modelo construído (Figura 12).

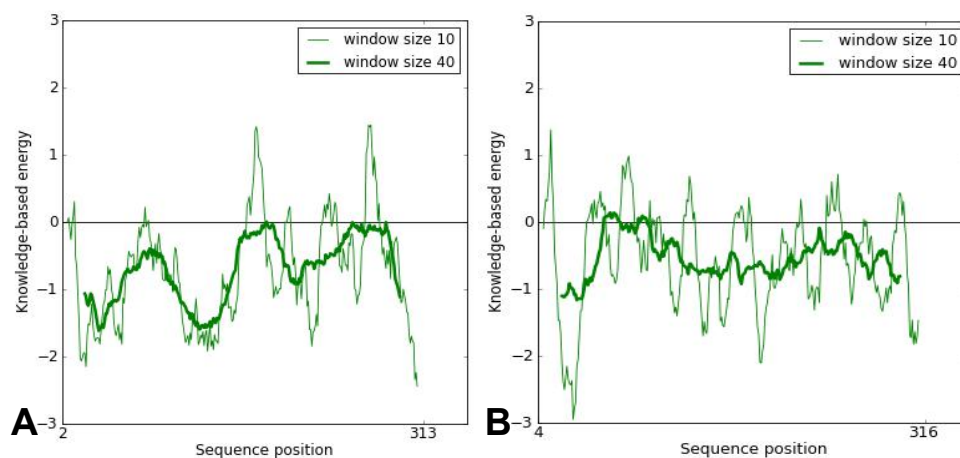


Figura 12: Os valores de energia dos resíduos em função de um resíduo central (verde escuro) e a energia independente de cada resíduo (verde claro) do molde a NH de *L. major* (A) e modelo da enzima NH de *T. vaginalis* (B).

A estrutura tridimensional do modelo construído foi analisada no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0 e comparada com a estrutura do molde utilizado. De forma semelhante ao molde, o modelo apresentou 12 α -hélices e 12 folhas β , conforme pode ser observado na Figura 13.

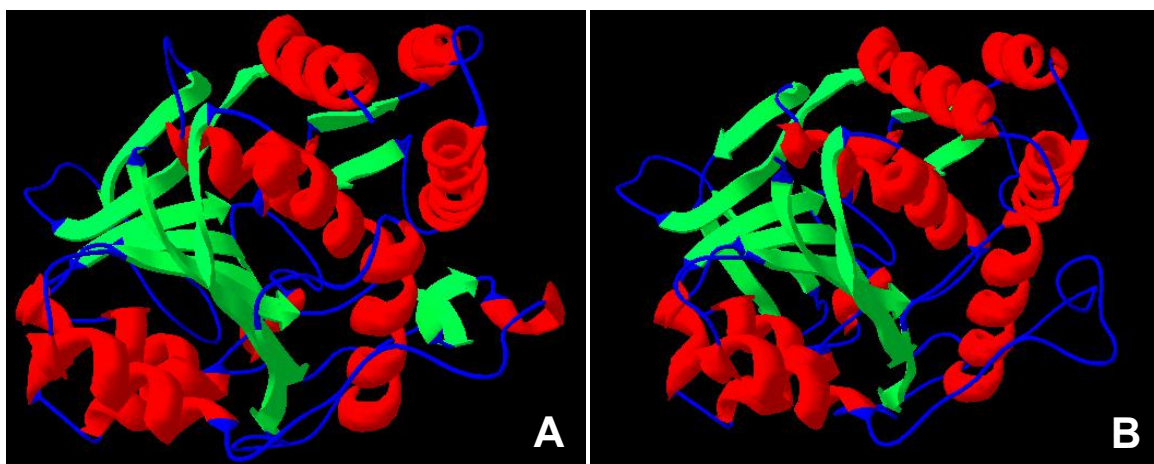


Figura 13: Estrutura secundária do: (A) modelo de NH de *T. vaginalis* e (B) molde a NH de *L. major* (1EZR).

A identificação do sítio ativo do modelo construído de NH de *T. vaginalis* foi realizada no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0 e com base no alinhamento feito no ClustalW entre a sequência de aminoácidos do modelo e do molde escolhido NH de *L. major*.

Conforme descrito por Shi *et al.* (1999) e França *et al.* (2008), os resíduos de aminoácidos que compõe sítio ativo da NH de *L. major* são: Asp10, Asp14, Asp15, Asn39, Ile81, His82, Thr126, Met152, Asn160, Glu166, Phe167, Asn168, Tyr225, Tyr229, Glu232, Asp241 e His240. Através do alinhamento sugere-se que os resíduos que compõe o sítio do modelo construído de NH de *T. vaginalis* são os seguintes: Asp12, Asp16, Asp17, Asn41, Ile85, His86, Leu131, Met157, Asn166, Glu172, Phe173, Asn174, Met234, Cys238, Thr241, Asp251 e Ala250.

Desta forma, a análise do sítio ativo mostrou que a maior parte dos resíduos de aminoácidos são conservados. No entanto, resultados mostram que alguns resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo do modelo construído não são conservados, podendo influenciar diretamente na especificidade e preferência de substrato hidrolisado pela NH de *T. vaginalis*.

Através do alinhamento, pode-se perceber que a principal diferença entre a IU-NH de *L. major* e do modelo de NH de *T. vaginalis* construído é a substituição da His240 pela Ala250 no modelo. Sabe-se que a His240 atua com doador de prótons, facilitando a quebra da ligação C₁-N, entre o açúcar ribose e a base nitrogenada, por uma molécula de água (GOPAUL *et al.*, 1996). Sendo assim essa substituição pela Ala250, pode determinar a especificidade da NH de *T. vaginalis* por outro substrato.

Como descrito por SANTOS FILHO & ALENCASTRO (2003) a construção de vários modelos alternativos, auxilia na escolha do modelo mais satisfatório, diante disso foi construído mais um modelo de NH de *T. vaginalis*.

Utilizou-se o servidor SWISS-MODEL para comparar as sequências de aminoácidos da sequência alvo com sequências de estruturas 3D. A estrutura selecionada como molde para modelar a enzima NH de *T. vaginalis*, foi à estrutura tridimensional da enzima NH de *Crithidia fasciculata* disponível sobre o código PDB 2MAS, que apresentou 32% de identidade e 50% de similaridade.

Foi realizado no programa ClustalW, o alinhamento entre a sequência primária de aminoácidos da enzima alvo, NH de *Trichomonas vaginalis*, e a sequência de aminoácidos do molde (PDB 2MAS), *Leishmania major* (PDB 1EZR), *T. b. brucei* (PDB 3FZ0), *T. vivax* (PDB 2FF2), *Bacillus anthracis* (PDB 2C40) (Figura 14).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
|
1EZR      -----MFRKIILDCDFGLDDAVRILLAHG-NPEIELLAITTVWGNQSLERKVTQNRILVA 53
2MAS      -----AKRIILDCDFGLDDAVRILLAHG-NPEIELLAITTVWGNQTLAKVTRNAQLVA 52
T_vaginalis  ---MSTPKLWIIITDCGIIIDSTAILICLA-CPDYEVVVGISCLGGMASLANVWHNVNRTL 55
3FZO      --GSHM/HRKLIIDTDCGIGDAIADIMAMT-QEDVEVIAITVVWGNVEVWQGMENIGKLL 57
2C40      -----MKRVYFNHDDGVNIDLVSLEALLQ-MIMVELTGVSVVIPADCYLEPAMSASRKII 52
2FF2      MRGSPGSAKNVVLIDHIDGNLIDFVAMVLLASNTEKVRLLIGALCTDADCFVENGFNVTGKIM 60
          ... .. * . ** .. : . . . . . : . : .

1EZR      DVAG----IVGVFVAAGCTKPLVRGVRNA SH- IHGETGMGNVS-----YPFEFKTKLD-G 102
2MAS      DIAG----ITGVPIAAGCDKPLVRKIMTAGH- IHGESGMGTVA-----YPAEFFNKVD-E 101
T_vaginalis  KVWGH--GAEKIPVYAGCADALVWQMHAPT- IHGKDGLGDIDD SV--FDYDLNDTVQ-T 109
3FZO      DLYD----ADIPFFRGAEGPLVGERETVQWGGFGSDGFGDAG-----FPPSQRVALQPK 107
2C40      DRFG----RNTIEVAASNSRGNKPPFDWRMHAFYVDALPILN-----ESGRVTVHVA 102
2FF2      CIMHNNMNLPLFPVIGKSAATAVNPFPKWRCLAKQMDIMPILNI PENVELWDKIKAENEK 120
          . . . . . :

1EZR      RHAVQLII DLIMSHE PK---TIITVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRV----KEVWLMGG 154
2MAS      RHAVNLIIDLIMSHE PK---TIITVPTGGLTNIAMAA RLEPRIVDRV----KEVWLMGG 153
T_vaginalis  EHAVNALINAANTIP----DLTLLTLPPLTNIATAFRMNPVAMNKL----KEIWFVMGG 159
3FZO      RHAALEILKILEEAEPSDDVVYQVVALGPLTIVVALALRLNPDLP SKLGTDTIPGIVVMGG 167
2C40      KPAHHHLIETLLQTEEK---TITLFTGPLIDLARALYEAPIIE NKI----KRLVWVMGG 153
2FF2      YEGQQLLADLVMNSEEK---VTICVTPPLSNVWNCIDKYGEKFTSK----VEECVIMGG 172
          . . . . . : * * * * * . * *

1EZR      -GYHTGNA SP-----VAEENVFIDPEAAHIVFN-----E SWNVIMVG-----LD 192
2MAS      -GYHEGNATS-----VAEENIIDPEAAHIVFN-----E SWQVIMVG-----LD 191
T_vaginalis  TSDHVMCTK-----WAEFNIRADPEAAQAIFRDY-----DNSKITIS S-----WT 200
3FZO      TSESKGNSNM-----AAEENSHCDPEAGVVV LQHKGWKCFVQLVNWVEVTVN SPMTWGFYD 222
2C40      TERTAGNVHEPEHDGTAEVNSFWDEAVARWE-----ANIEIDLIT-----LE 197
2FF2      AVDVRGNVFLPSTDGTAEVNIYWDASAKTVFG-----CPGLRRIMFS-----LD 217
          **          ** * * ** : . . . . .

1EZR      LTHLALATPAVQKRV R- EVGTKPAAEFMLQ ILDFYTKVY EK-EHD TYGKVHD PCAVAVVI- 249
2MAS      LTHQALATPPILQRV R- EVDTNPAREMLE IMDYFTKI YQSNRYMAAAAVHD PCAVAVVI- 249
T_vaginalis  LTQMRLKPNVETRLTGREDDT IAKWMHHTWATMIKFCARTVNDGTIATAD PVAAPCMCY 260
3FZO      KLVNRESTPNGRVAVNQNHQQE FIEKLPQRLEAFTRI HDDGTRADTGDAEATQDVTCVVP 282
2C40      STNQVPLTIDIREQWAKERKYI GIDFLGQCYAIVPPLVHFAKNS TY-YLWDVLTAAVFGK 256
2FF2      STNTVPVRSPYVQRF G-EQTNFLLSILVGTWAMKTHCELLRDGDGYAWDALTAAYVVD 276
          . . . . . :

1EZR      -DPTVMITER-----VFDIELMGLTIGMTVADFRYPRPHKC-----RTQVAVK 293
2MAS      -DPSVMITER-----VFDIELTKLTLGMTVADFRNPRPEHC-----HTQVAVK 293
T_vaginalis  ADKGVKWER-----FKVNVVLHGEQIG-----MIDAVPDPN-----GIRYAME 299
3FZO      DAVAVLVAIRPESVLD SFLTYVTVELHGRETRGATCI DWYGT EQ SMAKKGWRWNCNVI TK 342
2C40      ADLAKVQTIN-----SIVHTYSPSQ-----RTVETDDG-----RPVHVUYD 293
2FF2      QKVANVDPVP-----IDVVVDEKQPNEG-----ATVRTDAEN-----YPLTFVARN 316
          . . . . . :

1EZR      LDFDKVCLVIDALERIGDPQ 314
2MAS      LDFEKVGLVLDALERIGDPQ 314
T_vaginalis  IDHEMYLQTLDNLMADH---- 316
3FZO      VIDNEMFLKALRDIVEYVA--- 360
2C40      VNHDRFEDYITRLAKKVST-- 312
2FF2      PEAEFLDMLLRSARAC---- 333
          . . . . . :

```

Figura 14: Alinhamento múltiplo entre as seqüências primárias da enzima *TvgNH*, e dos moldes: *C. fasciculata* (PDB 2MAS), *L. major* (PDB 1EZR), *T. b. brucei* (PDB 3FZO), *T. vivax* (PDB 2FF2), *B. anthracis* (PDB 2C40). Em verde os resíduos conservados.

Para a predição da estrutura secundária, as seqüências primárias de aminoácidos da enzima alvo, *NH* de *T. vaginalis*, de *L. major* (PDB 1EZR), *T. b.*

brucei (PDB 3FZ0), *T. vivax* (PDB 2FF2), *B. anthracis* (PDB 2C40) e do molde *C. fasciculata* (PDB 2MAS), foram submetidas ao servidor JPRED. A análise da estrutura secundária destas enzimas mostrou que as regiões de α -hélice e folhas β são conservadas (Figura 15).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

1EZR      -----MFRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHG-NPEIELLAITTVVGNQSLKRVQNAQLVA 53
2MAS      -----AKRIILDCDPGIDDAVAIFLAHG-NPEIELLAITTVVGNQSLKRVQNAQLVA 52
T_vaginalis  ---MSTPKRLWIDTDCGIDDAVAIFLAHG-NPEIELLAITTVVGNQSLKRVQNAQLVA 55
3FZ0      --GSHMVRRLIIDTDCGGDDAIAIMLAMT-QPDVEVIAITTVVGNVEVWQGMENIGKLL 57
2C40      -----MKRVYFNHDGGVDDLVLFLLLQ-MDNVLELGVSVI PADCYLEFAMSASRKII 52
2FF2      MRGSPGSAKRVVLDHDGNLDDFVAVMLLASNTERKVRLLIGALCTDADCFVENGENVTKIM 60
          ::::*::**:::  . . . . .  :::

1EZR      DVAG---IVGVVVAAGCIRPLVRGVRNASH-IHSETGMGNVS-----YPPEFKTKLD-G 102
2MAS      DIAG---ITGVPVAAAGCIRPLVRKDMTAGH-IHGESGMGTVA-----YPAEFKNKVD-E 101
T_vaginalis  KVVGH---GAEKI PVVAGCADALVVKQMHAPT-IHSGDGLGDIDDSV--FDYDLNDTVQ-T 109
3FZ0      DLYD---ADIPFVRGAEGLVGERETVQWGGFGSDGFGDAG---FPFSQRVALQPK 107
2C40      DRFG---KNTIEVAASNRGKFFPKDWRMHAIFYVDALPIIN-----ESGKVVTHVAA 102
2FF2      CLMHRNMLPLFPVIGKSAATAVNFPPREWRCLARMDMPILNIPENVELWDEKKAENEK 120
          . . . . .  :

1EZR      RHAVQLIIDLMSHEPK---TITLVFTGGITNIAMAVRLEPRIVDRV-----KEVVIMGG 154
2MAS      RHAVNLIIDLMSHEPK---TITLVFTGGITNIAMAARLEPRIVDRV-----KEVVIMGG 153
T_vaginalis  EHAVNALINAANTIF---DLTLLTLGFLITNIAIAFRNPFVAMNKL---KEIIVMGG 159
3FZ0      RHAALEILKILBEAEPSSDDVVYQLVALGFLITNVALALRLNPLDFSKLGTDTIPGIVMGG 167
2C40      KPAHHHLIETLLQTEEK---TLLTFTGFLITDLARALVEAPIIENKI---KRLVIMGG 153
2FF2      YEGQLLADLWMNSEEK---VITCVTGPLSNVAVNCIDRYGERFTSK---VEECVIMGG 172
          . . . . .  : * * : : * .

1EZR      -GYHTGNASP-----VAEENVFIDPEAAHIVFN-----ESWVIMVG-----LD 192
2MAS      -GYHEGNATS-----VAEENIIDPEAAHIVFN-----ESWQVIMVG-----LD 191
T_vaginalis  TSDHVGNCTK---WAEFNIRADPEAAQAIFRDY-----DNSEKITISS---WT 200
3FZ0      TSESKGNSNM---AAEENSHCDPEAGVVVLQHGKWCQVQLVWVEVIVNSMTWGFYD 222
2C40      TFRTAGNVHEPEHDGTAEWNSFDWPEAVARVWE-----ANIEIDLIT---LE 197
2FF2      AVDVRGNVFLPSTDGTAEWNIYWDPASARTVFG-----CPGLRIMFS-----LD 217
          **  * * : * :  :

1EZR      LTHLALATPAVQKRVR-EVGTKFAARMLQILDFTYRVYEK-EHDTYGVKVDPCAVAVVI- 249
2MAS      LTHQALATPPIILQVRK-EVDTNFAREMLEIMDYTKIYQSNRYMAAAAVHDFCAVAVVI- 249
T_vaginalis  LTQNRRLKPNVETRLTGREDTTIAKQGHHTWATMIKPCARTVNDGTIATADPVAAFQMCY 260
3FZ0      KLVNRETFNGRVAVNQHWQETIEKLFQRLEAFTRIHDGIRADTGDAEATQVTVVVP 282
2C40      STNQVPLTIDIREQWAKERKYIGIDFLGQCYAIVPFLVHFARNSTY-YLWDVLTAAAFVVK 256
2FF2      STNIVPVRSPYVQRFG-EQTNFIILSVLGDWAMKTHCELLRDLRGGDYVAWDLTAAYVVD 276
          . . . . .  :

1EZR      -DPTVMTER-----VVDIEINGALTIGMTVADFRYFRPKNC-----RTQVAVK 293
2MAS      -DPSVMTER-----VVDIEILGKLLTGMVADFRNFRPEHC-----HTQVAVK 293
T_vaginalis  ADKGVKQWER-----FKVNVVLHGEQIG-----MTDAVPDEN-----GIRYAME 299
3FZ0      DAVAVLVAIRPESVLDSPLTYVIVELHGRETRGATCILWYGTQSMARKGRWRNENVIITK 342
2C40      ADLAKVQITIN-----SIVHTYGPSQG-----RTVETDDG-----RPFVHWVYD 293
2FF2      QKVAVVDPVP-----IDVVVDRKQNEG-----ATVREDAEN---YELTFVARN 316
          :

1EZR      LDFKRFWCLVIDALERIGDFQ 314
2MAS      LDPEKFWGLVIDALERIGDFQ 314
T_vaginalis  IDHEMYLQTLDNLMADH--- 316
3FZ0      VDNEMFLKALRDIVEYVA-- 360
2C40      VNHCRFFDYITRLAKKVST-- 312
2FF2      PEAEFFLDMLLRARAC--- 333
          : : :

```

Figura 15: Alinhamento múltiplo das sequências primárias do modelo de NH de *T. vaginalis*, de *L. major* (PDB 1EZR), *T. b. brucei* (PDB 3FZ0), *T. vivax* (PDB 2FF2), *B. anthracis* (PDB 2C40) e do molde *C. fasciculata* (PDB 2MAS).

Para garantir uma melhor qualidade do modelo a ser gerado, foi realizado o alinhamento múltiplo entre as sequências primárias da enzima NH dos microrganismos *L. major*, *T. brucei brucei*, *T. vivax*, *B. anthracis* e a de *T. vaginalis*.

E assim o modelo foi construído pelo modo alinhamento disponível no servidor Swiss-Model, utilizando como molde a estrutura cristalográfica da NH de *Crithidia fasciculata*, e com base no alinhamento múltiplo realizado no servidor ClustalW, entre as sequências primárias da enzima NH dos microrganismos.

Para a avaliação da qualidade do modelo construído, foi realizada a otimização do mesmo, através de minimizações, para assim melhorar a geometria da molécula, diminuindo a sua energia. Então, o modelo foi submetido a seis etapas de minimização para otimização da geometria utilizando o programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0.

A validação do modelo foi realizada através do gráfico de Ramachandran (PROCHECK), Verify_3D e ProSa-Web.

As minimizações realizadas foram avaliadas por meio do gráfico de Ramachandran, e os resultados sugerem que a sexta minimização do modelo foi a que apresentou a melhor estereoquímica, uma vez que mostrou a maior parte dos resíduos de aminoácidos (80,4%) em regiões favoráveis, 15,7% em regiões permitidas, e apenas 1,1% em regiões desfavoráveis, sendo semelhantes aos resultados obtidos pelo molde (2MAS), como mostra a Figura 16.

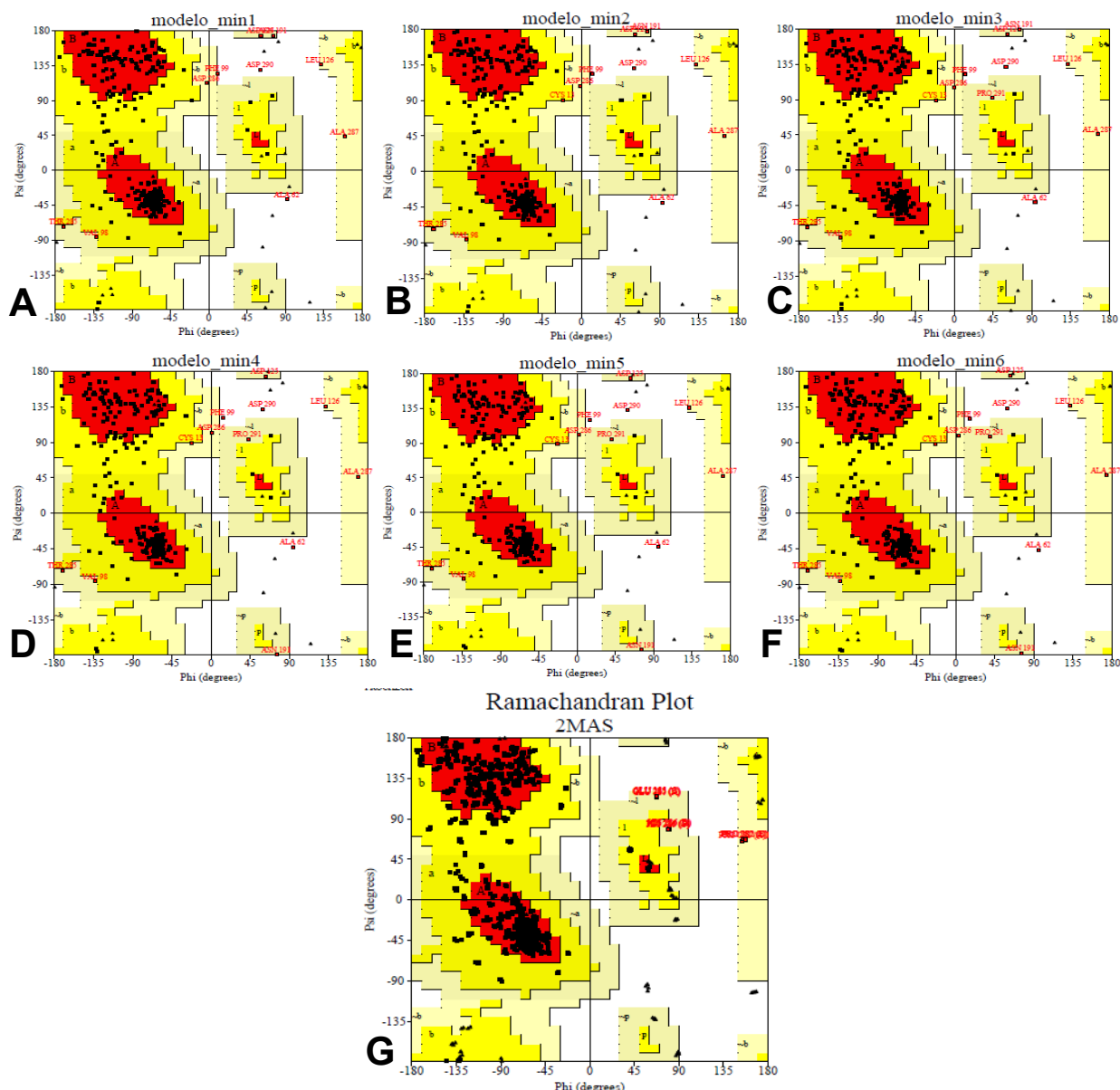


Figura 16: Gráficos de Ramachandran das minimizações do modelo e molde. A) Minimização 1 do modelo de *TvgNH*. B) Minimização 2 do modelo de *TvgNH*. C) Minimização 3 do modelo de *TvgNH*. D) Minimização 4 do modelo de *TvgNH*. E) Minimização 5 do modelo de *TvgNH*. F) Minimização 6 do modelo de *TvgNH*. G) Minimização do molde a NH de *C. fasciculata* (PDB 2MAS)

Estes 1,1% de resíduos de aminoácidos (Tabela 2) em regiões desfavoráveis representam os resíduos Ala62 e Asp290, estes por sua vez não compõe o sítio ativo, segundo o que foi proposto alinhamento múltiplo, com base no sítio ativo das NH dos microrganismos utilizados no alinhamento.

A análise da estereoquímica utilizando essa validação mostrou valores similares ao molde, quando se comparou o percentual de resíduos de aminoácidos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis.

Tabela 2: Percentual de resíduos de aminoácidos nas regiões favoráveis, permitidas e desfavoráveis obtidos no gráfico de Ramachandran, do molde a IU-C β NH (PDB 2MAS) e das minimizações do modelo de *TvgNH*.

Estruturas	Regiões favoráveis	Regiões permitidas	Regiões generosamente permitidas	Regiões desfavoráveis
Molde (2MAS)	87,7%	11,5%	0,7%	0%
Minimização 1	79,3%	17,1%	2,5%	1,1%
Minimização 2	78,9%	17,3%	2,9%	1,1%
Minimização 3	79,3%	16,8%	2,9%	1,1%
Minimização 4	79,6%	16,4%	2,9%	1,1%
Minimização 5	80%	16,1%	2,9%	1,1%
Minimização 6	80,4%	15,7%	2,9%	1,1%

Apesar do modelo obtido pelo modo alinhamento múltiplo apresentar 1,1% de resíduos em regiões desfavoráveis, os resíduos que foram caracterizados nesta região não compõem o sitio ativo da enzima, sendo estes resíduos, a Ala62 e Asp290. Já o primeiro modelo apesar de apresentar um valor de 0,7%, também foram dois resíduos que encontraram-se em regiões desfavoráveis (Ala62 e Thr246). Adicionalmente, o segundo modelo construído apresentou um maior valor para as regiões permitidas e generosamente permitidas quando comparado ao modelo construído pelo modo automático.

Para avaliar a confiabilidade do modelo também foi realizada a análise do perfil 3D-1D no Verify3D-1D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/), onde o molde a IU-C β NH apresentou 100% dos resíduos aminoácidos com score 3D-1D maiores ou iguais a 0,2, enquanto o modelo da enzima *TvgNH* apresentou em média 75.48%, sendo assim o modelo apresentou resultados que podem ser considerados positivos (Figura 17).

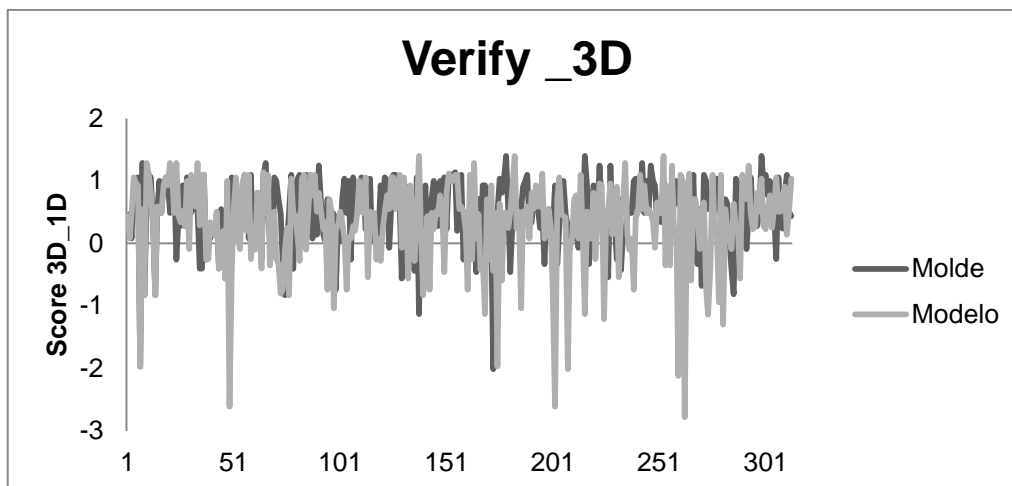


Figura 17: Gráfico da análise do perfil 3D_1D no programa Verify_3D do molde a NH de *C. fasciculata* (código PDB 2MAS) (cinza escuro) e do modelo da enzima NH de *T. vaginalis* (cinza claro).

Para avaliar a qualidade global dos modelos foi realizada a análise do Score-Z utilizando o ProSA-Web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), desta forma, pode-se observar que o valor de Score-Z do molde foi de -9,35 enquanto o modelo apresentou -7,83. Portanto, esses os valores podem indicar uma boa qualidade estrutural do modelo, uma vez que se mostra relativamente semelhante ao molde (Figura 18).

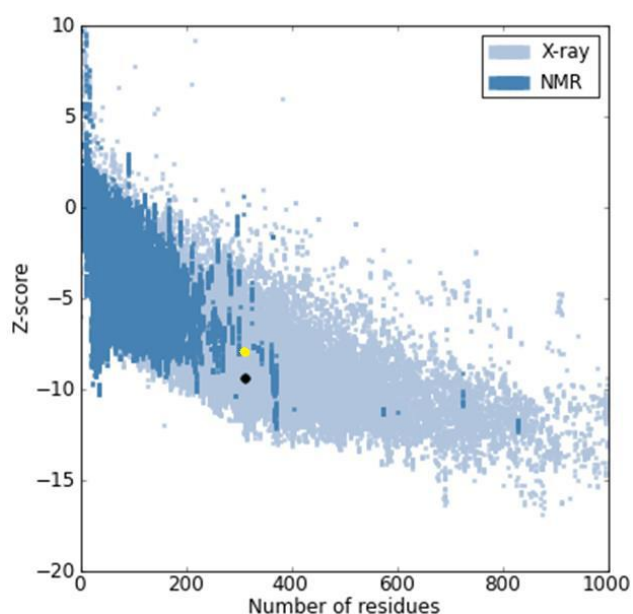


Figura 18: Valores de Score-Z obtido do programa ProSa-Web. A) o molde a NH de *C. fasciculata* (preto) e o modelo de NH de *T. vaginalis* (amarelo).

O gráfico de energia do programa ProSA oferece a qualidade do modelo em função da posição do aminoácido na sequência protéica. Geralmente os valores acima de zero correspondem a partes do modelo que estejam com algum problema. Na representação gráfica dos resíduos de acordo com a energia, o modelo da enzima NH de *T. vaginalis* apresentou-se apropriado, por possuir poucos resíduos com energia acima de zero, indicando a boa qualidade global do modelo construído (Figura 19).

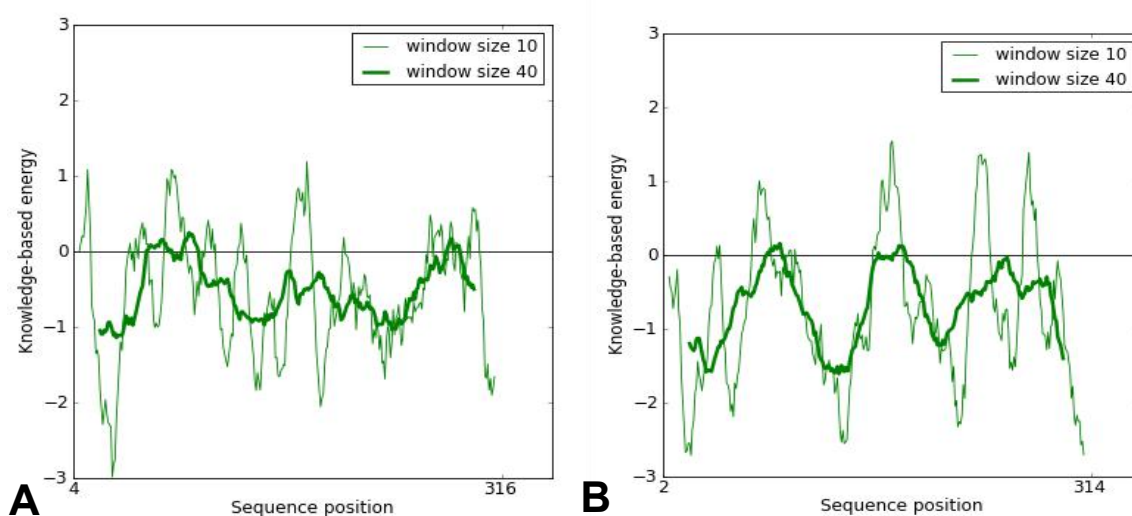


Figura 19: Resultado da média da energia dos resíduos em função de um resíduo central (verde escuro) e a energia independente de cada resíduo (verde claro) do modelo da enzima NH de *T. vaginalis* (A) e o molde a NH de *C. fasciculata*, PDB 2MAS (B).

A análise da estrutura tridimensional do modelo construído foi realizada no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0., onde de forma semelhante ao molde a IU-C/NH, o modelo de *TvgNH* apresentou 13 α -hélices e 12 folhas β , conforme pode ser observado na Figura 20.

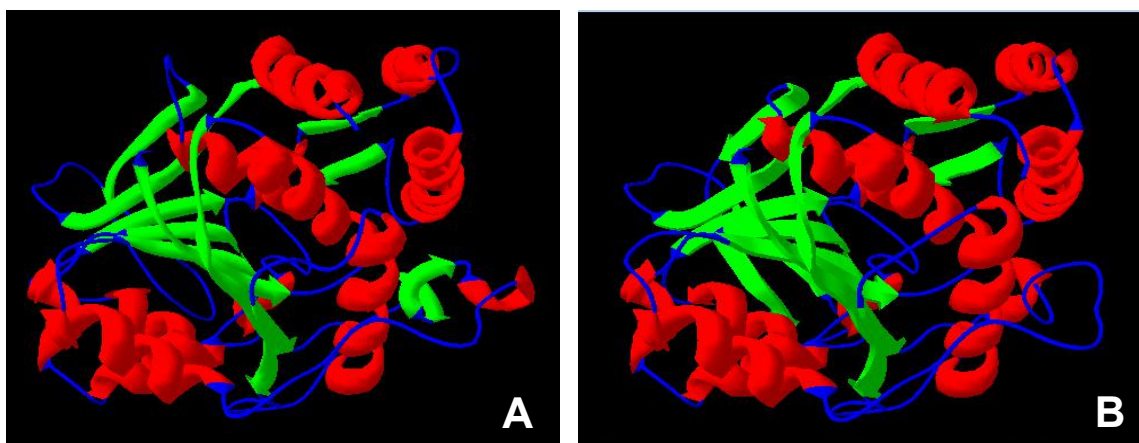


Figura 20: Estrutura secundária do modelo de: (A) NH de *T. vaginalis* e (B) molde da NH de *C. fasciculata*.

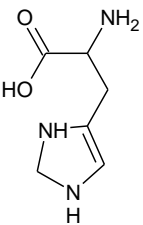
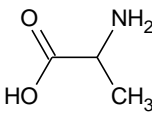
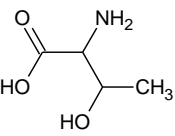
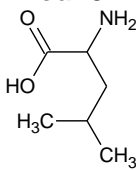
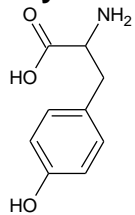
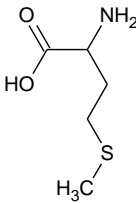
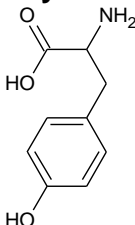
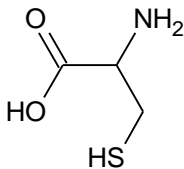
A identificação do sítio ativo do modelo construído de NH de *T. vaginalis* foi realizada no programa Swiss PDB Viewer versão 4.1.0 com base no alinhamento múltiplo feito no ClustalW. Conforme descrito por Degano *et al.* (1996) e França *et al.* (2008), os resíduos de aminoácidos que compõe sítio ativo da NH de *C. fasciculata* são: Asp10, Asp14, Asp15, Asn39, Ile81, His82, Thr126, Met152, Asn160, Glu166, Phe167, Asn168, Tyr225, Tyr229, Asp241 e His241. Através do alinhamento foram propostos os resíduos que compõe o sítio do modelo construído de NH de *T. vaginalis* como sendo os resíduos a seguir: Asp12, Asp16, Asp17, Asn41, Ile85, His86, Leu131, Met157, Asn166, Glu172, Phe173, Asn174, Met234, Cys238, Asp251 e Ala250.

De maneira geral os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, são conservados, entretanto, observa-se uma diferença crucial entre a IU-NH de *C. fasciculata* e o modelo construído que é a substituição da His241 pela Ala250. Essa diferença pode ser determinante quanto à preferência do substrato, influenciando diretamente na especificidade de hidrólise pela NH de *T. vaginalis*.

Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo não são integralmente conservados, e essa diferença pode influenciar diretamente na especificidade de hidrólise de substrato da NH de *T. vaginalis*, desta forma o conhecimento das propriedades físico-químicas destes resíduos contribui para o entendimento das diferenças entre os tipos de nucleosídeos hidrolases e a sua especificidade pelo substrato.

Assim o programa Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) foi utilizado para realizar a predição de propriedades físico-químicas, tais como, as diferenças do número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nON) e o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH), presentes nesses resíduos que não são conservados (Tabela 3).

Tabela 3: Características dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da NH de *C. fasciculata* e da NH de *T. vaginalis*

Resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo			
Molde (NH <i>C. fasciculata</i>)		Modelo (NH <i>T. vaginalis</i>)	
Aminoácido	Características	Aminoácido	Características
<p>His241</p> 	<p>Básico nON: 5 nOHNH: 5</p>	<p>Ala250</p> 	<p>Apolar nON: 3 OHNH:3</p>
<p>Thr126</p> 	<p>Polar nON: 4 nOHNH: 4</p>	<p>Leu131</p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 3</p>
<p>Tyr225</p> 	<p>Polar nON: 4 nOHNH: 4</p>	<p>Met234</p> 	<p>Apolar nON: 3 nOHNH: 3</p>
<p>Tyr229</p> 	<p>Polar nON: 4 nOHNH: 4</p>	<p>Cys238</p> 	<p>Polar nON: 3 nOHNH: 3</p>

Entre os resíduos de aminoácidos que não estavam conservados no sítio ativo comparando a *TvgNH* e a *IU-CfNH* pode-se perceber que são de grupos diferentes, com exceção da Tyr229 e a Cys238 são polares (Tabela 3).

Pode-se ressaltar a diferença entre a His241 e a Ala250, uma vez que já foi proposto que a His241 na IU-Cf-NH faz a protonação do N7 da base purínica, etapa que antecede a formação do estado de transição, na reação de quebra da ligação *N*-glicosídica do nucleosídeo purínico, por meio de reação do tipo SN₁, onde primeiramente ocorre ativação do grupo de saída (base purínica) por protonação ou ligação de hidrogênio, em seguida ocorre a formação do íon ribooxocarbênio por distorção e estabilização eletrostática do grupo ribosil, e a terceira etapa catalítica, acontece com a ativação e o posicionamento estratégico da molécula de água para capturar o íon ribooxocarbênio no estado de transição (HORENSTEIN *et al.*, 1991).

Desta forma este resíduo seria um doador de próton para a base desestabilizando o anel e a partir de reação do tipo SN₁, ocorre ataque da molécula de água a quebra entra a ligação C_{1'} da ribose e o nitrogênio da base (HORENSTEIN *et al.*, 1991).

E a importância da presença do resíduo His241 para a manutenção da atividade catalítica da enzima, já foi estudada por Gopaul *et al.* (1996) onde foi realizado uma mutação sítio dirigida, trocando a His241 por uma alanina, e observou-se que a mesma diminuiu de forma significativa a taxa de hidrólise da inosina pela IU-NH de *C. fasciculata* (GOPAUL *et al.*, 1996). Desta forma, sugere-se que a presença da Ala250 na NH de *T. vaginalis* possa afetar de forma significativa a taxa de hidrólise por substratos, tais como a inosina.

Diante dos resultados encontrados após a construção dos modelos de NH de *T. vaginalis*, tanto pelo modo automático quanto pelo modo alinhamento, pode-se dizer que de maneira geral apresentaram os resultados semelhantes. Diante disso, o modelo escolhido para continuação dos estudos foi o construído pelo modo alinhamento, uma vez que o alinhamento múltiplo pode-se observar a conservação da estrutura secundárias de várias proteínas de uma mesma família, mas de microrganismos diferentes, o que aumenta a chances do modelo estar correto, aproximando-se da estrutura tridimensional real.

5.2 Potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase

Os potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase descritos na literatura, selecionados para este estudo, foram immucillin-A, immucillin-ACAP, immucillin-H, *p*-aminofeniliminoribitol, DADMe-immucillinA, DADMe-immucillinH, *p*-

nitrofenilriboamidrazona, e dois compostos que mimetizam ribonucleosídeos purínicos (BOUTELLIER *et al.*, 1994; FURNEAUX *et al.*, 1999; MILES *et al.*, 1999; RENNÓ *et al.*, 2012).

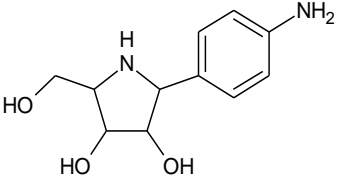
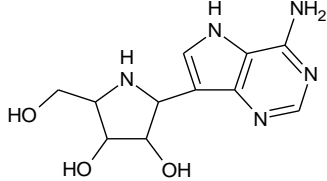
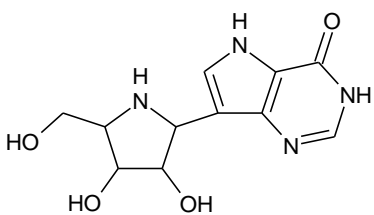
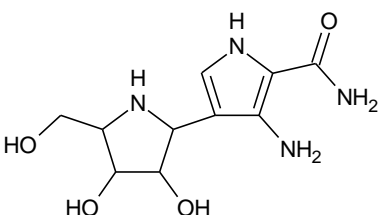
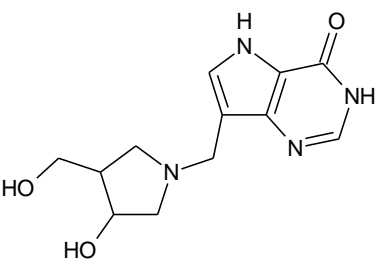
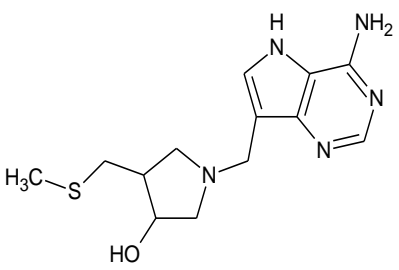
O immucillin-A, o immucillin-ACAP, immucillin-H e os DADMe-immucillins ou 2'-dideoxi-ribonucleosídeos (DADMe-ImmA, DADMe-ImmH), são derivados da estrutura 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol, obtidos por Furneaux *et al.* (1999). O *p*-aminofeniliminoribitol (*p*APIR), que foi co-cristalizado com a inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de *C. fasciculata*, também é derivado da estrutura citada anteriormente (FURNEAUX *et al.*, 1999; MILES *et al.*, 1999).

Conforme descrito na literatura o inibidor *p*APIR, foi testado na IU-NH de *C. fasciculata* e apresentou uma constante de inibição de 30 nM (MILES *et al.*, 1999). Os inibidores immucillin-A, immucillin-ACAP e a immucillin-H, foram testados em diferentes NH, sendo estas a IU-NH de *C. fasciculata*, IAG-NH de *T. b. brucei*, IU-NH de *L. major* e IAG-NH de *T. vivax*, na qual apresentaram valores de constante de inibição, em nanomolar e sub-molar. Entre estas, pode-se destacar o immucillin-A, que apresentou constante de inibição de 0,9 nM para IAG-NH de *T. b. brucei*, (Tabela 4) (MILES *et al.*, 1999, VERSÉES *et al.*, 2006, SHI *et al.*, 1999).

Os DADMe-immucillins apresentaram uma fraca inibição frente a NH, quando estes foram testados em IAG-NH *T. vivax*, onde o DADMe-ImmH apresentou K_i de aproximadamente 1,0 μ M e o DADMe-ImmA apresentou K_i aproximadamente de 0,1 μ M, como mostra a Tabela 4 (VERSSÉS *et al.*, 2006).

Esta fraca inibição apresentada pelos DADMe-immucillins, presumivelmente resulta da ausência da 2'-OH no anel iminoribitol, uma vez que o sítio ativo das NH é específico para ribose. Esta rigorosa especificidade pela porção ribose é estabelecida através de uma conservada rede de interações que envolvem as hidroxilas do C2', C3' e C5' da ribose, os resíduos de aminoácidos que são conservados nos diferentes grupos de NH e o íon Ca^{2+} , localizado no fundo da cavidade do sítio ativo (VERSSÉS *et al.*, 2006).

Tabela 4: Potenciais inibidores das nucleosídeos hidrolases descritos na literatura derivados da estrutura 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-ribitol e suas respectivas constantes de inibição.

Potenciais inibidores de NH descritos na literatura	
<p>pAPIR</p>  <p>IU-NH de <i>C. fasciculata</i> $K_i = 30$ nM</p>	<p>Immucillin-A</p>  <p>IAG-NH W <i>T. vivax</i> $K_i = 6,2$ nM IAG-NH R252A <i>T. vivax</i> $K_i = 50$ nM IAG-NH <i>T.b.brucei</i> $K_i = 0,9$ nM IU-NH <i>C. fasciculata</i> $K_i = 42$ nM</p>
<p>Immucillin-H</p>  <p>IAG-NH <i>T. vivax</i> $K_i = 6,2$ nM IAG-NH <i>T. b. brucei</i> $K_i = 24$ nM IU-NH <i>C. fasciculata</i> $K_i = 42$ nM</p>	<p>Immucillin-ACAP</p>  <p>IU-NH <i>C. fasciculata</i> $K_i = 3,0$ nM IAG-NH <i>T.b.brucei</i> $K_i = 23$ nM IU-NH <i>L. major</i> $K_i = 6,5$ nM</p>
<p>DADMe-ImmucillinH</p>  <p>IAG-NH <i>T. vivax</i> $K_i \Rightarrow 1000$ nM</p>	<p>DADMe-ImmucillinA</p>  <p>IAG-NH <i>T. vivax</i> $K_i \Rightarrow 100$ nM</p>

pAPIR = *p*-aminofeniliminoribitol;

Fonte: PARKIN *et al.*, 1997; MILES *et al.*, 1999; VERSÉES *et al.*, 2006

A riboamidrazona e seus derivados também são potentes inibidores, obtidos por Boutellier *et al.* (1994). O *p*-nitrofenilriboamidrazona, que é um análogo substituído da riboamidrazona, quando testado frente à IU-NH *C. fasciculata* apresentou constante de dissociação em torno de 2 nM (Figura 21) (BOUTELLIER *et al.*, 1994).

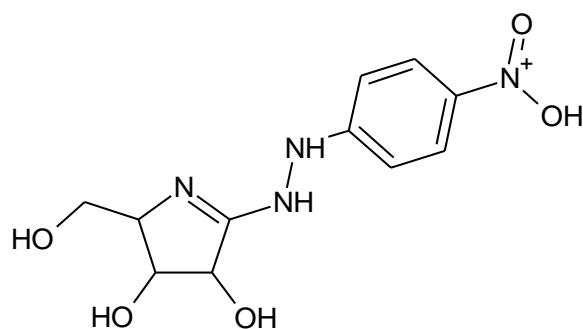


Figura 21: Potencial inibidor da enzima NH de *C. fasciculata*: *p*-nitrofenilriboamidrazona.

Outros inibidores selecionados foram dois compostos que mimetizam ribonucleosídeos purínicos estudados recentemente por Rennó *et al.* (2012). No estudo realizado por modelagem molecular, estes compostos apresentaram maior afinidade para o sítio ativo da NH de *Leishmania donovani*, que a inosina, o substrato natural, corroborando os resultados experimentais. Dados experimentais revelaram que o composto 1 apresentou afinidade com a enzima com valor de K_i de $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ e o composto 2 o valor de $17.0 \pm 2.1 \mu\text{M}$, sendo resultados promissores (Figura 22) (RENNÓ *et al.*, 2012).

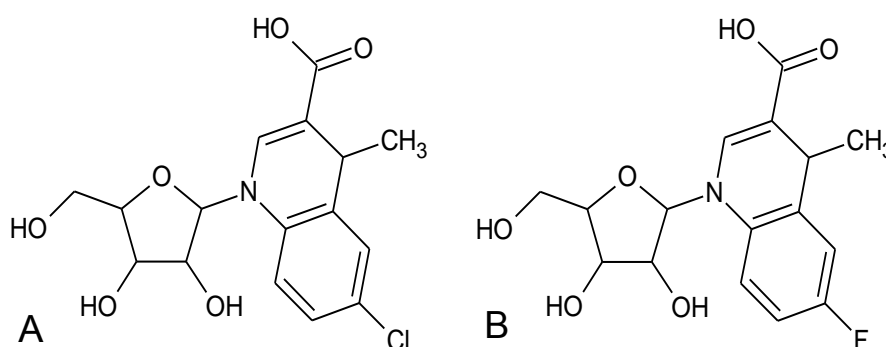


Figura 22: Potenciais inibidores da NH de *L. donovani*: (A) composto 1, (B) composto 2.

5.3 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade “*in silico*”

Os programas *Osiris Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>) e *Molinspiration* (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>), foram utilizados para realizar a

avaliação das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade “*in silico*” dos potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase, descritos na literatura.

A avaliação da toxicidade *in silico* de compostos inclui efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução. Esta análise é feita em três diferentes níveis: baixo risco que equivale a 1, médio risco igual a 2 e alto risco igual a 3, usando-se esta pontuação para melhor visualização do efeito que a estrutura possa apresentar.

A partir do gráfico da Figura 23 pode-se observar que a maior parte das moléculas apresentaram baixo risco de causarem mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritantes e efeitos na reprodução. Apenas o *p*-nitrofenilriboamidrazona apresentou alto alerta de risco tumorigênico e médio para causar mutagênico.

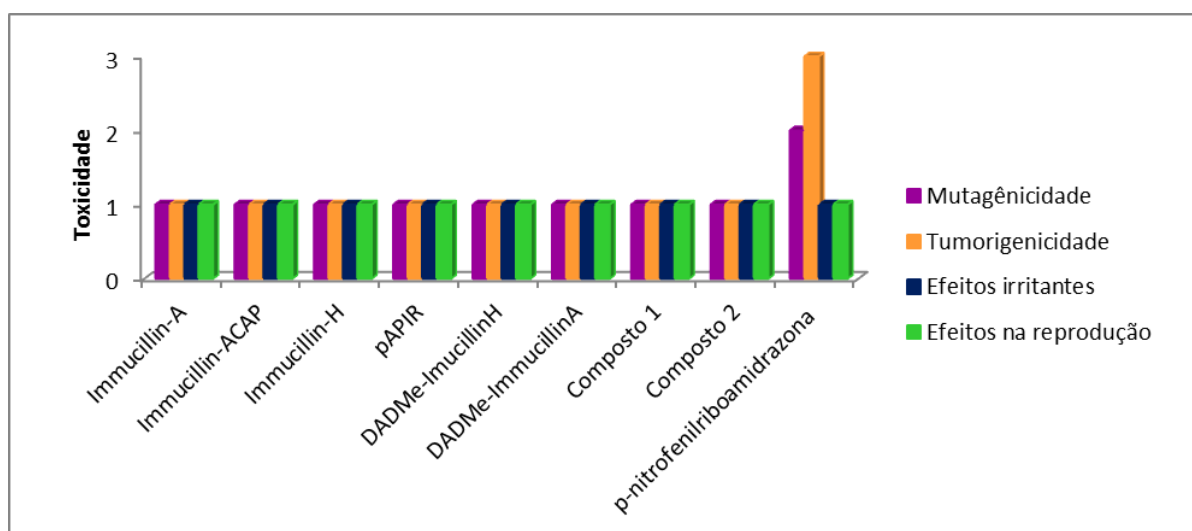


Figura 23: Perfil de toxicidade *in silico* relativo à mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito irritante e efeito na reprodução de potenciais inibidores de NH descritos na literatura onde 1, 2 e 3 representam, respectivamente baixo, médio e alto risco.

Analisando o perfil *druglikeness* pode-se perceber que dos nove potenciais inibidores de NH selecionados, cinco apresentaram bons valores de *druglikeness*, sendo estes o *p*-aminofenilminoribitol (1,72), o immucillin-ACAP (1,94), DADMe-immucillina (2,44), o immucillin-H (3,82) e o DADMe-immucillinH (5,83) (Figura 24). Isto significa que estes compostos apresentam semelhança estrutural com fármacos que já estão no mercado, ou seja, estes possuem em sua estrutura fragmentos presentes com maior frequência em fármacos comerciais.

Os potenciais inibidores que apresentaram um menor valor de *druglikeness* foram o *p*-nitrofenilriboamidrazona, o composto 2, a immucillin-A e o composto 1, com valores igual a -9,33; -1,57; -0,12 e 0,2 respectivamente.

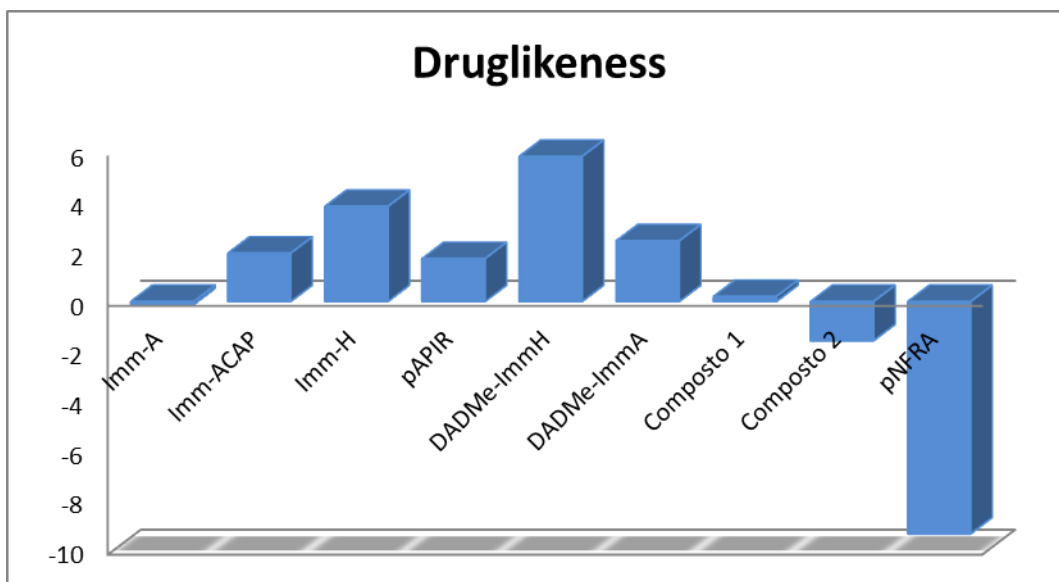


Figura 24: Perfil *druglikeness* dos potenciais inibidores de NH descritos na literatura. Onde Imm representa immucillin, *pAPIR* representa *p*-aminofeniliminoribitol e *pNFRA* representa *p*-nitrofenilriboamidrazona.

O cálculo de *drug-score* fornece uma pontuação de 0-1 para predizer o potencial que a molécula tem de se tornar um fármaco. Pode-se perceber que a maior parte dos potenciais inibidores apresentou uma boa pontuação (Figura 25). O menor valor foi obtido pelo *p*-nitrofenilriboamidrazona, igual a 0,23, seguido pelo composto 2, o immucillin-A e o composto 1, sendo adequado diante dos resultados de *druglikeness*.

Pode-se destacar a pontuação obtida pelo immucillin-H e o DADMe-immucillinH, que apresentaram os maiores valores, 0,95 e 0,96 respectivamente, indicando o grande potencial destes compostos em se tornar um fármaco.

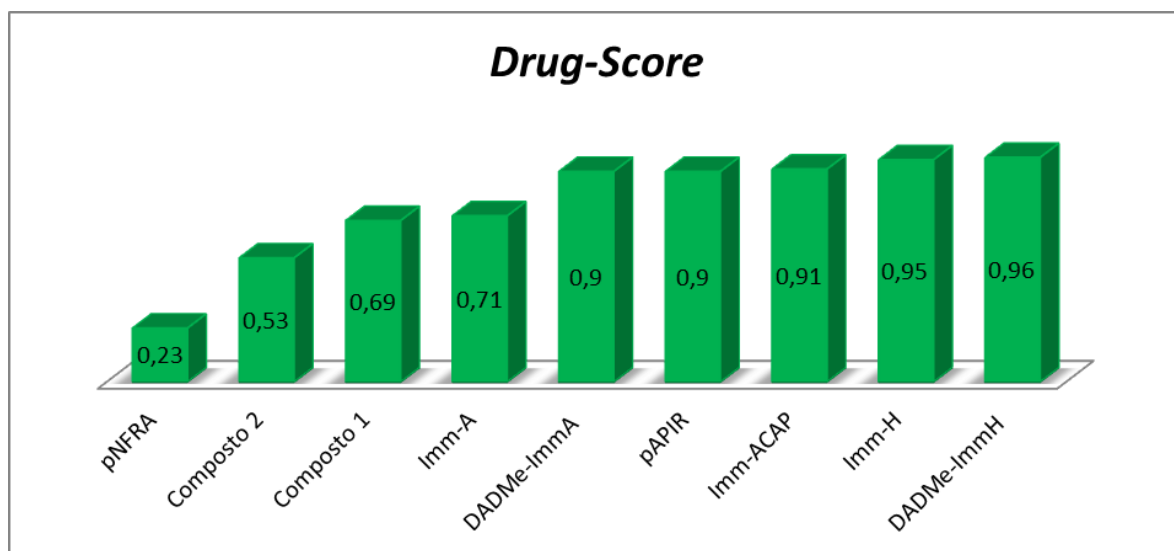


Figura 25: Drug-score dos potenciais inibidores de NH descritos na literatura. Onde Imm representa immucillin, *p*APIR representa *p*-aminofeniliminoribitol e *p*NFRA representa *p*-nitrofenilriboamidrazona.

Os resultados apresentados pelo immucillin-H correspondem com a literatura, uma vez que atualmente o immucillin-H já é comercializado como o fármaco, com o nome de Forodesine® da empresa Norte Americana Biocryst Pharmaceuticals Inc. Esta substância foi descoberta como sendo também um inibidor análogo do estado de transição da enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (KICSKA *et al.*, 2001).

A PNP é uma enzima da via de salvamento de purinas, que catalisa a quebra da inosina, desoxinosina, guanosina e desoxiguanosina à sua respectiva base nitrogenada e açúcar fosfato. Sendo também essencial na proliferação de células-T e células-B (BZOWSKA *et al.*, 2000). Estas células são parte essencial do sistema imune, entretanto quando multiplicam-se de forma incontrolável, podem levar a ocorrência de vários cânceres. Desta forma, a inibição da PNP, leva a supressão seletiva de células T e B, induzindo a apoptose em ambos os tipos celulares (BZOWSKA *et al.*, 2000).

Assim foi concedido pelo *Food and Drug Administration* a liberação do Forodesine® como medicamento para as seguintes indicações: linfoma de células T não-Hodgkin, incluindo o linfoma cutâneo de células T, a leucemia linfóide crônica e leucemias relacionadas, leucemia de células T prolinfocítica, leucemia de células T do adulto, e leucemia de células pilosas (BIOCRYST PHARMACEUTICALS, 2014).

Quando avaliados quanto à biodisponibilidade oral, segundo a “Regra dos Cinco” de Lipinski utilizando o programa Molinspiration

(<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>), os potenciais inibidores de NH apresentaram uma boa absorção oral, uma vez que todos obedeceram ao menos três das quatro regras, que são: (1) apresentar massa molecular ≤ 500 Da; (2) número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; (3) número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (grupos OH ou NH) ≤ 5 ; (4) Log do coeficiente de partição óleo/água (cLog P) ≤ 5 . Conforme pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5: Avaliação da biodisponibilidade oral dos potenciais inibidores de NH, segundo a “Regra dos cinco” de Lipinski.

Potenciais inibidores de NH	PM	nON	nOHNH	cLogP
Immucillin-A	266,257	8	6	-1.087
Immucillin-H	266,257	8	6	-2.404
Immucillin-ACAP	258,278	8	9	-4,08
pAPIR	224,26	5	6	-1,318
DADMe-ImmH	264,285	7	4	-1,314
DADMe-ImmA	293,396	6	4	0,003
Composto 1	341,747	7	4	0,891
Composto 2	325,292	7	4	0,376
p-nitrofenilriboamidrazona	282,256	9	5	-0,636

PM = peso molecular;

nON = nº de átomos aceptores de ligação de hidrogênio;

nOHNH = número de grupos doadores de ligação de hidrogênio;

cLogP = Log do coeficiente de partição óleo/água;

pAPIR = *p*-aminofeniliminoribitol

Imm = immucillin.

5.4 Estudos de *docking* molecular

5.4.1 Estudos de *docking* molecular de substratos da enzima nucleosídeo hidrolase de *T. vaginalis*.

Para realização do estudo de *docking* molecular de substratos da enzima nucleosídeo hidrolase de *T. vaginalis*, primeiramente foi realizado *redocking* molecular do *p*-aminofeniliminoribitol (*p*APIR) na IU-NH de *C. fasciculata* (código PDB 2MAS) no programa AutoDockTools 4.2, o *Grid* (caixa) determinado possui as dimensões de 59 x 62 x 59 pontos e distância entre os pontos de 0,375 Å, sendo centralizado no átomo de hidrogênio (HD1) do aminoácido His241.

Foi obtido um único cluster com 50 conformações. A conformação que mais se aproximou da posição original do *p*APIR presente na estrutura cristalográfica depositada no PDB, foi a primeira, apresentando energia de ligação de -

8,86kcal/mol⁻¹ e um valor de desvio da raiz média quadrada (RMSD) 0,62 Å, (Figura 26).

O valor do RMSD é uma avaliação da semelhança da conformação do *docking* realizado com a conformação presente na estrutura cristalográfica, onde valores de RMSD inferiores a 2 Å são considerados aceitos, ou seja, estão muito próximos da estrutura de referência (RODRIGUES *et al.*, 2012). Diante disso, este parâmetro é uma ferramenta fundamental na análise dos resultados obtidos no *redocking* molecular, uma vez que este visa recuperar a posição original do ligante presente em uma estrutura cristalográfica.

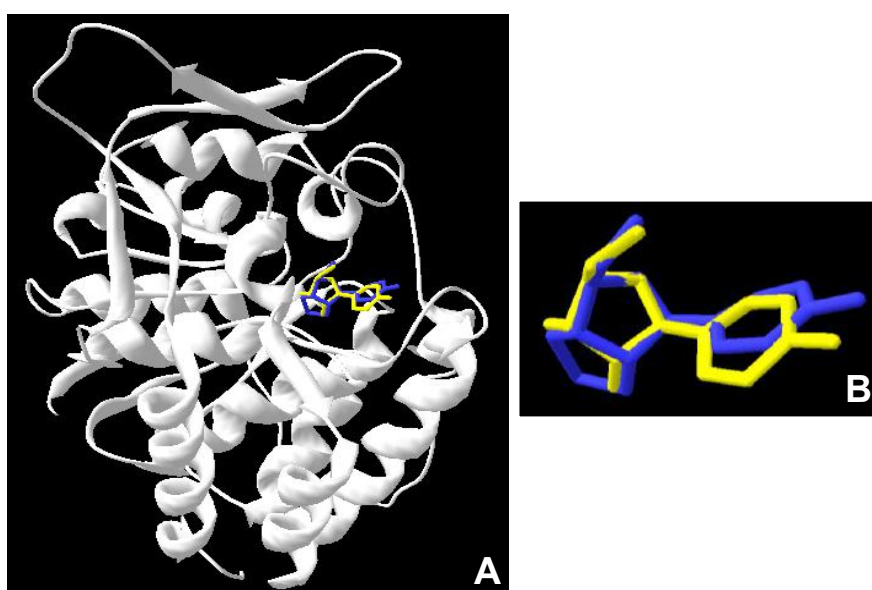


Figura 26: A) *Redocking* molecular do pAPIR na IU-NH de *C. fasciculata*. (B) Sobreposição: em azul representa a conformação original do PDB e em amarelo o *redocking*.

Como descrito na literatura as interações das hidroxilas da ribose com o cálcio, presente no fundo da cavidade do sítio ativo, é essencial para a atividade da enzima, sendo conservada por uma rede de interações que envolvem as hidroxilas do C2', C3' e C5' da ribose e os resíduos que são conservados nos diferentes grupos de NHs (VERSÉES & STEYAERT, 2003).

As distâncias das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio foi de 2,17 Å e 2,55 Å respectivamente, enquanto na estrutura cristalográfica as distâncias das hidroxilas do C2' e C3' ao cálcio foram de 2,49 Å e 2,54 Å, diante disso pode-se dizer que os resultados conseguiram reproduzir o *docking* das hidroxilas no cálcio.

Analisando as interações entre o pAPIR e o sítio ativo da enzima, os resíduos de aminoácidos que interagiram até 4 Å com o pAPIR foram: Asp14, Asn39, Ile81, His82, Asn160, Glu166, Asn168, Tyr225, Tyr229, His241 e Asp242 (Tabela 6), sendo que Asp14, Asn39, Asn160, Glu166, Asn186, Asp242 faziam ligação de hidrogênio. Assim pode-se notar que os resíduos de aminoácidos que interagiram foram aqueles que compõem o sítio ativo da enzima, corroborando com dados descritos na literatura, assim como também as interações encontradas (DEGANO *et al.*, 1996; VERSÉES & STEYAERT, 2003).

Tabela 6: Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o pAPIR, no *redocking* molecular na IU-NH de *C. fasciculata*.

Resíduo	Distância (Å)
Asp14	2,93
Asn39	3,60
Ile81	3,51
His82	3,66
Asn160	3,05
Glu166	2,85
Ans168	2,95
Tyr225	3,32
Tyr229	3,31
His241	3,87
Asp242	2,83

Também foi realizado o *redocking molecular* do Immucillin-H na IAG-NH de *Trypanosoma vivax* (código PDB 2FF2) no programa AutoDockTools 4.2, onde as dimensões da caixa (*Grid*) foram de 59 x 62 x 59 pontos e distância entre os pontos de 0,375 Å, e a mesma foi centralizada no átomo de carbono (CD2) do triptofano 260. Foram obtidos 3 *clusters*, sendo que o de menor energia (-10,5KJ) apresentou 30 conformações. A conformação que melhor reproduziu a conformação do PDB exibiu energia de ligação de -10,48 kcal/mol⁻¹ e RMSD igual a 0,24 Å, conforme pode-se observar na figura 27.

As distâncias das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio no *redocking* foi de 2,34 Å e 2,33 Å respectivamente, e no cristal do PDB a distância das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio foi de 2,34 Å e 2,37 Å respectivamente. Assim pode-se considerar que a conformação presente na estrutura cristalográfica do PDB foi reproduzida, isto também pode ser considerado através do valor de RMSD que foi baixo, sendo assim um resultado apropriado para validar o *docking* molecular.

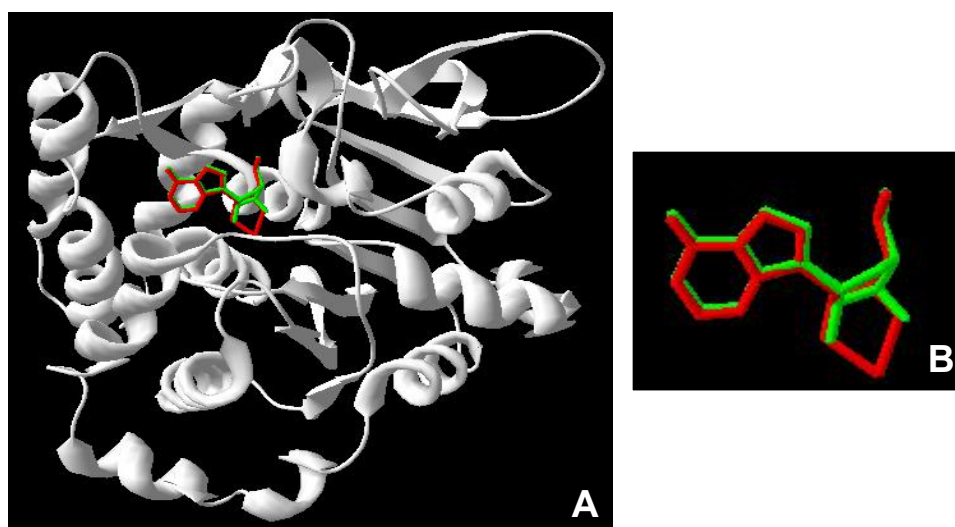


Figura 27: (A) *Redocking* molecular do Immucillin-H na IAG-NH de *T. vivax*. (B) Sobreposição: em vermelho representa a conformação original do PDB e em verde o *redocking*.

Os resíduos de aminoácidos que interagem até 4 Å com o Immucillin-H foram: Asn12, Asp14, Asp40, Trp83, Asn173, Glu184, Asn186, Trp260, Asp261 (Tabela 7), sendo que Asp14, Asp40, Asn173, Glu184, Asn186 e Asp261 faziam ligação de hidrogênio. Além disso, todas as interações observadas estavam descritas na literatura (VERSÉES *et al.*, 2001).

Já foi descrito por Versées *et al.* (2001) que o Trp260, juntamente com Trp83, interagem com a base purínica através de uma interação do tipo π - π *stacking* (VERSÉES *et al.*, 2001). Dentre as interações entre o Immucillin-H e o sítio ativo da enzima, observou-se a ocorrência da interação do tipo π - π *stacking*, onde o Trp260 encontrou-se a 3,61 Å e o Trp83 a 3,96 Å.

Tabela 7: Descrição dos resíduos de aminoácidos que interagem com o Immucillin-H, no *redocking* molecular na IAG-NH de *T. vivax*.

Resíduo	Distância (Å)
Asn12	3,84
Asp14	3,04
Asp40	4,00
Trp83	3,96
Asn173	3,94
Glu184	2,67
Asn186	3,10
Trp260	3,61
Asp261	2,78

Após o estabelecer os parâmetros, através do *redocking* molecular, procedeu-se com a realização do *docking* molecular dos substratos, inosina, adenosina, guanosina, uridina e um substrato sintético (*p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo), de nucleosídeo hidrolase na IU-NH de *C. fasciculata*, na IAG-NH de *T. vivax* e na NH de *T. vaginalis*, com o objetivo de estudar as interações dos substratos nestas enzimas.

O critério utilizado para avaliação e análise dos resultados obtidos, foi as distâncias das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio, e o número de interações entre o substrato e o sítio ativo da enzima e a constante de dissociação (K_d) obtida no *docking* molecular.

Através da análise dos resíduos de aminoácidos que interagiram e as distâncias das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio nos resultados obtidos com o *docking* molecular dos substratos na IU-C β NH, de maneira geral todos os substratos interagiram com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, conforme descrito na literatura. Entretanto pode-se perceber que os substratos que mostraram maior número de interações no sítio ativo da enzima foram a inosina e a uridina, apresentando constante de dissociação (K_d) de 2670 μ M e 234 0 μ M, respectivamente, corroborando com os resultados experimentais descritos na literatura, onde Parkin *et al.* (1991) determinaram experimentalmente a especificidade de substrato da IU-C β NH, e obteve a inosina e a uridina como substratos preferenciais (PARKIN *et al.*, 1991) (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados obtidos com o *docking* molecular dos substratos na IU-NH de *C. fasciculata*.

Substrato	Resíduos	Distância (Å)	Distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca ²⁺ (Å)	Energia de ligação (kcal mol ⁻¹)	K _d (μM)
Inosina	Asp10	1,77	3,98 ; 2,72	-3,51	2670
	Asp14	2,99			
	Asn39	2,75			
	Thr126	3,11			
	Asn168	3,81			
	Asp242	2,42			
Adenosina	Asp10	3,19	3,97 ; 2,68	-2,6	12510
	Asp14	3,30			
	Asn39	1,98			
	Asn168	3,60			
	Asp242	2,39			
Guanosina	Asp10	3,35	3,98 ; 2,70	-1,09	158940
	Asp14	3,05			
	Asn39	2,98			
	Asn168	1,75			
	Asp242	2,49			
Uridina	Asp10	3,61	4,58 ; 3,04	-3,59	2340
	Asp14	2,53			
	Asn39	1,85			
	Asn168	1,93			
	Asp242	2,43			
p-NPR¹	Asn39	1,93	2,50 ; 3,01	-6,14	31,57
	Glu166	1,66			
	Asn168	2,45			
	Asp242	2,85			

1 – *p*-nitrofenil-β-D-ribofuranosídeo (substrato sintético);

K_d – constante de dissociação obtida com *docking* molecular do substrato.

Nos resultados obtidos com o *docking* molecular dos substratos na IAG-NH de *T. vivax*, foi possível observar a interação do tipo π - π *stacking* entre os aminoácidos Trp83 e Trp260 e a base purínica dos substratos inosina, adenosina e guanosina, corroborando com dados da literatura, que descrevem esta interação como sendo a responsável pela especificidade das IAG-NH pela inosina, adenosina e guanosina (Tabela 9) (VERSÉES *et al.*, 2001).

Na figura 28 pode-se observar a sobreposição dos substratos inosina, adenosina, guanósina, uridina e o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo, obtido a partir do *docking* molecular destas moléculas na IAG-NH de *T. vivax*.

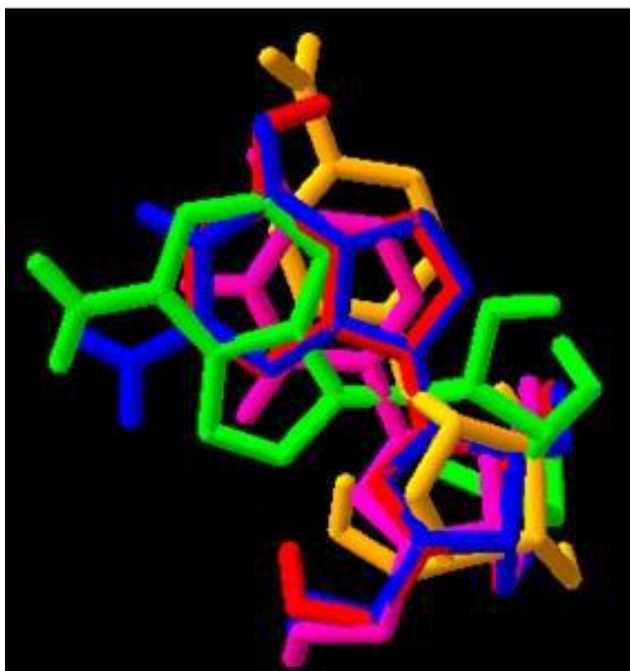


Figura 28: Sobreposição dos substratos obtidos a partir do *docking* molecular na enzima IAG-*Tv*NH. Em vermelho a inosina, em verde a adenosina, em azul a guanósina, em rosa a uridina e em verde o *p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo.

Quanto às distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca^{2+} o substrato guanósina foi o que apresentou o melhor *docking* no cálcio, seguido da inosina, uridina, *p*-NPR e adenosina (Tabela 9). Em relação a K_d apenas o substrato inosina corrobora com o descrito na literatura, como substrato preferencial, apresentando um K_d igual a $1490\mu\text{M}$, enquanto a adenosina e a guanósina apresentaram $12580\mu\text{M}$ e $30750\mu\text{M}$ respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados obtidos com o *docking* molecular dos substratos na IAG-NH de *T. vivax*.

Substrato	Resíduos	Distância (Å)	Distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca ²⁺ (Å)	Energia de ligação (kcal mol ⁻¹)	K _d (μM)
Inosina	Asp40	1,87	2,93 ; 2,91	-3,86	1490
	Trp83	3,42			
	Asn173	2,21			
	Asn184	3,69			
	Asn186	2,10			
	Arg252	2,63			
	Trp260	3,95			
Adenosina	Asp14	2,30	4,38 ; 3,32	-2,59	12580
	Asp15	3,43			
	Asp40	1,75			
	Trp83	3,56			
	Arg252	2,11			
	Trp260	3,75			
Guanosina	Asp40	1,95	2,82 ; 2,86	-2,06	30750
	Trp83	3,51			
	Asn173	2,33			
	Glu184	1,96			
	Asn186	2,42			
	Arg252	2,25			
	Trp260	3,82			
Uridina	Asp40	1,67	2,70 ; 3,28	-2,78	9190
	Trp83	3,77			
	Asn173	2,55			
	Glu184	1,71			
	Asn186	2,17			
	Arg252	1,95			
	Trp260	4,95			
p-NPR¹	Asp40	1,85	3,62 ; 2,29	-5,87	49,56
	Trp83	3,91			
	Thr137	2,93			
	Asn186	2,28			
	Arg252	1,88			
	Trp260	3,93			
	Asp261	4,08			

1 – *p*-nitrofenil-β-D-ribofuranosídeo (substrato sintético);

K_d – constante de dissociação obtida com *docking* molecular do substrato.

No *docking* molecular dos substratos no modelo de NH de *T. vaginalis* as dimensões da caixa (*Grid*) foram 59 x 62 x 59 pontos e distância entre os pontos de 0,375Å, sendo centralizado no átomo de hidrogênio (HE) do aminoácido histidina 86.

O mesmo pode ser considerado satisfatório, uma vez que foi possível observar a interação dos mesmos com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo proposto após a construção do modelo.

Avaliou-se as distâncias das hidroxilas do C2' e C3' da ribose ao cálcio, e o número de interações entre o substrato e o sítio ativo da enzima, sendo selecionada a conformação que apresentasse o maior número de interações com os resíduos e a menor distância.

Os substratos que apresentaram uma menor distância da OH do C2' e C3' ao Ca^{2+} foram a inosina, adenosina e o *p*-NPR. E de maneira geral todos os substratos interagiram com quase os mesmos resíduos de aminoácidos, apenas a adenosina apresentou um maior número de interações com resíduos que não foram observados nos outros substratos (Tabela 10).

Tabela 10: Resultados obtidos com o *docking* molecular dos substratos no modelo de NH de *T. vaginalis*.

Substrato	Resíduos	Distância (Å)	Distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca^{2+} (Å)	Energia de ligação (kcal mol^{-1})	K_d (μM)
Inosina	Asn41	2,44	3,61 ; 3,72	-3,41	3160
	His86	3,08			
	Asn166	3,30			
	Glu172	1,88			
	Asn174	4,31			
Adenosina	Asp12	3,08	4,01 ; 2,83	-2,62	12000
	Asp16	1,81			
	Asn41	2,10			
	Leu131	3,10			
	Met157	3,89			
	Asn174	3,76			
	Asp251	2,66			
Guanosina	Asn41	2,07	5,66 ; 4,78	-3,03	6040
	His86	2,21			
	Asn166	2,12			
	Glu172	1,59			
	Asn174	3,03			
Uridina	Asn41	2,41	5,82 ; 4,86	-3,07	5610
	His86	2,02			
	Asn166	1,95			
	Glu172	1,65			
	Asn174	2,89			
<i>p</i> -NPR ¹	Asn41	2,33	2,79 ; 2,30	-5,85	51,34
	Leu131	2,17			
	Glu172	3,79			
	Asn174	4,03			
	Asp251	1,80			

1 – *p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo (substrato sintético);

K_d – constante de dissociação obtida com *docking* molecular do substrato.

Os valores de constante de dissociação (K_d) obtidos com o *docking* molecular na IU-CfNH, na IAG-TvNH e no modelo de TvgNH, foram comparados com valores de K_M de resultados experimentais por substrato descritos na literatura para IU-CfNH e IAG-TvNH a fim de propor a especificidade de substrato do modelo de NH de *T. vaginalis*.

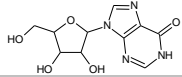
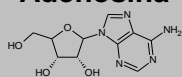
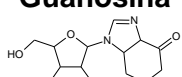

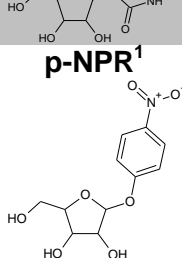
As nucleosídeos hidrolases podem ser classificadas pela especificidade em relação aos substratos que hidrolisam, como bases não-específicas inosina-uridina nucleosídeo hidrolase ou purina-específica inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase e inosina-guanosina nucleosídeo hidrolase (PARKIN *et al.*, 1991; ESTUPIÑÁN & SCHRAMM, 1994; PARKIN, 1996; SHI *et al.*, 1999; VERSÉES *et al.*, 2001).

As não-específicas catalisam a hidrólise de nucleosídeos purínicos e pirimidínicos, como por exemplo a IU-NH de *C. fasciculata* e de *L. major* (PARKIN *et al.*, 1991; SHI *et al.*, 1999). É característico das NHs não-específicas a presença do resíduo His241 no sítio ativo, sendo está responsável pela protonação do N7 da base purínica, etapa que antecede a formação do estado de transição (GOPAUL *et al.*, 1996).

Em contraste, as NH específicas tem preferência por nucleosídeos purínicos, sendo pobres catalisadores para nucleosídeos pirimidínicos, entretanto também realizam a hidrólise destes. Neste grupo encontram-se a IAG-NH de *T. vivax* e IAG-NH de *T. b. brucei*. Versées *et al.* (2003) propuseram que a presença dos resíduos de triptofano (Trp83 e Trp260) na entrada do sítio ativo das NH específicas, estão envolvidos em interações do tipo $\pi-\pi$ *stacking* com a porção da base dos nucleosídeos, sendo estas interações em partes responsáveis pela especificidade da IAG-NH, no qual não é observado nas IU-NH (VERSÉES *et al.*, 2003).

Diante dos resultados apresentados no *docking* molecular, analisando os valores de K_d , e comparando com os resultados experimentais (Tabela 11), sugere-se que a NH de *T. vaginalis* seja base não-específica inosina-uridina nucleosídeo hidrolase, uma vez que apresentou constante de dissociação de 3160 μ M para inosina e 5610 μ M para uridina. Ou seja, teoricamente ela teria preferência por hidrolisar esses substratos, mas também hidrolisa os outros nucleosídeos. Contudo, conforme já foi mencionado, os melhores substratos em relação ao ancoramento no cálcio foram a inosina e a adenosina.

Tabela 11: Comparação entre os valores de K_M obtidos experimentalmente e valores de K_d obtidos no estudo teórico de *docking* molecular para substratos da NH.

Substratos	IU-NH <i>C. fasciculata</i> ^a		IAG-NH <i>T. vivax</i> ^b		NH <i>T. vaginalis</i>	
	K_M (μ M)	K_d (μ M) ^c	K_M (μ M)	K_d (μ M) ^c	K_M (μ M)	K_d (μ M) ^c
Inosina 	380	2670	5.4	1490	***	3160
Adenosina 	460	12510	8.5	12580	***	12000
Guanosina 	420	158940	3.8	30750	***	6040
Uridina 	1220	2340	586	9190	***	5610
p-NPR¹ 	110	31.57	257	49,56	***	51,34

1 – *p*-nitrofenil- β -D-ribofuranosídeo (substrato sintético);

a – PARKIN *et al.*, 1991 e GOPAUL *et al.*, 1996;

b – VERSÉES *et al.*, 2001;

c – Constante de dissociação obtida no *docking molecular* do substrato.

Como dito anteriormente com base nos resultados obtidos no *docking* molecular, propõe-se que a NH de *T. vaginalis* seja do tipo IU-NH. Sabe-se que é característica das IU-NH a presença do aminoácido His241 no seu sítio ativo (GOPAUL *et al.*, 1996), porém no sítio ativo proposto para a NH de *T. vaginalis* após a construção do modelo, percebeu-se a substituição da His241 pela Ala250. E já foi realizado por Gopaul *et al.* (1996) uma mutação sítio dirigida, trocando a His241 por uma alanina, onde percebeu-se que houve um redução expressiva na taxa de hidrólise para substratos, tais como, a inosina (GOPAUL *et al.*, 1996)

Entretanto atualmente, esta classificação quanto especificidade por substrato, tem sido considerada inadequada, e as NH tem sido classificadas quanto à homologia entre as sequências de aminoácidos, em relação à presença de determinados resíduos de aminoácidos, em três grupos: o grupo I que apresentam o resíduo histidina conservado, o grupo II onde a histidina é substituída pelo triptofano e o grupo III, que incluem aquelas NH em que a histidina é substituída por outro

resíduo de aminoácido (GIABBAI & DEGANNO, 2004). Sendo assim, pode-se dizer que a NH de *T. vaginalis* pertenceria ao grupo III em que a histidina é substituída por outro resíduo de aminoácido.

Diante de todos os resultados obtidos, percebe-se a necessidade da realização de estudos bioquímicos e experimentais para se observar a taxa de hidrólise dos substratos diretamente na enzima NH de *T. vaginalis*, podendo assim sugerir a preferência por substrato, bem como já foi realizado e descrito por Shi *et al.* (1999) com a NH de *L. major* e por Cui *et al.* (2001) e Shi *et al.* (1999) e Rennó *et al.* (2012) com a NH de *L. donovani*.

Os potenciais inibidores de nucleosídeo hidrolase *p*-nitrofenilriboamidrazona, *p*-aminofeniliminoribitol, Immucillin-H, Immucillin-A, Immucillin-ACAP, DADMe-ImmucillinH, DADMe-ImmucillinA, e dois compostos que mimetizam ribonucleosídeos purínicos, foram utilizados nos estudos de *docking* molecular na enzima NH de *T. vaginalis*, para este foram utilizados os mesmos parâmetros usados no *docking* molecular dos substratos.

Na análise dos dados teóricos obtidos no *docking* molecular dos potenciais inibidores de NH pode-se perceber que o inibidor que apresentou melhores resultados foi o *p*-nitrofenilriboamidrazona, uma vez que o mesmo na conformação de menor energia exibiu a menor distância da OH C2' e C3' ao cálcio, 2,36 Å e 2,88 Å, respectivamente, mostrando assim uma boa interação com as hidroxilas no cálcio (Tabela 12). Este dado observado corrobora com o descrito na literatura para a família das nucleosídeos hidrolases, pois as mesmas exibem uma rigorosa especificidade pela porção ribose (VERSÉES & STEYAERT, 2003).

O *p*-nitrofenilriboamidrazona também apresentou o maior número de interações (8), com os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo da *TvgNH* (Figura 29), são eles: Asp16, Asp17, Asn41, His86, Leu131, Asn166, Asn174 e Asp251 (Tabela 12).

Tem-se descrito na literatura excelentes resultados para o *p*-nitrofenilriboamidrazona quando o mesmo foi testado experimentalmente frente à IU-NH de *C. fasciculata*, no qual apresentou constante de dissociação em torno de 2 nM (BOUTELLIER *et al.*, 1994).

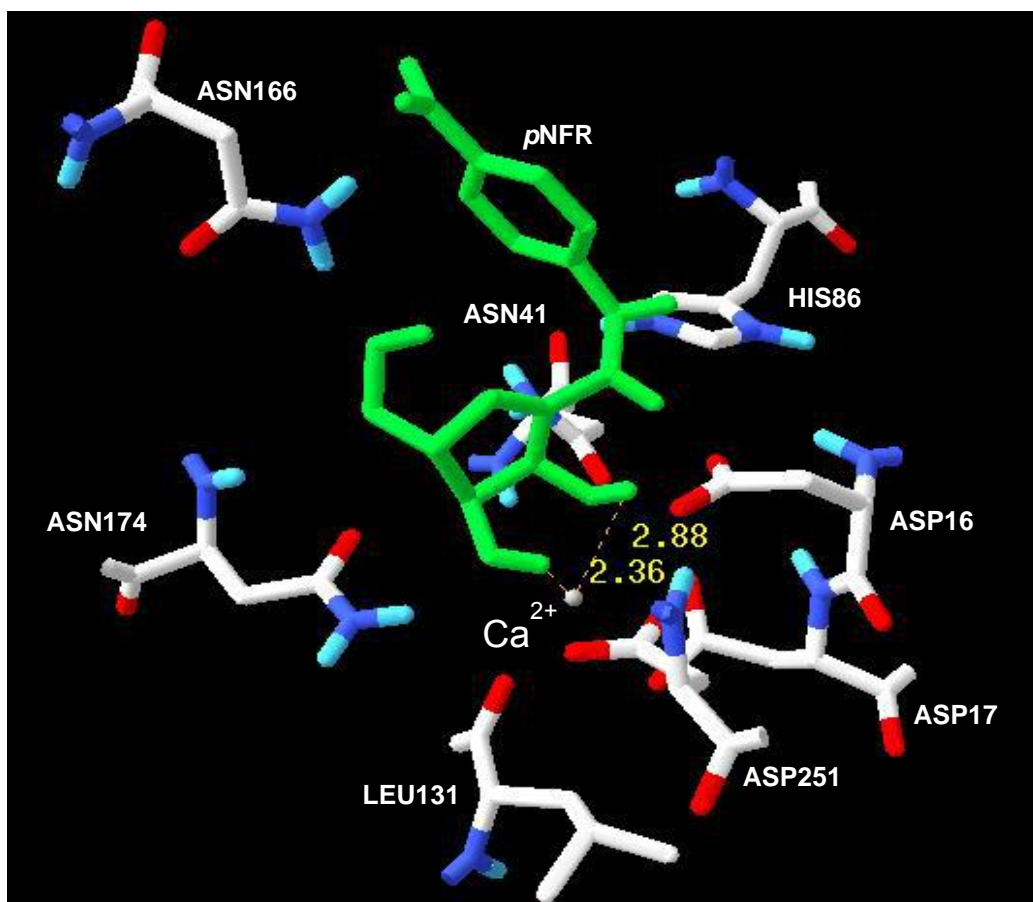


Figura 29: Resíduos de aminoácidos que interagiram com o inibidor *p*-nitrofenilriboamidrazona (pNFR) no *docking* molecular na TvGNH.

Apesar do *p*-nitrofenilriboamidrazona ter se mostrado diante dos resultados obtidos no *docking* molecular como um bom inibidor, nos estudos de toxicidade “*in silico*” realizados no programa *Osiris Property Explorer*, o mesmo apresentou alto alerta de risco tumorigênico e médio para causar mutagênicidade.

Outros dois potenciais inibidores no qual também foram observados bons resultados foram os dois compostos que mimetizam ribonucleosídeos purínicos, estes apresentaram cada um, na conformação de menor energia, seis interações com os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo do modelo (Figura 30).

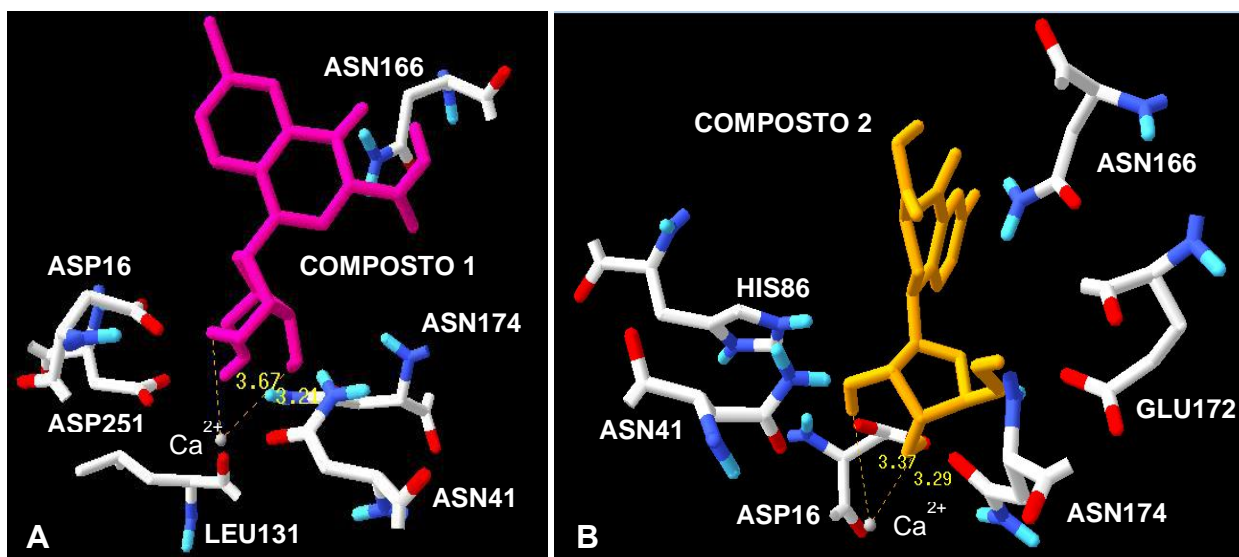
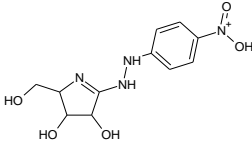
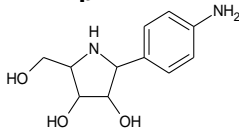
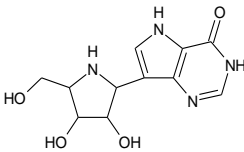
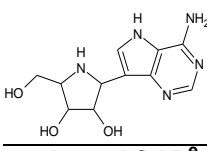
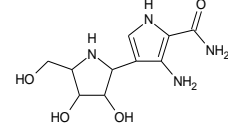


Figura 30: Resíduos de aminoácidos que interagem com o composto 1 (A) e composto 2 (B), no *docking* molecular na *TvgNH*.

Na Tabela 12, também encontram-se descritos os resíduos de aminoácidos que interagem com o composto 1 e o composto 2. Estes potenciais inibidores também apresentaram valores satisfatórios nas distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca^{2+} , 3,67 Å; 3,21 Å e 3,37 Å; 3,29 Å, respectivamente, indicando um bom *docking* das hidroxilas no cálcio presente no fundo da cavidade do sítio ativo.

Tabela 12: Resultados do *docking* molecular dos potenciais inibidores no modelo de TvGNH.

Inibidor	Confômero	Resíduos	Dist. (Å)	Distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca ²⁺ (Å)	Energia de ligação (kcal mol ⁻¹)	K _d (μM)
 <p>pNFRA^a</p>	1	Asp16	2,56	2,36 ; 2,88	-4,95	234,4
		Asp17	3,26			
		Asn41	3,73			
		His86	2,77			
		Leu131	2,20			
		Asn166	2,35			
		Asn174	2,80			
		Asp251	2,20			
 <p>pAPIR^b</p>	1	Asn41	2,96	2,94 ; 2,29	-8,04	1,28
		Leu131	2,64			
		Asn174	2,80			
		Asp251	2,93			
 <p>Imm-H^c</p>	3	Asn41	2,13	4,64 ; 2,90	-1,78	49340
		His86	2,75			
		Leu131	2,72			
		Asn174	2,01			
		Asp251	2,94			
 <p>Imm-A^d</p>	32	His86	1,97	8,76 ; 6,61	-0,35	553860
		Asn166	2,24			
 <p>Imm-ACAP^e</p>	44	Asp16	3,06	5,74 ; 3,69	0,52	----
		Asn41	2,51			
		His86	1,57			
		Ala248	1,81			

a- *p*-nitrofenilriboamidrazona;

b- *p*-aminofeniliminoribitol;

c- Immucillin-H;

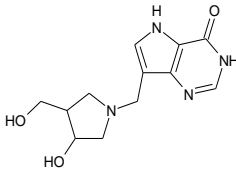
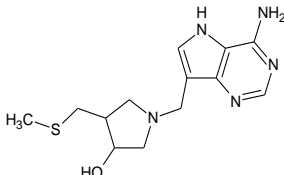
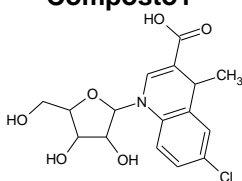
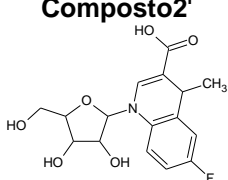
d- Immucillin-A;

e- Immucillin-ACAP;

K_d - Constante de dissociação obtida no *docking* molecular dos potenciais inibidores de NH;

Dist. - Distância.

Continuação da Tabela 12: Resultados do *docking* molecular dos potenciais inibidores no modelo de *TvgNH*.

Inibidor	Confômero	Resíduos	Dist. (Å)	Distâncias da OH do C2' e C3' ao Ca ²⁺ (Å)	Energia de ligação (kcal mol ⁻¹)	K _d (μM)
 DADMe-ImmH ^f	1	Asn41	2,46	---- ; 3,65	-4,31	691,5
		Leu131	2,59			
		Asn174	2,13			
		Ala248	2,10			
		Asp251	1,71			
 DADMe-ImmA ^g	33	Asn41	2,70	---- ; 4,00	-2,06	31190
		Asn174	1,96			
 Composto1 ^h	1	Asp16	1,69	3,67 ; 3,21	-4,15	910,3
		Asn41	3,19			
		Leu131	2,53			
		Asn166	1,99			
		Asn174	2,66			
 Composto2 ^l	1	Asp16	1,91	3,37 ; 3,29	-2,6	12430
		Asn41	3,00			
		His86	2,90			
		Asn166	2,03			
		Glu172	2,06			
Asn174	2,91					

f- DADMe-ImmucillinH;

g- DADMe-ImmucillinA;

h- Composto 1;

l - Composto 2;

K_d - Constante de dissociação obtida no *docking* molecular dos potenciais inibidores de NH;

Dist. – Distância.

Diante dos resultados obtidos no *docking* molecular dos potenciais inibidores, pode-se perceber que dois tipos de inibidores diferentes apresentaram bons resultados para inibição da NH de *T. vaginalis*, um que possui o anel pirimidínico, o *p*-nitrofenilriboamidrazona, e os outros dois que apresentam anel purínico, que são os compostos 1 e 2, desta forma teoricamente as interações apresentadas são semelhantes as interações encontradas na literatura para a nucleosídeo hidrolase não-específica, assim como foi observado com o *docking* molecular dos substratos. Desta forma, ela hidrolisaria tanto substratos purínicos quanto pirimidínicos.

Mediante aos resultados teóricos obtidos, para maior compreensão e determinação, da especificidade por substrato da NH de *T. vaginalis* é necessário à realização de ensaios enzimáticos experimentais de inibição diretamente na enzima.

6 Conclusões

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que a construção do modelo de nucleosídeo hidrolase de *T. vaginalis* foi satisfatório, uma vez que permitiu propor os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima.

Através da análise das diferenças entre os resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo da NH de *T. vaginalis* e o molde IU-NH de *C. fasciculata*, foi possível perceber que essas diferenças físico-químicas entre os resíduos são determinantes para especificidade de substrato da enzima.

O estudo das propriedades farmacocinéticas dos potenciais inibidores mostrou que os mesmos obedeceram a “Regra dos Cincos” de Lipinski. Em relação à toxicidade “*in silico*”, todos apresentaram baixa toxicidade, apenas o *p*-nitrofenilriboamidrazona que exibiu alto alerta de risco tumorigênico e médio para causar mutagenicidade.

A construção do modelo foi fundamental, pois possibilitou o entendimento das interações que envolvem os substratos, os inibidores e o sítio ativo da enzima. Através dos estudos de *docking* molecular tentou-se sugerir a especificidade de substrato da enzima, e pode-se perceber a necessidade da realização de estudos enzimáticos, para se observar a taxa de hidrólise dos substratos diretamente na enzima.

Com os resultados teóricos obtidos no *docking* molecular com os potenciais inibidores também se pode perceber a necessidade de testes enzimáticos de inibição, com estes inibidores, diretamente na enzima NH de *T. vaginalis*, uma vez que inibidores do tipo purínicos (composto 1 e 2) e pirimidínicos (*p*-nitrofenilriboamidrazona) mostram-se bons para a inibição da enzima, logo através destes ensaios seria possível determinar o tipo de NH.

Dessa forma, espera-se ter contribuído no estudo e compreensão das formas de interação da nucleosídeo hidrolases de *T. vaginalis*, seus substratos e potenciais inibidores, onde através da realização de estudos experimentais com a enzima, possa se compreender e confirmar o que foi visto teoricamente.

7 Referências bibliográficas

ADAD SJ, DE LIMA RV, SAWAN ZTE, SILVA MLG, DE SOUZA MAH, SALDANHA JC, FLACO VAA, DA CUNHA AH, MURTA EFC. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. **Revista Paulista de Medicina**, 119(6):200-205, 2001.

ALVES MJ, OLIVEIRA R, BALTEIRO J, CRUZ A. Epidemiologia de *Trichomonas vaginalis* em mulheres. **Rev Port Saúde Pública**, 29(1):27-34, 2011.

ANVISA. Bulário Anvisa. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp#> Acesso em 22 de abr. 2014.

BARRIO AG, RUIZ JJN, PEREIRA DM, GALLEGO ER, FERNÁNDEZ ER, ESCARIO JA. Biological variability in clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 893-896, 2002.

BERENS RL, KRUG ED, MARR JJ. Purine and pyrimidine metabolism. **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites**. Edited by Marr JJ, Muller M, London:Academic Press; p. 89-117, 1995.

BOUTELLIER M, HORENSTEIN BA, SEMENYAKA A, SCHARMM VL, GANEM B. Amidrazone Analogues of D-Ribofuranose as Transition-State Inhibitors of Nucleoside Hydrolase. **Biochemistry**, v. 33, p. 3994-4000, 1994.

BOWDEN FJ, GARNETT GP. Why is *Trichomonas vaginalis* ignored?. **Sex Transm Infect**, v75, p. 372-4, 1999.

BIOCRIST PHARMACEUTICALS. Disponível em <<http://www.biocryst.com/forodesine>> Acesso em 06 de nov. 2014.

BRASIL. Resolução-RDC nº 20, de 5 de Maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:<www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 de Jan. de 2014.

BZOWSKAA A, KULIKOWSKAA E, SHUGAR D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, p. 349-425, 2000.

CHAPMAN A, CAMMACK R, LINSTED D, LLOYD D. The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. **J. Gen. Microbiol**, v. 131, p. 2141–2144, 1985.

COHEN MS, HOFFMAN IF, ROYCE RA, KAZEMBE P, DYER JR, DALY CC, ZIMBA D, VERNAZZA PL, MAIDA M, FISCUS SA, JÚNIOR JJE. Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. **The Lancet**. v. 349, p. 1868-73, 1997.

CONNOR TH, STOECKEL M, EVRARD J, LEGATOR MS. The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in the urine in treated humans and mice. **Cancer Research**, v. 37, p. 629-633, fev. 1977.

CROWELL AL, LEWIS-SANDERS KA, SECOR WE. In Vitro Metronidazole and Tinidazole Activities against Metronidazole-Resistant Strains of *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 1407–1409, Apr. 2003.

CUDMORE SL, DELGATY KL, HAYWARD-MCCLELLAND SF, PETRIN DP, GARBER GE. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 783–793, Oct. 2004.

CUI L, RAJASEKARIAH GR, MARTIN SK. A nonspecific nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*: implications for purine salvage by the parasite. **Gene**, v. 280, p.153-162, 2001.

DRUGBANK 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS. *NucleicAcids Res.* 2011 Jan;39 (Databaseissue):D1035-41. Acesso em 11 de Jan. de 2014.

DRUGS.COM. Disponível em <<http://www.drugs.com/pro/metronidazole.html>> Acesso em 11 de Jan. de 2014.

DUNNE RL, DUNN LA, UPCROFT P, O'DONOGHUE PJ, UPCROFT JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell Research**, 13(4):239-249, 2003.

DEGANO M, GOPAUL DN, SCAPIN G, SCHRAMM VL, SACCHETTINI JC. Three-dimensional structure of the inosina-uridine nucleoside N-ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*, v. 35, p. 5971-5980,1996.

DEGANO M, ALMO SC, SACCHETTINI JC, SCHRAMM VL. Trypanosomal nucleoside hydrolase. A novel mechanism from the structure with transition-state inhibitor. **Biochemistry**, v. 37, p. 6277-6285, 1998.

ESTUPIÑÁN B, SCHRAMM VL. Guanosine-Inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 23068-23073, 1994.

EVANS GB, FURNEAUX RH, GAINSFORD GJ, HANSON JC, KICKSKA GA, SAUVE AA, SCHARMM VL, TYLER PC. 8-Aza-immucillins as Transition-State Analogue Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase and Nucleoside Hydrolases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, nº. 1, 2003.

FAUCI AS, TOUCHETTE NA, FOLKERS GK. Emerging Infectious Diseases:a 10-Year Perspective from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, nº. 4, abr. 2005.

FEITTOSA CF, CONSOLARO MEL. Tricomoníase: aspectos gerais e diagnóstico pela colpocitologia de Papanicolaou. Umuarama, **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, 9(3), out. 2005.

FOUTS AC, KRAUS SJ. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. **J. Infect. Dis.** v. 141, p. 137–143, 1980.

FRANÇA TCC, ROCHA MRM, REBOREDO BM, RENNÓ MN, TINOCO LW, Villar JDF. Design of Inhibitors for Nucleoside Hydrolase from *Leishmania donovani* using Molecular Dynamics Studies. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, nº. 1, p. 64-73, 2008.

FUNG HB, DOAN TL. Tinidazole: A Nitroimidazole Antiprotozoal Agent. **Clinical Therapeutics**, v. 27, nº 12, 2005.

FURNEAUX RH, SCHRAMM VL, TYLER PC. Transition State Analogue Inhibitors of Protozoan Nucleoside Hydrolases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 2599-2606, 1999.

GARBER GE. The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **Can J Infect Dis Med Microbiol.** v. 16, nº 1, fev. 2005.

GARDNER TB, HILL DR. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 14, p. 114-128, 2001.

GIABBAI, B. & DEGANI, M. Crystal structure to 1.7 Å of the *Escherichia coli* pyrimidine nucleoside hydrolase YeiK, a novel candidate for cancer gene therapy. **Structure**, v. 12, p. 7309-749, 2004.

GOPAL DN, MEYER SL, DEGANI M, SACCHETTINI JC, SCHRAMM VL. Inosine-Uridine Nucleoside Hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Genetic Characterization, Crystallization, and Identification of Histidine 241 as a Catalytic Site Residue. **Biochemistry**, v. 35, p. 5963-5970, 1996.

GRAMA DF, CASAROTTI LS, MORATO MGVA, SILVA LS, MENDONÇA DF, LIMONGI JE, VIANA JC, CURY MC. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and risk factors in women treated at public health units in Brazil: a transversal study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 107, p. 584–591, 2013.

HAMMOND DJ, GUTTERIDGE WE. Purine and pyrimidine metabolism in the *Trypanosomatidae*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 13, p. 243-261, 1984.

HEINE P, MCGREGOR JA. *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. **Clin Obstet Gynecol**, v. 36, p. 137- 144, 1993.

HOBBS MM, SEÑA AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. **Sex Transm Infect**, v. 89, p.434–438, 2013.

HORENSTEIN BA, PARKIN DW, ESTUPINAN B, SCHARMM VL. Transition state analysis of nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. **Biochemistry**, v. 30, 10788-10795, 1991.

HORENSTEIN BA, ZABINSKI RF, SCHRAMM VL. A new class of C-nucleoside analogues. 1-(S)-aryl-1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitols, Transition State Analogue Inhibitors of Nucleoside Hydrolase. **Tetrahedron Letters.**, v. 34, n° 45, p. 7213-7216, 1993.

KERSCHER L, OESTERHELT D. Pyruvate:ferredoxin oxido reductase—new findings on an ancient enzyme. **Trends Biochem. Sci.** v. 7, p. 371–374, 1982.

KHARSANY ABM, HOUSEN AA, MOODLEY J, BAGARATEE J, GOUWS E. The association between sexually transmitted pathogens and cervical intra-epithelial neoplasia in a developing community. **Genitourin Med**, v. 69, p. 357-60, 1993.

KICKSKA GA, LONG L, HORIZ H, FAIRCHILD C, TYLER PC, FURNEAUX RH, SCHRAMM VL, KAUFMAN HL. Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes. **PNAS**, v. 98 n°. 8, p. 4593–4598, April 10, 2001.

KULDA J, TACHEZY J, CERKASOVOVA A. *In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, p. 262–269, 1993

KULDA J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **Int J. Parasitol**, v. 29, p. 199-212, 1999.

KURTZ J-E, EXINGER F, ERBS P, JUND R. The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, 41:132-141, 2002.

LAND KM, JOHNSON PJ. Molecular Mechanisms Underlying Metronidazole Resistance in Trichomonads. **Experimental Parasitology**, v. 87, p. 305–308, 1997.

LINDMARK DG, MULLER M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.10, p. 476–482, 1976.

LIPINSKI CA, LOMBARDO F, DOMINY BW, FEENEY PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n° 1-3, p. 3-26, 2001.

LLOYD D, KRISTENSEN B. Metronidazole inhibition of hydrogen production in vivo in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. **J. Gen. Microbiol**, v. 131, p. 849–853, 1985.

LLOYD D, YARLETT N, YARLETT NC, PEDERSON JZ, KRISTENSEN B. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* maintain low intracellular metronidazole radical anion levels as a consequence of defective oxygen scavenging. **Acta Universitatis Carolinae-Biology**, v. 30, p. 521–528, 1988.

LEHKER MW, ALDERETE JF. Biology of trichomonosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v. 13, p. 37-45, 2000.

LÓPEZ LB, BRAGA MBM, LÓPEZ JO, ARROYO R, FILHO FCS. Strategies by which some pathogenic Trichomonads integrate diverse signals in the Decision-making process. *An. Acad Bras. Ci*, 72 (2), 2000.

MACIEL GP, TASCA T, CARLI GA. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. *Bras Patol Med Lab*. v.40, nº3, p.152-60, junho, 2004.

MEINGASSNER JG, THURNER J. Strain of *Trichomonas vaginalis* Resistant to Metronidazole and Other 5-Nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 254-257, fev. 1979.

MENDZ GL, MÉGRAUD F. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? *Trends Microbiol*, v. 10, p. 370-5, 2002.

MERI T, JOKIRANTA TS, SUHONEN L, MERI SEPPO. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole: Report of the First Three Cases from Finland and Optimization of In Vitro Susceptibility Testing under Various Oxygen Concentrations. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 763–767, fev. 2000.

MICHEL RV, BORGES FP, WILTUSCHNIG RCM, NEVES FG, RIBEIRO J, VIEIRO RC, VIEIRA PB, BOHNS GR, TASCA T, DE CARLI GA. Prevalência da tricomonose em mulheres residentes na Vila dos Papeleiros em Porto Alegre, RS. *Rev. Bras. Análises Clínicas*, v. 38(2): 127-130, 2006.

MILLER RL, LINDSTEAD D. Purine and pyrimidine metabolizing activities in *Trichomonas vaginalis* extracts. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 7, p. 41-51, 1983.

MIRANDA AE, VARGAS PM, LOUIS ME, VIANA MC. Sexually transmitted diseases among female prisoners in Brazil: prevalence and risk factors. *Sex. Transm. Dis.*, v. 27, p. 491-495, 2000.

MITTERBAUER R, KARL T, ADAM G. *Saccharomyces cerevisiae* URH1 (Encoding Uridine-Cytidine N-Ribohydrolase): Functional Complementation by a Nucleoside Hydrolase from a Protozoan Parasite and by a Mammalian Uridine Phosphorylase. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1336–1343, mar. 2002.

MORAN M, GUZMAN J, ROPARS AL, MCDONALD A, JAMESON N, OMUNE B, RYAN S, LINDSEY W. Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending? *PLoS Medicine*, v. 6, n. 2, 2009.

MORRIS GM, HUEY R, LINDSTROM W, SANNER MF, BELEW RK, GOODSSELL DS, OLSON AJ. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated *docking* with selective receptor flexibility". *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n.16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MURZIN AG, BRENNER SE, HUBBARD T, CHOTHIA C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, v. 247, p. 536-540, 1995.

NARCISI EM, SECOR WE. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 40, p. 1121–1125, 1996.

NEVES DP, DE MELO AL, LINARDI PM, VITOR RWA. Parasitologia Humana, São Paulo, ed. Atheneu, 11^a ed., 2005, cap. 13,.

OGAWA J, TAKEDA S, XIE S-X, HATANAKA H, ASHIKARI T, AMACHI T, SHIMIZU S. Purification, characterisation, and gene cloning of purine nucleosidase from *Ochrobactrum anthropi*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 1783-1787, 2001.

OLIVEIRA PM, MASCARENHAS RT, FERRER SR, OLIVEIRA RPC, TRAVESSA IEM, GOMES MVC, GRASSI MFR. Vulvovaginites em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 30(3):121-6, 2008.

OMS - The world health report 2000—health systems: improving performance. *World Health Organization*. Geneva: World Health Organization; 2000

OMS – Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections Overview and Estimates. *World Health Organization*. Geneva: World Health Organization; 2001.

OMS- The world health report 2004—changing history. *World Health Organization*. Geneva: World Health Organization, 2004.

OMS –Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *syphilis*, and *Trichomonas vaginalis*: methods and results used by the WHO to generate 2005 estimates. *World Health Organization*. Geneva: World Health Organization, 2011.

OMS –Global Incidence and Prevalence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections 2008. *World Health Organization*. Geneva: World Health Organization, 2012.

ORENGO CA, MICHIE AD, JONES S, JONES DT, SWINDELLS MB, THORNTON JM. CATH - a hierarchic classification of protein domain structures. **Structure**, v. 5, p. 1093-1108, 1997.

PARKIN DW, HORENSTEIN BA, ABDULAH DR, ESTUPIÑÁN B, SCHRAMM VL. Nucleoside Hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 20658-20665, 1991.

PARKIN DW. Purine-specific nucleoside N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, specificity, and kinetic mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 21713-21719, 1996.

PELLÉ R, SCHRAMM VL, PARKIN DW. Molecular cloning and expression of a purine-specific N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Sequence, expression, and molecular analysis. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 2118-2126, 1998.

PETERSEN C, MOLLER LB. The RihA, RihB, and RihCribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 884-894, 2001.

PETRIN D, DELGATY K, BHATT R, GARBER G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microbiol Rev**, v.11, p. 300-17, 1998.

QUON DV, D'OLIVEIRA CE, JOHNSON PJ. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.. 89, p. 4402-4406, 1992.

RENNÓ MN, FRANÇA TCC, NICO D, DE SOUSA CBP, TINOCO LW, VILLAR JDF. Kinetics and *docking* studies of two potential new inhibitors of the nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 301-307, 2012.

RIBEIRO JM, VALENZUELA JG. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedesa egypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, p. 13-22, 2003.

ROBINSON SC. Trichomonal vaginitis resistant to metronidazole. **Canad. Med. Ass.**, vol. 86, abr. 1962.

RODRIGUES RP, MANTOANI SP, de ALMEIDA JR, PINSETTA FR, SEMIGHINI EP, da SILVA VB, da SILVA CHO. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Rev. Virtual de Quim**, v. 4, nº 6, p. 739-776, 2012.

SANDER T. Toxicity Risk Assessment. Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland, 2001. Disponível em <<http://www.organic-chemistry.org/prog/>>, Acesso em 24 mar. 2014.

SANNER MF. Python: a programming language for software integration and development. **J. Mol Graphics Mod.**, v. 17, p 57-61, fev, 1999.

SANTOS FILHO AO, ALENCASTRO RB. Modelagem de proteínas por homologia. **Quim. Nova**, v. 26, nº. 2, p. 253-259, 2003

SCHWEBKE JR, BURGESS D. Trichomoniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 794–803, Oct. 2004.

SEBITLOANE MH. HIV and gynaecological infections. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, 19(2):231-41, 2005.

SHI W, SCHRAMM VL, ALMO SC. Nucleoside Hydrolase from *Leishmania major*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, nº. 30, p. 21114–21120, Issue of July 23, 1999.

SIMÕES-BARBOSA A, FEIJÓ GC, DA SILVA JX, LEAL IIR, BARBOSA TWP. A six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasilia, the capital of Brazil. **Bras. J. Infect. Dis.**, v. 6, p. 110-117, 2002.

SHAFIR SC, SORVILLO FJ, SMITH L. Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, p. 37–45, 2009.

SOPER DMD. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, p. 281-9, 2004.

SORVILLO F, SMITH L, KERNDT P, ASH L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerg Infect Dis**, v. 7, p. 927-32, 2001.

SWYGARD H, SENA AC, HOBBS MM, COBEN MS. Trichomoniasis: clinical manifestations diagnosis and management. **Sex Transm Infect**, v. 80, p. 91-95, 2004.

THURMAN AR, DONCEL GF. Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, p. 89–98, 2011.

UOCROFT P, UPCROFT JA. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 150–164, jan. 2001.

UPCROFT P, UPCROFT JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 14, p. 150–164, 2001.

VÁSQUEZ F, LEPE JA, OTERO L, BLANCO MA, AZNAR J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, p. 32-37, 2008.

VERSÉES W, DECANNIERE K, PELLÉ R, DEPOORTER J, BROSENS E, PARKIN DW, STEYAERT J. Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. **J. Mol. Biol.**, v. 307, p. 1363-1379, 2001.

VERSÉES W, STEYAERT J. Catalysis by nucleoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, p. 731–738, 2003.

VERSÉES W, VAN HOLSBEKE E, DE VOS S, DECANNIERE K, ZEGERS I, STEYAERT J. Cloning, preliminary characterization, and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditi selegans* and *Campylobacter jejuni*. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 59, p. 1087-1089, 2003.

VIDAKOVIC M, CROSSNOE CR, NEIDRE C, KIM K, KRAUSE KL, GERMANAS JP. Reactivity of reduced [2Fe-2S] ferredoxins parallels host susceptibility to nitroimidazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 302–308, Jan. 2003.

VERSÉES W, BARLOW J, STEYAERT J. Transition-state Complex of the Purine-specific Nucleoside Hydrolase of *T. vivax*: Enzyme Conformational Changes and Implications for Catalysis. **J. Mol. Biol.**, v. 359, p. 331–346, 2006.

VOOLMANN T, BOREHAM P. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. **Med. J. Aust.**, p. 159:490, 1993.

WANG CC, CHENG HW. Salvage of pyrimidine nucleosides by *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol.**, 10(2):171-84, fev 1984.

WENDEL KA, ERBELDING EJ, GAYDOS CA, ROMPALO AM. *Trichomonas vaginalis* Polymerase Chain Reaction Compared with Standard Diagnostic and Therapeutic Protocols for Detection and Treatment of Vaginal Trichomoniasis. **Clinical Infectious Diseases**; v. 35, p. 576–80, 2002.

YARLETT N, YARLETT NC, LLOYD D. Metronidazole-resistant clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* have lowered oxygen affinities. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, p. 111–116, 1986.

ZORATI GC, DE MELLO AS. Incidência da Tricomoníase em Mulheres Atendidas pelo Sistema Único de Saúde em Cascavel e no Oeste do Paraná. Umuarama, **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v.13, nº 2, p.133-138, ago, 2009.