UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E FUNCIONAL DAS *OLD YELLOW ENZYMES* DE *Leishmania braziliensis* E *Trypanosoma cruzi*

Laudimir Leonardo Walbert Veloso da Silva

São Carlos – SP

2019

LAUDIMIR LEONARDO WALBERT VELOSO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E FUNCIONAL DAS *OLD YELLOW ENZYMES* DE *Leishmania braziliensis* E *Trypanosoma cruzi*

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Professor Dr. Júlio César Borges

São Carlos – SP

2019

Esta tese é dedicada aos meus pais, Antonio Francisco Leite da Silva e Maria de Fátima Veloso da Silva, que desde sempre buscaram me incentivar e encorajar para os estudos, apesar de eles próprios não terem tido essa oportunidade. Dedico ainda à minha irmã querida, Leidiane Veloso, e minha sobrinha, Ariádne Miréia, pelo carinho e incentivo genuíno demonstrado ao longo de todo o processo. Por fim, mas não menos importante, dedico à minha esposa, Tarcilane Fernandes, que encarou, sofreu e vibrou junto comigo a cada pedra e conquistas encontrada ao longo do percurso.

AGRADECIMENTOS

Essa é, sem sombra de dúvidas, a parte mais difícil de escrever, até porque muitas pessoas, de algum modo, contribuíram para minha chegada até aqui. Irei apenas pontuar uma pequena parte de um grupo amplo que muito me ajudou ao longo desses 4 anos de trabalho.

Evidentemente, o primeiro nome a quem devo citar e agradecer enormemente pelo trabalho desenvolvido é o **Prof. Dr. Júlio César Borges**, que representou para mim um verdadeiro pai acadêmico, demonstrando por inúmeras vezes preocupação genuína com minha formação acadêmica, fazendo críticas construtivas e sugestões que não só contribuíram para o trabalho como um todo, mas também para minha formação pessoal e acadêmica. Agradeço de coração por ter compartilhado sua experiência acadêmica comigo e por ter sempre exigido o melhor de mim.

Um bom orientador sem uma boa estrutura certamente de pouco adiantaria para minha formação e é por isso que devo externar meu sentimento de gratidão a toda infraestrutura oferecida pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos, em especial ao Centro de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) e ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBBP), que me forneceram suporte para que eu realizasse os experimentos dentro do prazo de que dispunha para defesa da tese.

Devo agradecer também a todos os professores do IQSC por terem compartilhado comigo um pouco do vasto conhecimento adquirido ao longo de anos de estudo e trabalho árduo.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), ambos do Centro Nacional de Pesquisas em

Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas - SP, por disponibilizarem a infraestrutura necessária ao desenvolvimento de parte deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida e ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio e financiamento da pesquisa.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, em especial à grande amiga e irmã **Noeli Soares** e **Daya Bertolino**, por ter representado para mim uma extensão da minha família em São Carlos e pelo incentivo e força para que eu pudesse seguir firme no meu projeto de vida. Agradeço também aos amigos e parceiros de luta **Arthur Pereira** e **Leonardo Yoshida** pela boa convivência e momentos memoráveis de aprendizagem compartilhada.

À minha esposa, **Tarcilane Fernandes**, por dividir comigo o sonho da docência e da vida acadêmica. Agradeço ainda pelo incentivo e confiança depositada em mim.

À minha família, em especial meus pais **Chico Leite** e **Fátima Veloso**, minha irmã, **Leidiane Veloso** e minha sobrinha, **Ariádne Miréia**, pelo suporte emocional e apoio incondicional que me deram desde o início da minha vida acadêmica.

Por fim, agradeço a Deus pela oportunidade do aprendizado, por ter me permitido trilhar os caminhos que me conduziram a essa conquista e pelas pessoas que foram criteriosamente selecionadas e colocadas na minha vida, que me oportunizaram o desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço ainda pelos enormes desafios diários ao qual fui submetido e pela capacidade em superá-los e àqueles que não foram citados nominalmente, mas, que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento do trabalho e também de minha formação acadêmica, sintam-se abraçados e contemplados com os meus sinceros agradecimentos.

"[ENG] *(...) And bad mistakes, I've made a few. I've had my share of sand kicked in my face, but I've come through. And we mean to go on and on and on and on (...)".*

"[POR] *(...) E erros sérios, cometi poucos. Eu tive meu pouco de areia atirada sobre minha face, mas eu sobrevivi. E nós pretendemos continuar, continuar e continuar (...)".*

(Trecho da música *We are the champions* composto por Freddie Mercury lançada em outubro de 1977 pela banda britânica Queen no álbum *News of the Word*.).

RESUMO

As enzimas desempenham papéis essenciais no metabolismo celular. A ausência ou inativação delas podem trazer sérios prejuízos para o desempenho fisiológico de um organismo. Algumas enzimas são comuns a todos os organismos, outras, por sua vez, podem estar ausentes em determinados grupos biológicos, o que pode representar um excelente ponto de partida para estudos bioquímicos que objetivam o desenvolvimento de fármacos mais efetivos. Nesse sentido, é destacado neste trabalho um grupo de enzimas conhecidas como *Old Yellow Enzyme* (OYE), que são comumente encontradas em bactérias, leveduras, plantas, protozoários, mas estão ausentes em mamíferos. Conhecer a relação estrutura-função dessas proteínas pode trazer alternativas para tratamentos de doenças nas quais o agente etiológico depende da funcionalidade de uma OYE. Dessa forma, doenças negligenciadas, como as leishmanioses e doença de Chagas tornam-se um alvo interessante para o estudo dessas proteínas. Já foi demonstrado o papel que a OYE de *Trypanosoma cruzi* (TcOYE) desempenha no metabolismo das prostaglandinas, contudo, os dados sobre o comportamento dessas enzimas frente a vários compostos descritos como substratos e a descrição do papel fisiológico dessas proteínas não é completamente compreendido. Além disso, não há informações estruturais e funcionais sobre a OYE de *Leishmania braziliensis* (LbOYE) na literatura. Assim, um dos principais objetivos desse trabalho de doutorado foi determinar parâmetros estruturais e funcionais das proteínas LbOYE e TcOYE e analisá-los de forma comparativa. Os resultados apresentados sugerem que a LbOYE foi obtida em sua forma enovelada e que a mesma apresenta uma forma sutilmente mais alongada que sua ortóloga TcOYE. Adicionalmente, os resultados de CD, DSC e SAXS também mostram que a proteína LbOYE apresenta menor estabilidade estrutural e maior flexibilidade comparada à TcOYE. Os ensaios de prospecção para os ligantes apresentados nesse trabalho mostraram que as enzimas foram obtidas em sua forma funcional e que o composto menadiona foi o que apresentou menor afinidade de interação dentre os compostos avaliados. Além disso, testes de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio com a proteína TcOYE se mostraram efetivos para determinação de moduladores da atividade funcional da proteína. Este trabalho é pioneiro na caracterização estrutural e funcional da LbOYE.

ABSTRACT

Enzymes play key roles in cellular metabolism. The absence or inactivation of them can cause serious damage to the physiological performance of an organism. Some enzymes are common to all organisms; others, in turn, may be absent in certain biological groups, which may represent an excellent starting point for biochemical studies aiming at the development of more effective drugs. In this sense, it is highlighted in this work a group of enzymes known as Old Yellow Enzyme (OYE), which are commonly found in bacteria, yeasts, plants, protozoa, but are absent in mammals. Knowing the structure-function relationship of these proteins may provide alternatives for treatments of diseases in which the etiological agent depends on the functionality of an OYE. Thus, neglected diseases such as leishmaniasis and Chagas' disease become an interesting target for the study of these proteins. The role that *Trypanosoma cruzi* OYE (TcOYE) plays in the metabolism of prostaglandins has been demonstrated, however, data on the behavior of these enzymes against various compounds described as substrates and the physiological role of these proteins is not fully understood. In addition, there is no structural and functional information on the OYE of *Leishmania braziliensis* (LbOYE) in the literature. Thus, one of the main objectives of this doctoral work was to determine structural and functional parameters of LbOYE and TcOYE proteins and to analyze them in a comparative way. The presented results suggest that the LbOYE was obtained in its folded form and that it presents a subtly more elongated form than its ortholog TcOYE. In addition, the results of CD, DSC and SAXS also show that the LbOYE protein presents lower structural stability and greater flexibility compared to TcOYE. The ligand prospecting trials presented in this study showed that the enzymes were obtained in their functional form and that the menadione compound had the lowest interaction affinity among the evaluated compounds. In addition, low oxygen pressure enzymatic activity tests with the TcOYE protein proved to be effective for the determination of modulators of the protein functional activity. This work is a pioneer in the structural and functional characterization of LbOYE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania spp.* 4
Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 7
Figura 3: Estrutura Química dos compostos utilizados no tratamento da Doença de Chagas. 8
Figura 4: Estados redox da flavina com os respectivos valores de pKa 13
Figura 5: Sistema reacional de Christian & Warburg. 15
Figura 6: Estrutura do grupo prostético FMN e a coloração conferida às proteínas que o possuem. 15
Figura 7: Estrutura canônica da proteína TcOYE (*PDB entry:* 4E2B). 18
Figura 8: Espectro de absorbância no UV-Vis do FMN. 23
Figura 9: Ciclo catalítico das OYEs 24
Figura 10: Estrutura genérica de um composto carbonílico α/β-insaturado. 25
Figura 11: Estrutura química do lapachol (2) e do seu derivado, isolapachol (1). 26
Figura 12: Alinhamento das sequências de aminoácidos LbOYE e TcOYE com OYEs homólogas. 41
Figura 13: Gel SDS-PAGE 15% das frações obtidas durante a expressão e purificação da LbOYE. 43
Figura 14: Espectro de CD para proteína LbOYE 44
Figura 15: Fluorescência intrínseca do Trp para as proteínas em estudo. 45
Figura 16: Caracterização hidrodinâmica da proteína LbOYE. 46
Figura 17: Resultados dos ensaios de SAXS para proteína LbOYE. 47
Figura 18: Experimentos de estabilidade térmica e química das proteínas LbOYE e TcOYE. 49
Figura 19: Distância relativa dos resíduos de triptofano da proteína TcOYE e o grupo prostético FMN. 50
Figura 20: Estrutura química dos ligantes testados contra as proteínas recombinantes TcOYE e LbOYE. 51
Figura 21: Interação da LbOYE com o ligante Isolapachol a 298 K. 52
Figura 22: Interação da LbOYE com o ligante α-lapachol a 298 K. 53
Figura 23: Interação da LbOYE e TcOYE com o ligante menadiona a 298 K. 54
Figura 24: Interação da proteína TcOYE com o ligante [AuCl(L1)] em diferentes temperaturas. 55
Figura 25: Interação da proteína TcOYE com o ligante [PdI(HL1)] em diferentes temperaturas. 56
Figura 26: Interação da proteína TcOYE com o ligante [PtI(HL1)] em diferentes temperaturas. 57
Figura 27: Interação da proteína TcOYE com o ligante HFedtc em diferentes temperaturas. 58
Figura 28: Interação da proteína TcOYE com o ligante [Ni(Fedtc)$_2$] em diferentes temperaturas. 59
Figura 29: Interação da proteína TcOYE com o ligante [Pd(Fedtc)$_2$] em diferentes temperaturas. 60
Figura 30: Atividade enzimática da TcOYE em condições aeróbicas. 62
Figura 31: Ensaios de atividade enzimática para proteína TcOYE. 63
Figura 32: Ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio para proteína TcOYE. 64
Figura 33: Ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio para proteína LbOYE. 65

Figura 34: Ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio para proteína TcOYE. A., B. e C...... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas 11
Tabela 2: Alguns representantes da família OYE. As quatro primeiras proteínas são representantes da subfamília clássica e as quatro últimas são representantes da subfamília Thermophilic-like. 20
Tabela 3: Relação de soluções-tampão utilizadas para purificação e caracterização das proteínas-alvo 30
Tabela 4: Propriedades físico-químicas das proteínas recombinantes 32
Tabela 5: Matriz de identidade percentual de alguns membros da família OYE. 42
Tabela 6: Propriedades estruturais e espectroscópicas das proteínas recombinantes 45
Tabela 7: Resumo das propriedades estruturais e hidrodinâmicas para proteína LbOYE 48
Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos para os ensaios de desenovelamento térmico e químico por DSC e espectrometria de fluorescência, respectivamente. 49
Tabela 9: Resumo dos valores de coeficiente de extinção molar de excitação (295 nm) e emissão para cada um dos ligantes avaliados. 52
Tabela 10: Resumo dos resultados obtidos pelos ensaios de supressão de fluorescência com a proteína LbOYE. 60
Tabela 11: Resumo dos resultados obtidos pelos ensaios de supressão de fluorescência com a proteína TcOYE. 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

θ: Elipticidade, representa o sinal de dicroísmo circular. É dado em graus (Deg – acrônimo para o termo em inglês *Degree*).

[θ]: Elipticidade molar residual, representa o valor normalizado para θ corrigido para concentração e número de aminoácidos da proteína. É o parâmetro utilizado para estimar estrutura secundária em proteínas e outros polímeros.

λ: Comprimento de onda.

$\lambda_{máx}$: Comprimento de onda máximo.

<λ>: Centro de massa espectral.

Å: Ângström, unidade de medida de comprimento (1 Å = 10^{-10} metros)

AA: Ácido araquidônico.

aSEC: Cromatografia de exclusão molecular analítica (acrônimo para o termo em inglês: *analytical size exclusion chromatography*).

SV-AUC: Ultracentrifugação Analítica (acrônimo para o termo em inglês *analytical ultracentrifugation*).

ATP: Adenosina Trifosfato

Bz: Benznidazol

CD: Dicroísmo circular (acrônimo para o termo em inglês *circular dichroism*).

C_m: Concentração média de agente desnaturante na transição, onde 50% de espécies proteicas estão enoveladas e 50% desenoveladas;

CTC: Complexo de transferência de carga.

COX-2: Ciclooxigenase 2

Da: Dalton, unidade de massa atômica (1 Da ≈ 1,7 x 10^{-24} gramas).

DSC: Calorimetria de varredura diferencial (acrônimo para o termo em inglês *differential scanning calorimetry*).

DN: Doença Negligenciada.

ee: Excesso enantiomérico.

f/f_0: Razão entre o coeficiente friccional experimental e o coeficiente friccional de uma esfera rígida de igual massa molecular à proteína de interesse.

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo.

FMN: Flavina mononucleotídeo.

FMNred: Flavina mononucleotídeo reduzido

GF: Gel filtração

GndCl: Cloridrato de guanidina

His_6-tag: Acrônimo na língua inglesa para se referir a cauda de polihistidina

I: Induzido

k_{av}: Coeficiente de partição.

K_B: Constante de associação ou ligação (termo em inglês: *binding constant*).

K_D: Constante de dissociação.

kDa: Quilodalton, equivalente a 1000 Da.

K_{SV}: Constante de Stern-Volmer.

LB: *Lysogeny Broth*

*Lb*OYE: *Old Yellow Enzyme* de *Leishmania braziliensis*.

LC: Leishmaniose cutânea.

*Le*OPR: 12-oxofitodienóico ácido redutase de *Lycopersicon esculentum* (tomate).

LMC: Leishmaniose mucocutânea.

*Lm*OYE: *Old Yellow Enzyme* de *Leishmania major*

LV: Leishmaniose visceral.

MM: Massa molecular.

MM_{app}: Massa molecular aparente.

$NAD(P)^+$: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Fosfato).

NAD(P)H: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (Fosfato) reduzido.

NI: Não Induzido

NYE: *New Yellow Enzyme*

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OPDA: 12-oxofitodienóico

OPR: 12-oxofitodienóico ácido redutase

OYE: *Old Yellow Enzyme*

OYE1: *Old Yellow Enzyme* de *Sacchoromyces pastorianus*.

pO_2: Pressão de oxigênio.

p(r): Função de distribuição de distâncias.

PDB: Banco de dados de estrutura em alta resolução de proteínas (*Protein Data Bank*).

p-HBA: para-hidroxibenzaldeído

PG: Prostaglandina

PGH2: Prostaglandina H2

PGE2: Prostaglandina E2

PGF2α: Prostaglandina F2α

PGFS: Prostaglandina F2α sintase

q: Ângulo de espalhamento.

rcf: Força centrífuga relativa.

Redox: Reação de óxido-redução.

R_G: Raio de giro.

rpm: Rotação por minuto.

R_S: Raio de Stokes

S: Svedberg, unidade de sedimentação (1 S = 10^{-13} segundos).

s: Coeficiente de sedimentação

$s^0_{20,w}$: Coeficiente de sedimentação padrão a 0 mg mL^{-1} de proteína.

$s_{20,w}$: Coeficiente de sedimentação em condições padrão.

SAXS: Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (acrônimo do inglês *Small Angle X-ray Scattering*).

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (acrônimo do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrilamyde Gel Electrophoresis*).

*Tc*OYE: *Old Yellow Enzyme* de *Trypanosoma cruzi*.

T_m: Temperatura média de agente desnaturante na transição, onde 50% de espécies proteicas estão enoveladas e 50% desenoveladas;

Trp: Acrônimo para o aminoácido triptofano.

Tyr: Acrônimo para o aminoácido tirosina.

UA: Unidades Arbitrárias.

v_0: Volume morto.

v_e: Volume de eluição.

Vbar: Volume parcial específico

Y: Símbolo de 1 letra para o aminoácido tirosina.

Yqjm: *Old Yellow Enzyme* de *Bacillus subtilis*

W: Símbolo de 1 letra para o aminoácido triptofano.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE TABELAS xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xii
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Doenças Negligenciadas 1
1.1.1 Leishmanioses 1
1.1.2 Tripanossomíases 5
1.2 Enzimas e flavoproteínas 8
1.2.1 Enzimas: definição, classificação e importância biológica 8
1.2.2 Flavoproteínas: definição, classificação e importância biológica 12
1.3 Old Yellow Enzymes 14
1.3.1 Características estruturais da família das OYEs 16
1.3.2 Mecanismo de Reação 22
1.3.3 Possíveis substratos para a família das OYEs 25
1.3.4 Old Yellow Enzyme de Leishmania braziliensis (LbOYE) 26
1.3.5 Old Yellow Enzyme de Trypanosoma cruzi (TcOYE) 27
2 OBJETIVOS 29
2.1 Objetivo Geral 29
2.2 Objetivos Específicos 29
3 MATERIAIS E MÉTODOS 30
3.1 Soluções-tampão 30
3.2 Análise da sequência de aminoácidos 30
3.3 Expressão, purificação e quantificação das proteínas recombinantes 30
3.4 Propriedades físico-químicas das proteínas alvos 32
3.5 Espectropolarimetria de dicroísmo circular 32
3.6 Caracterização hidrodinâmica da proteína LbOYE 33
3.7 Desenovelamento térmico monitorado por DSC 34
3.8 Fluorescência intrínseca do triptofano 34
3.9 Determinação de forma e reconstrução de um modelo ab initio 35
3.10 Ensaios de prospecção de ligantes 36
3.11 Ensaios de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio 38
4 RESULTADOS 40
4.1 Análise da sequência de aminoácidos 40
4.2 Expressão, purificação e quantificação das proteínas recombinantes 42
4.3 Caracterização da estrutura secundária e terciária das proteínas recombinantes 43

4.4 Caracterização hidrodinâmica da LbOYE *46*
4.5 Determinação de forma e reconstrução de um modelo ab initio *47*
4.6 Investigação da estabilidade térmica e química das LbOYE e TcOYE..... *48*
4.7 Ensaios de prospecção de ligantes *49*
4.8 Ensaios de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio..... *61*
5 DISCUSSÃO 67
5.1 Aminoácidos envolvidos na estabilização do substrato são conservados na família OYE *67*
5.2 A estrutura secundária e terciária da LbOYE e TcOYE são similares *68*
5.3 A LbOYE se apresenta como monômero sutilmente alongado em solução *69*
5.4 A LbOYE apresenta menor estabilidade estrutural que a TcOYE *70*
5.5 As proteínas LbOYE e TcOYE foram produzidas na sua forma funcional *71*
6 CONCLUSÕES 76
7 LISTA DE PRODUÇÕES CIENTÍFICAS 77
8 REFERÊNCIAS 78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Negligenciadas

O conceito de doenças negligenciadas (DNs) emergiu há mais de uma década e tem sido frequentemente reconhecido como um caminho válido para categorizar doenças que afetam a parcela mais pobre da população mundial (MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2016). De acordo com Moloo (2016), em uma publicação vinculada à Organização Mundial de Saúde (OMS), as DNs representam um grupo amplo de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países, afetando mais de um bilhão de pessoas, prejudicando o desenvolvimento econômico destes países e provocando um custo estimado em um bilhão de dólares por ano. Essas doenças afetam principalmente a população que vive na pobreza extrema, sem saneamento básico adequado e em contato próximo com vetores infecciosos, animais domésticos e silvestres (MOLOO, 2016).

Atualmente, a OMS enumera as DNs em um grupo de dezessete doenças que podem ser causadas por agentes virais, bactérias, protozoários e helmintos, dentre as quais podemos citar como exemplo a dengue, cisticercose, lepra, leishmaniose e doença de Chagas (CANUTO et al., 2015; RAFATI et al., 2015). Como o enfoque do nosso trabalho são proteínas relativas a protozoários causadores da leishmaniose e doença de Chagas, resumiremos nossa discussão à etiologia e aos ciclos biológicos dessas parasitoses, destacando a terapêutica atualmente empregada e os gargalos existentes nesse processo que, de certo modo, refletem a importância biológica do nosso estudo.

1.1.1 Leishmanioses

A leishmaniose representa um grupo amplo de parasitoses que é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, no qual é transmitida ao homem e a outros animais pela picada de fêmeas de flebotomíneos (SANTOS et al., 2014). A leishmaniose pode se apresentar sob três formas principais: Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (REVEIZ et al., 2013). Causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a LC é distinguida de outras leishmanioses por sua cronicidade, latência e tendência a metastatizar em hospedeiros humanos (SANTOS et al., 2014). É importante destacar que de 1 a 5% dos pacientes podem desenvolver a LMC devido à capacidade da *L. (V.) braziliensis* persistir dentro das lesões mesmo após cura espontânea ou mediada por quimioterapia e a sua capacidade de metástase para a mucosa

nasal (MENDONÇA et al., 2004). A LMC é uma das formas mais agressivas da doença, provocando lesões destrutivas na mucosa e cartilagens, sendo as regiões mais afetadas o nariz, faringe, boca e laringe (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013; REVEIZ et al., 2013).

A OMS estima uma incidência da leishmaniose tegumentar (LC e LMC) em mais de 1,5 milhão de casos por ano em 82 países, sendo que 90% dos casos ocorrem principalmente em países como Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru, e Síria (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Embora a leishmaniose tegumentar não represente uma forma letal da doença, ela resulta comumente em estigma social para as pessoas afetadas, marginalizando-as perante a sociedade e ocasionalmente gerando um entrave no processo de inserção ou realocação dessas pessoas no mercado de trabalho (ALVAR et al., 2012).

O ciclo de vida da *Leishmania spp* é digenético, ou seja, este protozoário completa seu ciclo de vida passando por pelo menos dois hospedeiros. No caso da *Leishmania spp* a primeira fase do ciclo ocorre em um hospedeiro invertebrado pecilotérmico, que são as moscas dos gêneros *Phlebotomus e Lutzomyia*, popularmente conhecidos como mosquito-palha[1]. Já a segunda fase do ciclo ocorre em um hospedeiro mamífero homeotérmico (BEATTIE; KAYE, 2011; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

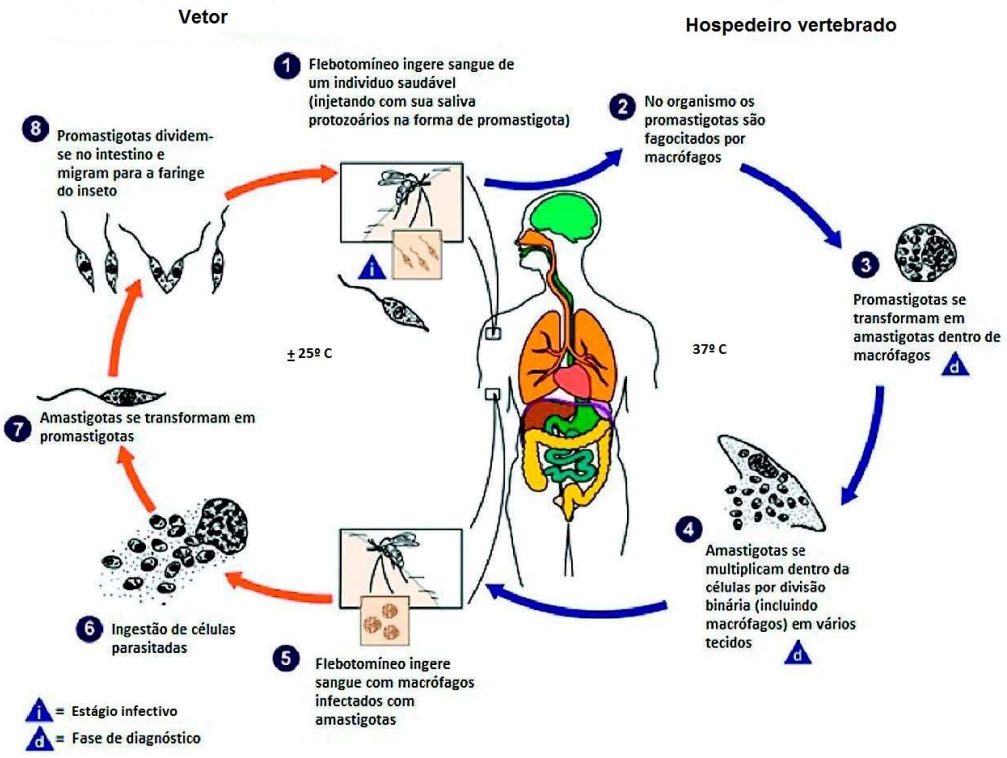
Fora do hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida da *Leishmania spp* é confinado no trato digestivo do mosquito-palha. É interessante notar que a localização precisa do protozoário difere entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia.* O subgênero *Viannia*, como por exemplo a *L. (V.) braziliensis* caracteriza-se pela entrada do parasito no intestino grosso antes de migrar para o intestino médio e são, dessa forma, chamados de parasitos peripilariano. A maioria das espécies de *Leishmania*, entretanto, é classificada como suprapilariano devido ao seu desenvolvimento ser restrito ao intestino médio (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

O ciclo da *Leishmania spp.* inicia quando fêmeas do mosquito-palha ingerem macrófagos infectados com amastigotas - forma pequena (3 – 5 μm), imóvel e arredondada do parasito. Mudanças ambientais, como diminuição da temperatura e

[1] A classificação taxonômica do hospedeiro invertebrado da *Leishmania spp.* está incluída no grupo dos dípteros, o que o classifica como mosca e não mosquito. Entretanto, o termo "mosquito-palha" é comumente empregado, apesar do erro conceitual da terminologia mosquito nesse contexto.

aumento do pH, desencadeiam a transformação morfológica e desenvolvimento do parasito no vetor. As formas amastigotas se transformam na forma promastigota procíclica – forma com pouca motilidade caracterizada pela presença de um curto flagelo na extremidade anterior da célula (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). Posteriormente, fatores adicionais levam o parasito a se transformar na forma promastigota metacícilica (forma infectiva do parasito). As fêmeas do mosquito-palha passam a forma infectiva para o hospedeiro mamífero através da picada seguida de regurgitação da forma promastigota metacíclica flagelada, que é então fagocitada por células do sistema imune do hospedeiro. Os promastigotas metacíclicos são englobados por fagolisossomos e, a partir de alterações ambientais, como aquelas já citadas anteriormente, ocorre a diferenciação dos parasitos para formas amastigotas, promovendo a retração do flagelo e alterações na superfície celular (BEATTIE; KAYE, 2011; SERAPHIM; RAMOS; BORGES, 2014). O ciclo da *Leishmania spp.* está ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania spp.* (1) Promastigotas metacíclicos são injetados no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito-palha. (2) Células do sistema imune, como o macrófago, fagocitam os promastigotas. (3) A alteração de pH e temperatura induzem a diferenciação dos parasitos para a forma amastigota dentro dos fagolisossomos. (4) Os amastigotas se reproduzem por divisão binária. (5 e 6) Fêmeas do mosquito-palha ingerem macrófagos contaminados com a forma amastigota. (7) No inseto, os parasitos se diferenciam em promastigotas procíclicos e metacíclicos sequencialmente. (8) Os promastigotas dividem-se no intestino e migram para a faringe do inseto, iniciando um novo ciclo de vida.



Fonte: Adaptado de Center of Disease Control and Prevention (CDC) - http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/

Até o presentem momento foram identificados 25 compostos com atividade leishmanicida, entretanto, somente uma minoria desses compostos são classificados como fármacos permitidos para o tratamento humano (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Dessa forma, o número de opções para o tratamento da leishmaniose tegumentar é bastante limitado. Além disso, os antimoniais pentavalentes têm mostrado eficácias inconsistentes entre as diferentes espécies de *Leishmania* e a anfotericina B e pentamidina são de uso limitado a tipos específicos de LC (CROFT; OLLIARO, 2011). Portanto, torna-se necessário a busca por tratamentos mais efetivos contra leishmaniose e sem os indesejáveis efeitos colaterais, tais como artralgia (dor nas articulações), náuseas, inapetência (falta de apetite), epigastralgia (dor na região epigástrica – "boca do estômago), dentre outros.

1.1.2 Tripanossomíases

Tripanossomíase é um termo genérico usado para designar um grupo amplo e heterogêneo de parasitoses que tem como agentes etiológicos protozoários do gênero *Trypanosoma*. As tripanossomíases mais conhecidas são as que são causadas pelo *Trypanosoma brucei e Trypanosoma cruzi* nas quais são responsáveis pelas tripanossomíases africana e americana, respectivamente (VERMELHO et al., 2017). Essas parasitoses estão incluídas dentro do grupo de doenças negligenciadas, onde o incentivo a pesquisa é frequentemente reduzido.

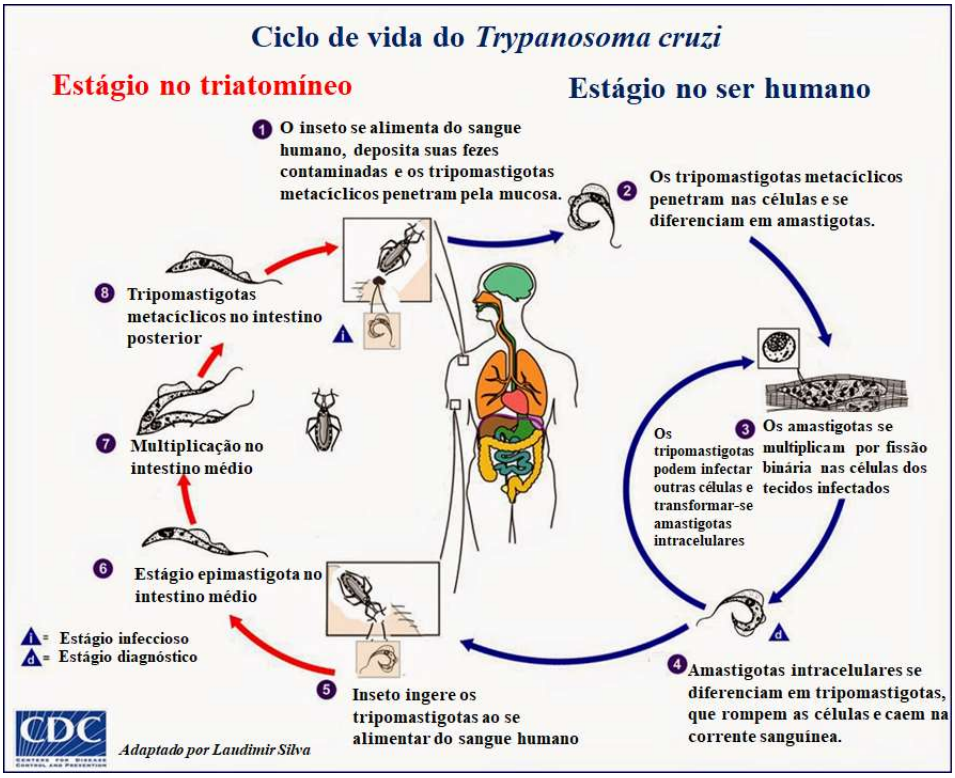
O *T. cruzi*, agente causador da tripanossomíase americana ou doença de Chagas, afeta cerca de 17 milhões de pessoas no mundo e cerca de 100 mil pessoas estão em risco de infecção nas Américas (FONTANELLA et al., 2008). Essa zoonose é transmitida primariamente através de secreções contaminadas com o parasito a partir de insetos triatomíneos hematófagos (NUNES et al., 2013). Existem outras formas pelas quais a doença pode ser transmitida, tais como transfusões de sangue, doação de órgãos e da mãe para o filho ao nascer, sendo esta forma a principal preocupação em regiões não endêmicas (BERN et al., 2011). Recentemente, a transmissão oral foi reconhecida como uma causa esporádica de pequenos surtos em humanos, principalmente na região amazônica em virtude do consumo de frutos como açaí e cana-de-açúcar contaminados com triatomíneos (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Transmissão laboratorial da doença em exposições acidentais também tem sido relatado (HERWALDT, 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, com várias formas de desenvolvimento nos insetos vetores e hospedeiros mamíferos (RASSI; RASSI JR.; MARCONDES DE REZENDE, 2012). No Brasil, o triatomíneo (inseto vetor) é popularmente conhecido como barbeiro e se alimenta basicamente de sangue de aves e mamíferos, incluindo humanos (RODRIGUES, 2014). Sendo assim, os barbeiros se tornam infectados ao sugar o sangue de animais ou seres humanos que têm os parasitas circulantes (forma tripomastigota). No trato digestivo dos triatomíneos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (forma multiplicativa) e depois para tripomastigotas metacíclicas na porção final do intestino (RASSI; RASSI JR.; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

A infecção de mamíferos ocorre quando eles entram em contato com as formas metacíclicas infectantes do parasito que são eliminados com as fezes do inseto vetor após

o repasto sanguíneo. Esse processo, em geral, promove uma leve ardência ou coceira no local da picada e ao coçar, o hospedeiro mamífero acaba por introduzir no organismo os tripanossomatídeos causando a infecção (RASSI; RASSI JR.; MARCONDES DE REZENDE, 2012; RODRIGUES, 2014). Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células reticulo endoteliais e conectivas locais, e se diferenciam em amastigotas que iniciam o processo de replicação por fissão binária. Quando a célula fica intumescida com amastigotas, elas se transformam novamente para forma tripomastigota através do crescimento do flagelo. Esses tripomastigotas promovem a lise celular e com isso começam a invadir tecidos adjacentes e se espalhar, via vasos linfáticos e sanguíneos, para locais mais distantes, principalmente células musculares (cardíaco, musculatura lisa e esquelética) e gânglios, onde se submetem a outros ciclos de multiplicação intracelular. O ciclo de transmissão é concluído quando os tripomastigotas circulantes são ingeridos através do repasto sanguíneo pelo inseto vetor (BERN et al., 2011; NUNES et al., 2013; RASSI; RASSI JR.; MARCONDES DE REZENDE, 2012). O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser visto na Figura 2.

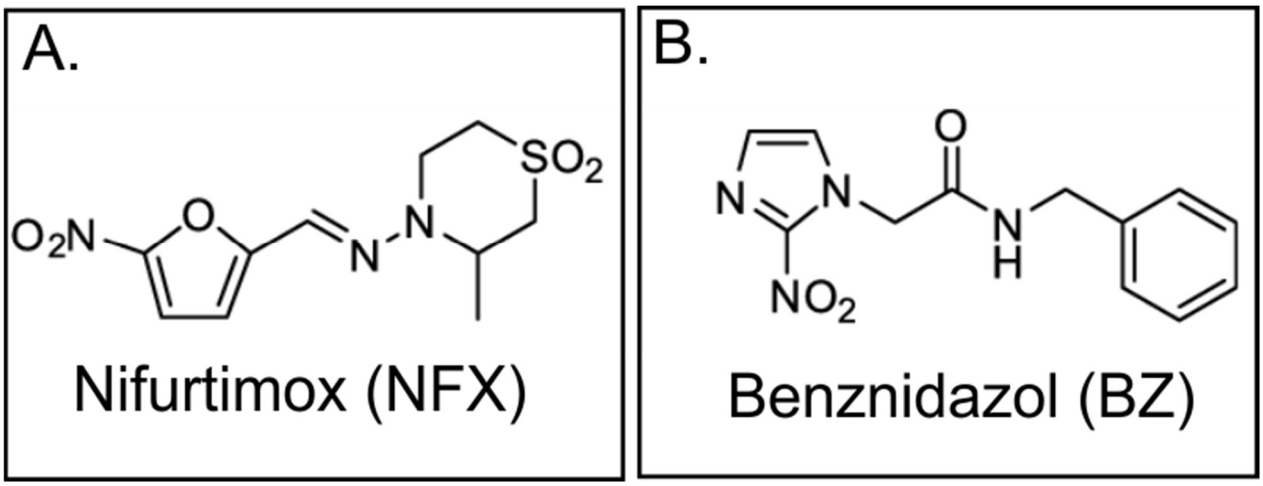
Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) O vetor contaminado com *Trypanosoma cruzi* após realização do repasto sanguíneo, elimina fezes contendo o patógeno em sua forma tripomastigota metacíclico, que, através da mucosa oral ou nasal, feridas na pele ou pelo orifício da própria picada tem acesso a corrente sanguínea do hospedeiro. (2) Circulando pelas vias sanguíneas na forma tripomastigota metacíclico, o *T. cruzi* invade células do hospedeiro se diferenciado para forma amastigota. (3) As amastigotas se multiplicam dentro das células através de sucessivas divisões binárias. (4) Após sucessivos ciclos de replicação, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, rompendo as células e caindo na corrente sanguínea. (5) Insetos ingerem a forma tripomastigota durante o repasto sanguíneo. (6) No intestino do vetor, essas formas se diferenciam em epimastigota, (7) multiplicam-se no intestino médio e finalmente (8) transforma-se em tripomastigotas.



Fonte: Adaptado de *Center for Disease Control and Prevention* (https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html, acesso em 31/08/2018)

O tratamento atual da doença de Chagas envolve quimioterapia com nifurtimox nitrofurano (NFX) e 2-nitroimidazol benznidazol (BZ) (Figura 3). Esses compostos foram projetados para exercer sua ação tripanomicida através da geração de radicais livres por meio de um processo cíclico redox em que os fármacos são enzimaticamente reduzidos para formar ânions radicais. Entretanto, a eficácia desses fármacos é insatisfatória além de causar efeitos tóxicos no paciente e apresentar baixa eficácia no tratamento da fase crônica da doença. Além disso, vários casos têm sido reportados mostrando a resistência de cepas de *T. cruzi* a esses compostos (MAYA et al., 2007; WILKINSON et al., 2008; WILKINSON; KELLY, 2009). Neste contexto, o cenário atual ilustra a importância no desenvolvimento de novos compostos mais efetivos contra *T. cruzi* (MAYA et al., 2007; MURAKAMI et al., 2013; MURTA et al., 2006; WILKINSON; KELLY, 2009).

Figura 3: Estrutura Química dos compostos utilizados no tratamento da Doença de Chagas. A. Nifurtimox Nitrofurano (NFX) e **B.** 2-nitroimidazol benzinidazol (BZ).



Fonte: Adaptado de (SILVA JUNIOR et al., 2014)

1.2 Enzimas e flavoproteínas

1.2.1 Enzimas: definição, classificação e importância biológica

As reações químicas são essenciais para manutenção da vida em todos os organismos vivos. A maioria delas são definidas como espontâneas, entretanto, o seu sucesso depende da velocidade com as quais ocorrem para assegurar o funcionamento de toda maquinaria celular (ADALBJÖRNSSON, 2012; COPELAND, 2000). Dessa forma, é necessário que as reações químicas ocorram com orientação e seletividade apropriadas para atingir a velocidade suficiente e adequada a fim de suprir a necessidade dessas reações em sistemas biológicos. Nesse contexto, as enzimas, por permitirem uma redução no tempo reacional, se mostram fundamentais nesses processos garantindo a funcionalidade e a eficiência das reações químicas (COPELAND, 2000).

Com exceção das ribozimas (RNA catalítico), as enzimas são estruturas proteicas formadas por cadeias lineares de aminoácidos as quais estão conectadas por ligações peptídicas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002, p. 447; NELSON; COX, 2011, p. 190). Elas podem ser muito longas e frequentemente se apresentam como monômeros com uma média de 361 e 267 resíduos de aminoácidos em eucariotos e bactérias, respectivamente (BROCCHIERI; KARLIN, 2005). Os resíduos de aminoácidos podem formar arranjos espaciais locais ou estruturas secundárias, como hélices-α e folhas-β. A longa cadeia peptídica enovela-se sobre si mesma formando um complexo tridimensional referido como estrutura terciária. Duas ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades) podem interagir e o arranjo dessas subunidades define o que

conhecemos como estrutura quaternária (ADALBJÖRNSSON, 2012). O enovelamento e a estrutura final de uma enzima proteica são definidas pela sequência de aminoácidos (KARPLUS, 1997). Fatores ambientais adversos, como temperatura, pH, ureia, dentre outros, afetam a estrutura tridimensional da enzima e em condições extremas podem promover o desenovelamento (BENNION; DAGGETT, 2003).

Existe uma máxima no Dogma Central da Biologia no que tange a estrutura de proteínas, que incorpora o que foi discutido no parágrafo acima: a sequência de aminoácidos contém todas as informações necessárias para proteína se enovelar em uma estrutura tridimensional com propriedades fisiológicas adequadas (LI et al., 2014). Resumindo isso em poucas palavras, pode-se dizer que a estrutura de uma proteína é essencial para sua função. Um bom exemplo disso é a ação catalítica de uma enzima, pois, a ligação de um ligante no sítio ativo é fortemente influenciada pela localização de aminoácidos hidrofílicos, carregados e hidrofóbicos próximos a ele, ditando o mecanismo da reação catalisada (ADALBJÖRNSSON, 2012; SCHWARTZ; SCHRAMM, 2009).

Dentro desse contexto, algumas perguntas podem ser feitas: o que direciona a ligação de um ligante ao sítio ativo da enzima? Como a enzima promove sua ação catalítica?

Para responder essas e outras perguntas que possam surgir ao longo da leitura, devemos considerar primeiramente a especificidade enzimática, que por sua vez pode ser explicada por pelo menos duas teorias. A primeira delas é o modelo “chave e fechadura” (*key-lock*) idealizada por Emil Fischer em 1894 (revisado em (KOSHLAND, 1995)). Essa teoria, em resumo, afirma que existe uma complementaridade rígida entre o substrato e a enzima, todavia, esse modelo não leva em consideração que proteínas, incluindo as enzimas, são flexíveis e sofrem mudanças conformacionais (ADALBJÖRNSSON, 2012; NELSON; COX, 2011; SCHWARTZ; SCHRAMM, 2009). Assim, para um melhor entendimento da ação catalítica de uma enzima devemos considerar o modelo do encaixe induzido (*fit-induced theory*) proposto por Koshland e colaboradores em 1958 (revisado em (THOMA; KOSHLAND, 1960)). Essa teoria postula que o composto enquanto forma um complexo com a enzima deve induzir mudanças na conformação da proteína. Se o composto é um substrato, esta mudança traz os grupos catalíticos apropriados para alinhar-se uns aos outros e assim propiciar condições adequadas para catálise. Todavia, um composto pode ter alguma característica estrutural necessária para ligação sem entretanto produzir o alinhamento necessário para ação enzimática (KOSHLAND, 1995;

THOMA; KOSHLAND, 1960). Dessa forma, a teoria do ajuste induzido se fundamenta nos seguintes termos: a) os grupos catalíticos requeridos para ação enzimática devem estar precisamente orientados; b) o substrato deve promover uma mudança apreciável na relação tridimensional dos aminoácidos no sítio ativo e c) a mudança na estrutura da proteína causada pelo substrato deverá trazer os grupos catalíticos para um alinhamento adequado levando o substrato ao estado de transição reacional (momento molecular transitório entre substrato e produto), uma vez que um "não substrato" não o fará (KOSHLAND, 1995).

Um segundo ponto a ser considerado é a forma como uma enzima trabalha. Definida como um catalisador biológico, a enzima reduz a energia livre de ativação de uma reação, aumentando a velocidade da mesma, sem, entretanto, afetar a posição de equilíbrio ou a termodinâmica da reação. Isto também significa que reações diretas e reversas são afetadas na mesma extensão (MARANGONI, 2003). O poder catalítico das enzimas em formar estados de transição de forma eficiente tem sido proposta desde os tempos de Pauling e mostrou envolver um equilíbrio entre o complexo de Michaelis e um estado de transição de menor energia livre de ativação, fornecendo uma justificativa racional pela qual análogos do estado de transição se liguem mais fortemente na enzima (SCHWARTZ; SCHRAMM, 2009).

É importante notar que, apesar da enorme variedade de proteínas que podem ser formadas pelos 20 aminoácidos mais comuns, apenas um grupo limitado desses aminoácidos têm implicação direta na catálise enzimática. Esses aminoácidos "catalíticos" compartilham uma característica comum – todos eles apresentam grupos funcionais em suas cadeias laterais. Os grupos funcionais aos quais nos referimos incluem hidroxila (serina, treonina, tirosina), sulfidrila (cisteína), amônio (lisina e arginina), imidazol (histidina), carboxilato (aspartato e glutamato), amida (asparagina e glutamina) e tio-éter (metionina) (BRODERICK, 2001). Essa limitação, por vezes, é superada pela presença de cofatores, coenzimas e grupos prostéticos na estrutura da enzima. Esses termos são diferenciados por seu modo de ação e força de ligação, muito embora o uso deles aconteça de forma intercambiável.

Grupos prostéticos estão fortemente integrados à estrutura da enzima por ligações covalentes ou interações não covalentes. Alguns íons metálicos de Co^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Se^{2+} e Zn^{2+} representam os grupos prostéticos mais frequentes.

Além de íons metálicos, a biotina, a flavina mononucleotídeo (FMN) e a flavina dinucleotídeo (FAD) representam outros exemplos de grupos prostéticos. Eles podem atuar facilitando a ligação e a orientação do substrato ou a formação de ligações covalentes com os intermediários da reação ou eles podem interagir com os substratos tornando-os mais susceptíveis a reação química. Cofatores desempenham o mesmo papel dos grupos prostéticos, porém, sua ligação na enzima não é tão forte. De forma simplificada, podemos dizer que o grupo prostético deve estar intrinsicamente ligado a estrutura da enzima para que ela exerça sua função, enquanto o cofator pode ser adicionado ao meio reacional sem prejuízo para ação da catálise enzimática. Por fim, coenzimas são aquelas destinadas principalmente à transferência de substratos a partir de um ponto de origem ao ponto de utilização. Exemplos de coenzimas são a coenzima A e tetraidrofolato (CHANDRASEKARAN, 2016).

Os grupos funcionais em proteínas são bem adequados para reações catalíticas ácido-base, catálises nucleofílicas e eletrofílicas, mas, certamente, é insuficiente para grande variedade de reações catalíticas. Como exemplo podemos citar as reações de óxido-redução (redox) nos quais os grupos funcionais de proteínas não se mostram adequados para esse tipo de catálise (BRODERICK, 2001).

As enzimas podem ser classificadas em seis grandes grupos de acordo com as reações que elas catalisam. Uma visão resumida dessa classificação é apresentada na Tabela 1 (EXPASY, 2018; NELSON; COX, 2011). Enzimas com alta similaridade sequencial são classificadas dentro de uma mesma família (ADALBJÖRNSSON, 2012).

Tabela 1: Classificação internacional das enzimas

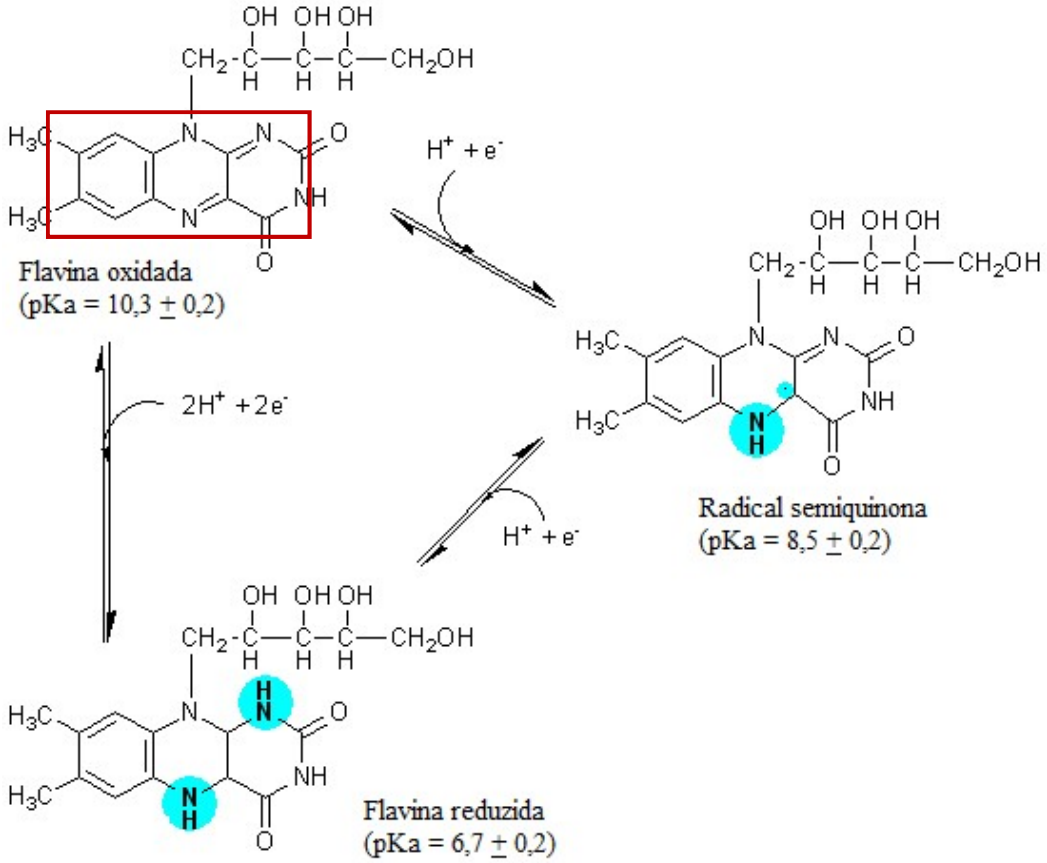
Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidorredutases	Reações de óxido-redução (Redox)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência dentro de uma mesma molécula, produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: (NELSON; COX, 2011)

1.2.2 Flavoproteínas: definição, classificação e importância biológica

Flavoproteínas ou flavoenzimas são enzimas de coloração amarela conferida pela presença de um cofator flavina, que pode ser tanto a FMN quanto a FAD (ADALBJÖRNSSON, 2012). Essas proteínas participam de muitos processos biológicos, como na síntese de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) ou a detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Mais detalhes sobre os diferentes processos biológicos mediados por essas proteínas podem ser obtidos nos artigos de Massey (1995) e Entsch (1995) (ENTSCH; VAN BERKEL, 1995; MASSEY, 1995). Elas catalisam reações tanto de um quanto dois elétrons para e a partir de substratos. Durante o ciclo catalítico, a flavina pode se alternar entre os estados oxidado, um elétron reduzido (semiquinona) e dois elétrons reduzidos (dihidroquinona) (Figura 4). É importante destacar que enquanto a oxidação e redução de $NAD(P)^+$ é sempre um processo de transferência de dois elétrons (dois prótons e dois elétrons são transferidos), a oxidação e redução de coenzimas de flavina pode ocorrer com a transferência de dois prótons e dois elétrons ao mesmo tempo ou em duas etapas separadas, com a transferência de um próton e um elétron por vez, com a formação de um intermediário semiquinona (BENDER, 2015). As flavoproteínas têm se tornado um excelente objeto de estudo em enzimologia, grande parte motivado por suas propriedades e meias-reações prontamente separadas. Como consequência, vários membros desta família de proteínas vêm sendo estudada em detalhes (ADALBJÖRNSSON, 2012; FRAAIJE; MATTEVI, 2000; MASSEY, 1995).

Figura 4: Estados redox da flavina com os respectivos valores de pKa



Fonte: Adaptado de (BENDER, 2015) *e* (MAYHEW, 1999)

A parte reativa da flavina é creditada ao seu sistema em anel tricíclico da isoaloxazina (destacado por um retângulo vermelho na Figura 4). É importante notar que essa molécula é anfipática, sendo formada pela fusão do motivo dimetilbenzeno (hidrofóbico) com o anel pirimidínico (hidrofílico) (FRAAIJE; MATTEVI, 2000). Como o substrato é frequentemente ligado em uma região no sítio ativo próximo a coenzima, essas enzimas são frequentemente estereosseletivas e enantiosseletivas com catálises extremamente eficientes (ADALBJÖRNSSON, 2012).

As flavoproteínas podem ser divididas em três grupos, dependendo de suas características físico-químicas, a saber: (1) Flavoproteínas simples, que são proteínas individuais as quais podem ser subdivididas em subcategorias de acordo com suas reatividades ao oxigênio (oxidases, elétron transferases e monooxigenases); (2) Flavoproteínas com centro redox auxiliares, nos quais podem ser subdivididos em três subcategorias (flavoproteínas dissulfito oxidorredutases, flavocitocromos e flavoproteínas contendo metal) e por fim (3) Flavoproteínas com função desconhecida,

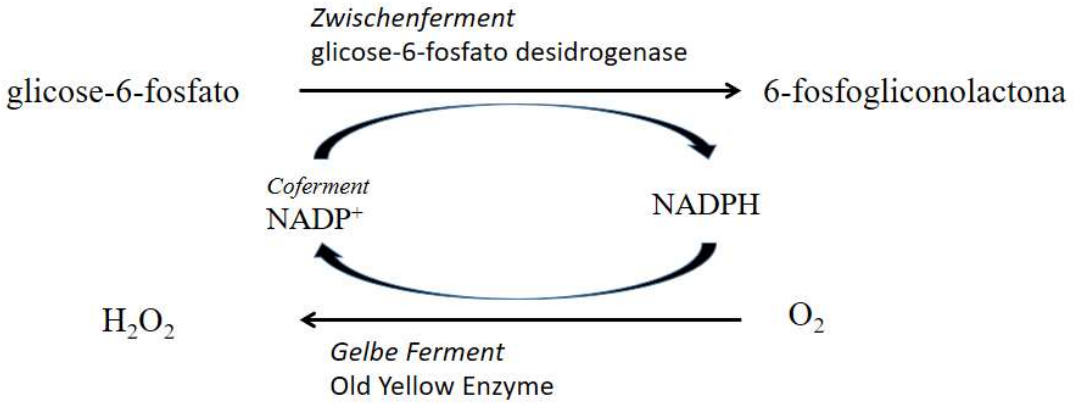
como as proteínas pertencentes a família das OYE (ADALBJÖRNSSON, 2012; MASSEY, 1995).

1.3 Old Yellow Enzymes

A proteína *old yellow enzyme* (OYE, EC 1.6.99.1) foi à primeira flavoproteína a ser descrita e foi originalmente identificada em leveduras por Christian & Warburg no início da década de 1930 (WARBURG; CHRISTIAN, 1932; WILLIAMS; BRUCE, 2002). O objetivo deles era entender melhor a natureza química das oxidações biológicas em leveduras e, para isso, eles adicionaram ao sistema desses organismos dois componentes eritrocitários, um enzimático (*Zwischenferment*: glicose-6-fosfato desidrogenase) e outro termoestável (*Coferment*: $NADP^+$) com o intuito de promover a oxidação da glicose-6-fosfato usando o azul de metileno como indicador da reação. Curiosamente, durante o experimento, foi identificado por Warburg uma enzima amarela proveniente da levedura na qual ele denominou de *Gelbe ferment* (em inglês esse termo é traduzido para *Yellow enzyme*) que permitia ao sistema formar uma cadeia respiratória consumindo o oxigênio molecular (Figura 5) (PATTERSON-ORAZEM; SULLIVAN; STEWART, 2014; WILLIAMS; BRUCE, 2002).

Em 1935, Theorell purificou e demonstrou que a OYE é composta de duas partes, uma apoproteína incolor e um cofator amarelo, ambos essenciais para a atividade enzimática (TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010). O cofator amarelo era similar à vitamina B2 (riboflavina) e dessa forma, a OYE forneceu o primeiro papel bioquímico de uma vitamina. Vinte anos depois, Theorell demonstrou que, de fato, o cofator amarelo era a riboflavina 5'-fosfato, hoje conhecida como flavina mononucleotídeo (FMN) (KUBATA et al., 2002; WILLIAMS; BRUCE, 2002). Em 1938, Haas identificou uma nova enzima amarela – *new yellow enzyme* (NYE, EC 1.4.3.3) - em leveduras e, desde então, a enzima de Warburg foi renomeada para o termo *old yellow enzyme*, nome que persiste até os dias atuais (WILLIAMS; BRUCE, 2002).

Figura 5: Sistema reacional de Christian & Warburg. No sistema ilustrado nessa figura, a glicose-6-fosfato é oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase a partir da redução do cofator NADP+ que por sua vez gera o cofator NADPH. O NADPH assim produzido retorna ao estado oxidado a partir da redução do oxigênio molecular produzindo peróxido de hidrogênio, reação essa que é catalisada por uma OYE.

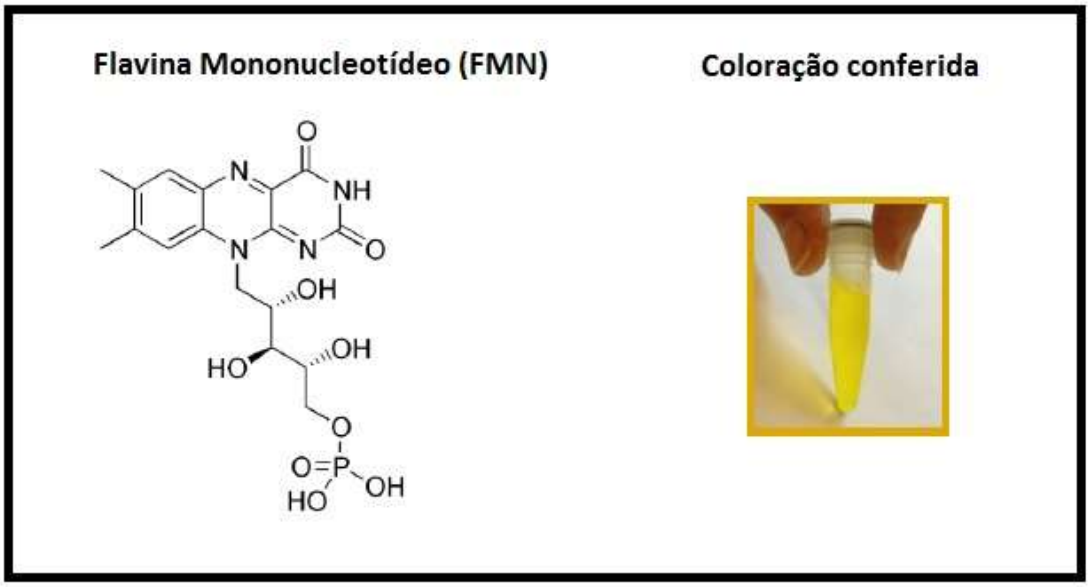


Fonte: Adaptado de (WILLIAMS; BRUCE, 2002)

Estruturalmente, a NYE e OYE diferem no grupo prostético. Enquanto a OYE apresenta a FMN, a NYE utiliza a FAD. Em termos funcionais, a OYE reage tanto com o oxigênio molecular quanto com o citocromo c, no caso deste último, provavelmente devido a formação de espécies reativas de oxigênio. Já a NYE reage lentamente com o oxigênio molecular e é incapaz de reduzir o citocromo c (MEHLER, 1957).

A estrutura da FMN e coloração conferida por ela está ilustrada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura do grupo prostético FMN e a coloração conferida às proteínas que o possuem.



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES, 2014)

Estudos anteriores com diferentes homólogos das OYEs têm demonstrado que tanto o NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) quanto o NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) podem ser usados como redutor fisiológico para essa família de proteínas (BROWN et al., 1998; MEAH; MASSEY, 2000; STRASSNER et al., 1999). Entretanto, pesquisas recentes mostram que a preferência por NADPH frente ao NADH varia significativamente (atividade relativa NADPH:NADH = 0,02-10), com alguns membros reagindo especificamente com o NADPH e outros sendo capazes de reagir igualmente com ambos cofatores (KATAOKA et al., 2002; STUERMER et al., 2007; UZIR; NAJIMUDIN, 2018). Desse modo, passaremos a tratar o agente redutor das OYEs pelo termo NAD(P)H.

Em termos funcionais, a OYE é uma enzima NAD(P)H oxidorredutase que contém a FMN como grupo prostético e reduz uma variedade de compostos carbonílicos α,β-insaturados (BROWN et al., 1998; NIZAM et al., 2014a). Substratos capazes de reoxidar a OYE incluem o azul de metileno, Fe^{3+}, quinonas, citocromo c e ferricianeto (WILLIAMS; BRUCE, 2002). Além desses, a reoxidação pode também ser efetivada pelo oxigênio molecular, originando peróxido de hidrogênio e superóxido, entretanto, essa reação parece ser ocasional, uma vez que a velocidade observada é substancialmente inferior à que é observada com enzimas oxidase e menor que a obtida com substratos como quinonas (VAZ; CHAKRABORTY; MASSEY, 1995).

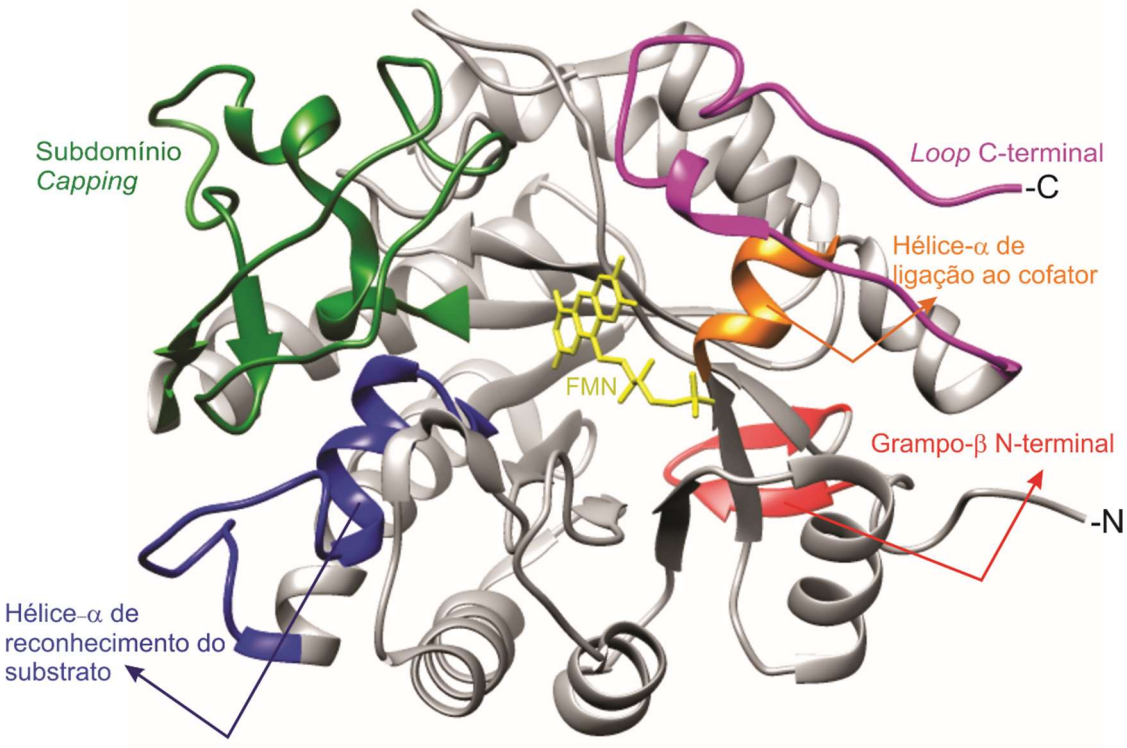
1.3.1 Características estruturais da família das OYEs

A descrição de novos membros da família OYE tem crescido rapidamente nos últimos anos e numerosos ortólogos com características diferentes tem sido identificados (SHENG et al., 2016). Dessa forma, houve a necessidade em reagrupar as OYEs em categorias. O primeiro trabalho nesse sentido foi realizado pelo grupo do professor Nigel Scrutton em 2010, onde, através de análises de alinhamento de sequências e características estruturais, as OYEs foram classificadas em duas subfamílias. A primeira delas inclui os membros mais bem descritos e investigados tais como a OYE1 de *Saccharomyces pastorianus* e 12-oxofitodienóico ácido redutase (OPR) de plantas e são por isso chamadas de OYE clássica. A segunda subfamília, chamada de OYE *thermophilic-like*, inclui redutases tais como YqjM de *Bacillus subtillis* e TsOYE (formalmente denominada pelo termo CrS) de *Thermus scotoctudctus*. É interessante notar que essa segunda subfamília de proteínas OYEs está restrita a bactérias, não tendo sido encontrado, até o momento, exemplares em eucariotos (NIZAM et al., 2014a;

TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010; TOOGOOD; SCRUTTON, 2014). Uma diferença entre as duas classes é que a subfamília "clássica" forma monômeros ou dímeros, tais como a OYE1 e OPR1, mas, a subfamília "*thermophilic-like"* frequentemente forma oligômeros (SHENG et al., 2016).

Entre as OYEs de uma mesma subfamília, têm se observado uma alta conservação em regiões importantes da proteína, tais como os resíduos envolvidos na catálise, FMN e ligação do substrato (TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010). A família de proteínas OYE apresenta uma diversidade no seu estado oligomérico, sendo encontrados representantes desde o estado monomérico (MURAKAMI et al., 2013) ao estado tetramérico (ADALBJÖRNSSON, 2012). Apesar dessa variabilidade no estado oligomérico, todos os monômeros homólogos de OYE adotam um domínio único similar, do tipo barril-$(\alpha/\beta)_8$ com um grampo-β formando a parte superior do barril e a ligação FMN dentro do barril, próxima a região carboxi-terminal da folha-β (Figura 7) (BARNA et al., 2001; BINKS et al., 1996; FOX; KARPLUS, 1994). Além disso, normalmente, essas proteínas apresentam subunidades com massa molecular variando entre 40 e 45 kDa (BROWN et al., 2002; KARPLUS; FOX, 2015; MURTA et al., 2006).

Figura 7: Estrutura canônica da proteína TcOYE (*PDB entry:* 4E2B). A figura ilustra a localização do grupo prostético no interior da estrutura canônica, próximo a região carboxi-terminal da folha-β. Outros destaques são ilustrados na figura, como a região de ligação do cofator (NAD(P)H) e o sítio de reconhecimento do substrato.



Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019).

Estruturalmente, a diferença mais significativa entre as OYEs é a posição e a composição dos aminoácidos na superfície do *loop* flexível. Essas diferenças implicam frequentemente em mudanças discretas dentro da interface monômero/monômero do dímero funcional tanto entre como dentro das subclasses de OYEs (TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010). Além disso, o tamanho mais compacto e curto de alguns loops de superfície e mudanças na interface subunidade/subunidade de OYEs *thermophilic-like* sugerem um possível mecanismo de termoestabilização nessa subfamília (ADALBJÖRNSSON et al., 2010).

A natureza da interação entre a proteína e o substrato/inibidor ligado a região mais exposta ao solvente difere entre as duas subclasses de OYEs e estão intimamente relacionadas a diferenças estruturais entre elas. Na OYE clássica, o resíduo Y351 altamente conservado é conhecido por estabelecer ligações de hidrogênio com o substrato e inibidores próximos ao sítio ativo da enzima. Por exemplo, o grupo aldeído-carbonílico do *para*-hidroxibenzaldeído (p-HBA) interage com a Y375 em OYE1, enquanto o resíduo equivalente em 12-oxofitodienóico ácido redutase (LeOPR; Y358) está dentro da

distância de contato de van der Waals da cadeia alquílica do substrato ácido 12-oxofitodienóico (OPDA) (BREITHAUPT et al., 2001; TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010).

Em contraste, uma característica única da subclasse *thermophilic-like* é a reorientação dos resíduos C-terminal para formar parte do sítio ativo de um monômero adjacente bem como se envolver na interação subunidade/subunidade dentro do dímero funcional. Dentro desta região, um "dedo de arginina" flexível bastante conservado (R312 em YqjM) está presente somente nesta subclasse (ADALBJÖRNSSON et al., 2010; TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010). A Tabela 2 apresenta alguns membros da família OYE, classificando-as em subfamílias e descrevendo algumas de suas características mais relevantes.

Tabela 2: Alguns representantes da família OYE. As quatro primeiras proteínas são representantes da subfamília clássica e as quatro últimas são representantes da subfamília *Thermophilic-like*.

Nome genérico	Organismo	MM (kDa)	Estado Oligomérico	Comentários	Referência
OYE1	*Saccharomyces pastorianus*	~45	Dímero	Foi a primeira OYE a ser identificada e ter sua estrutura cristalográfica resolvida. Não há relatos sobre sua verdadeira função fisiológica, mas, é conhecido diversos substratos que podem ser processados por essa enzima, incluindo substratos α/β-insaturados. Essa proteína é representante da classe I da família das OYEs. O par catalítico dessa enzima é formado pelos resíduos H191/N194.	(SAITO et al., 1991)
LeOPR1	*Lycopersicum esculentum*	~43 e ~29	Heterodímero	A LeOPR1 é uma enzima da família OPR relacionada a OYE. Representa o único grupo de proteínas OYE cuja função fisiológica é conhecida e descrita. Essa proteína tem participação ativa no ciclo do ácido jasmônico, um composto que desempenha um papel importante na defesa da planta contra agressores.	(STRASSNER et al., 1999)
TcOYE	*Trypanosoma cruzi*	~43	Monômero	Representante da classe I, a proteína TcOYE se comporta como monômero em solução. Estudos anteriores têm revelado seu papel no metabolismo de prostaglandinas, entretanto a real função fisiológica dessas proteínas permanece desconhecida.	(MURAKAMI et al., 2013)
LbOYE	*Leishmania braziliensis*	~42	Monômero	Ortóloga da enzima TcOYE, essa proteína ainda não apresenta informações bioquímicas e estruturais na literatura especializada. Em nossos estudos, foi evidenciado que embora essas proteínas sejam evolutivamente próximas, a proteína LbOYE parece ser mais alongada e flexível que a TcOYE.	(VELOSO-SILVA et al., 2019)

YqjM	*Bacillus subtilis*	~38	Tetrâmero (dímero de dímero)	Essa proteína está evolutivamente alinhada à subfamília *Thermophilic-like* e estudos anteriores tem demonstrado o seu amplo espectro de substratos passíveis de catálise óxido-redutiva. Além disso, também tem sido evidenciado seu papel na resposta ao estresse oxidativo.	(HALL et al., 2008)
TsOYE	*Thermus scotoductus*	~38	Tetrâmero	Também conhecida pela sigla CrS, essa proteína é membro da subfamília *Thermophilic-like* e foi uma das primeiras proteínas a demonstrar que na ausência da Y186, o solvente prótico pode fornecer um segundo próton ao substrato.	(TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010)
TOYE	*Thermoanerobacter pseudethanolicus*	~38	Tetrâmetro	Considerada a primeira OYE termofílica completamente caracterizada em termos cinéticos e estruturais, a TOYE tem sido amplamente estudada com o objetivo de desenvolver biocatalisadores quimicamente amigáveis e extremamente estereosseletivos.	(ADALBJÖRNSSON, 2012)
Chr-OYE3	*Chryseobacterium sp.*	~45	Dímero-Tetrâmero	Essa proteína pertence a subfamília *Thermophilic-like* das OYE e em solução, exibe dois estados oligoméricos, dímeros e tetrâmeros, sendo o estado dimérico a forma predominante.	(XU; PEI; WU, 2014)

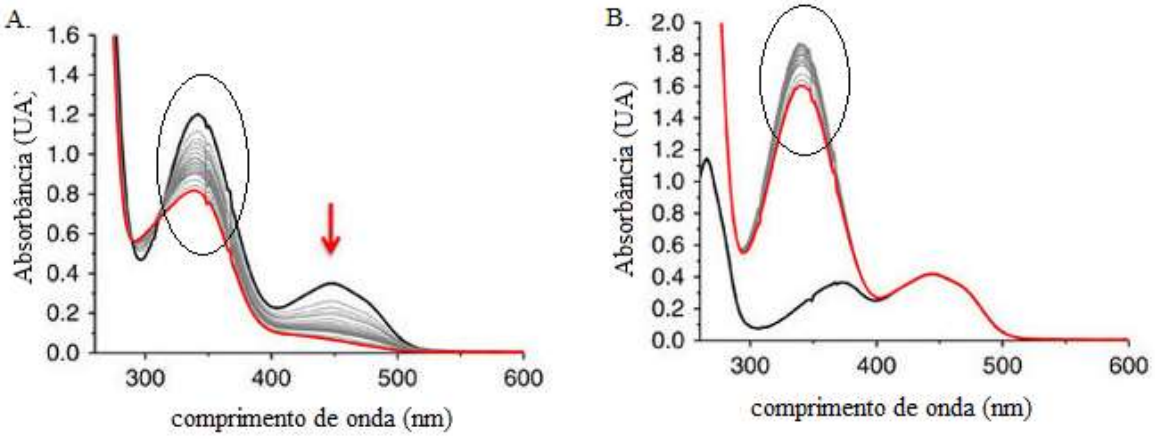
1.3.2 Mecanismo de Reação

Os substratos e os tipos de reações catalisados por membros da família OYE são diversos, tais como: β-oxidação de ácidos graxos, degradação bacteriana de explosivos de éster de nitrato, degradação de alcaloides de morfina; e envolvimento na síntese do ácido jasmônico em plantas, um hormônio produzido como resposta frente a injúria (RODRIGUES, 2014).

Ao longo dos últimos oitenta anos de pesquisa, as OYEs têm exibido inegavelmente grande potencial para redução assimétrica de um grupo amplo de alquenos ativados devido a sua capacidade em gerar até dois centros quirais quando catalisam a redução da ligação C=C (SHENG et al., 2016). O modo e o mecanismo catalítico pelo qual as OYEs catalisam a redução desses compostos têm sido investigados detalhadamente e mostrou ocorrer em dois estágios: oxidação do NAD(P)H por transferência de hidreto para o grupo prostético FMN da OYE (meia-reação redutiva) seguida da redução do alqueno ativado pela transferência do hidreto a partir da flavina reduzida (meia-reação oxidativa). Esses passos ocorrem via mecanismo *ping-pong bi-bi*, com os substratos redutivos e oxidativos ligando-se no mesmo sítio ativo da enzima, porém em diferentes momentos (BREITHAUPT et al., 2001; TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010).

Em um trabalho realizado por Roux e colaboradores foi apresentado a técnica de análise experimental para monitorar a capacidade de redução do FMN a partir da oxidação do NADH (ROUX et al., 2015). Em seu trabalho, Roux e colaboradores, consideraram que o $\lambda_{máx}$ do FMN em torno de 440 nm desaparece quando este é reduzido pela ação de um agente redutor, tal como o NADH (ROUX et al., 2015). Assim, se o NADH for incapaz de reduzir o FMN, o pico em 440 nm deverá se manter, indicando que o FMN permanece oxidado durante o tempo reacional. Na Figura 8 está ilustrado o espectro do FMN quando este é reduzido pela ação do NADH (Figura 8A) e quando não ocorre a redução (Figura 8B).

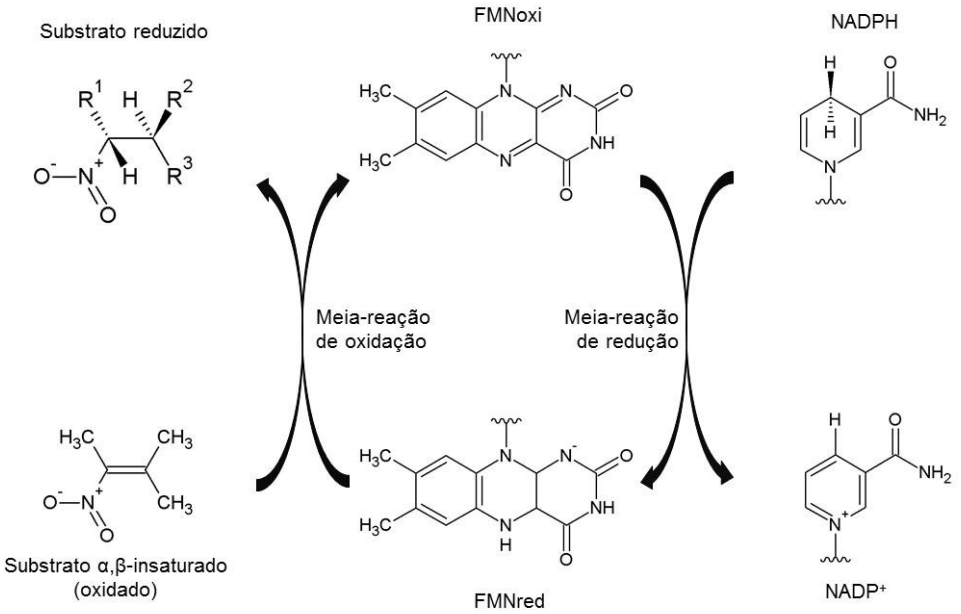
Figura 8: Espectro de absorbância no UV-Vis do FMN. A. Espectro de UV-Vis de uma solução aquosa desoxigenada 50 µM de FMN incorporado em um polímero de polietilenoimina (PEI) na presença de 200 µM de NADH. A curva em preto representa o tempo inicial da leitura, com o FMN ainda oxidado. A curva em vermelho representa o tempo final da leitura. Note que em torno de 440 nm (indicado pela seta em vermelho) o FMN é reduzido ao passo em que o NADH (em torno de 340 nm, destacado pelo circunscrito em preto) é oxidado. **B.** Espectro de UV-Vis de uma solução aquosa desoxigenada 50 µM de FMN antes (curva em preto) e após adição de NADH (curva final em vermelho). Note que nessa circunstância o FMN não é reduzido pelo NADH. Além disso é possível perceber que a oxidação do NADH ocorre com menor eficiência (destacado pelo circunscrito em preto).



Fonte: Adaptado de (ROUX et al., 2015).

Como pode ser visto na Figura 9, a adição dos hidrogênios ao substrato ocorre de modo *trans* (hidrogenação *trans*-específica do C=C), com absoluta estereoseletividade. Nesse processo, um hidreto proveniente do N5 da FMNred é transferido para o Cβ do substrato enquanto um resíduo de tirosina (Y196; conservado ao longo da família) adiciona um próton para o Cα (PEI; XU; WU, 2016). A importância da Y196 (numerado com base na sequência da OYE1) no processo reacional catalisado pelas OYEs foi demonstrada através de estudos com OYEs mutantes, onde ficou evidenciado que a Y196 atua como um sítio ativo ácido responsável por fornecer o segundo hidrogênio na reação total (MEAH; MASSEY, 2000). Entretanto, pesquisas têm revelado que o segundo hidrogênio pode também ser oriundo do solvente, conforme demonstrado no trabalho de Vaz et al. (VAZ; CHAKRABORTY; MASSEY, 1995). Além disso, é importante enfatizar que no sítio catalítico das OYE existe um par catalítico His/His ou His/Asn, que são responsáveis pela ligação de hidrogênio da proteína com o substrato (PEI; XU; WU, 2016).

Figura 9: Ciclo catalítico das OYEs



Fonte: Adaptado de (ADALBJÖRNSSON, 2012)

Como dito anteriormente, as OYEs não exibem uma preferência pronunciada frente ao uso do NADH ou NADPH como agente redutor, todavia, é importante destacar que alguns membros da família OYE exibem surpreendentemente um aumento na estereoseletividade e maior conversão do substrato quando se usa um dos cofatores. Esse é o caso, por exemplo, da enzima YqjM, de *Bacillus subtilis* que apresenta um excesso enantiomérico (*ee*) de 92% ao usar NADH como cofator frente a 70% de *ee* quando se utiliza o NADPH (HALL et al., 2008).

Uma característica reacional típica da família OYE é a formação de um complexo de transferência de carga (CTC) em comprimentos de onda alto (500-800 nm) quando as OYEs interagem com compostos fenólicos (BROWN et al., 1998). Isso tem sido recorrente em todos os membros da família OYE e tornou-se uma característica crucial para diferenciar as OYEs de outras flavoproteínas (BRIGÉ et al., 2006; STRASSNER et al., 1999). A explicação para formação do CTC nas reações mediadas por OYEs se dá em virtude da sobreposição de orbital entre o ânion fenolato, que atua como um doador de elétrons, e a FMN oxidada, que atua como um aceptor de elétrons (BROWN et al., 2002; FOX; KARPLUS, 1994).

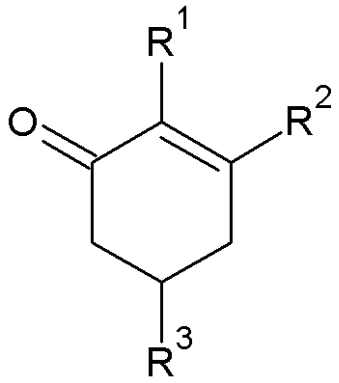
1.3.3 Possíveis substratos para a família das OYEs

Apesar dos numerosos estudos sobre a caracterização biofísica e bioquímica, o conhecimento sobre o aceptor "normal" de elétrons para a maioria das OYEs descritas é desconhecido. Nesse sentido, pesquisas têm revelado que diferentes substratos, tais como aldeídos e cetonas α/β-insaturados podem atuar como receptores de elétrons nas reações catalisadas pelas OYEs. Nesse sentido, vários ligantes têm sido rastreados com o objetivo de identificar possíveis substratos fisiológicos (PEI; XU; WU, 2016; WILLIAMS; BRUCE, 2002).

Várias OYEs de bactérias têm mostrado reduzir uma diversidade de compostos explosivos xenobióticos tais como pentaeritritol tetranitrato (PETN), nitroglicerina (NG), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), dentre outros. Além disso, certas OYEs de procariotos mostraram reduzir morfinona alcaloides e N-etilmaleimida. Entretanto, esses compostos estão longes de serem considerados os verdadeiros substratos para as OYEs, uma vez que eles não são sintetizados *in vivo* (NIZAM et al., 2014b).

Como discutido anteriormente, os membros da família das OYEs apresentam propriedades catalíticas frente a diferentes compostos, dentre os quais, se destacam os substratos α/β – insaturados (Figura 10). Esses substratos merecem uma atenção especial porque, em organismos vivos, são geralmente produzidos como resultado de um dano oxidativo para célula (AL-MOMANY; ABU-ROMMAN, 2016).

Figura 10: Estrutura genérica de um composto carbonílico α/β-insaturado. Na figura, o radical R1 está ligado ao carbono α enquanto o radical R2 está ligado ao carbono β da estrutura. Note que esses radicais podem ser iguais ou não, podendo dessa forma o composto apresentar dois grupos funcionais.

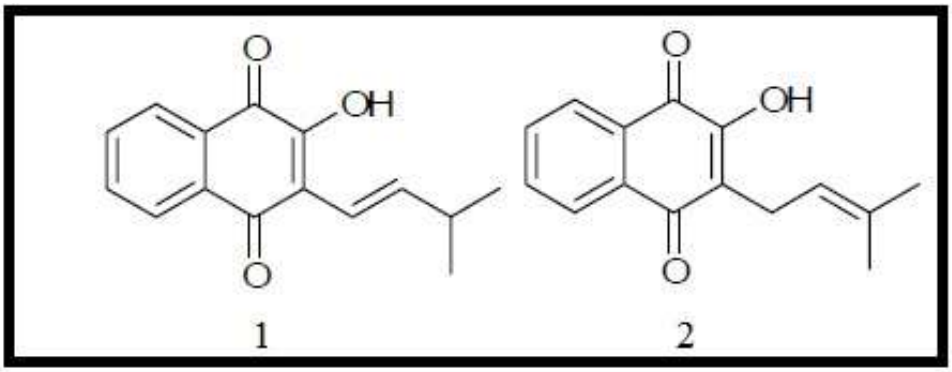


Fonte: Autoria própria

Atualmente, existem diferentes compostos químicos sendo testados para verificar possíveis atividades leishmanicida e tripanomicida. Dentro desse rol de compostos, destacam-se os derivados do lapachol (HUSSAIN et al., 2007). Como pode

ser visto na Figura 11, o lapachol, assim como seus derivados, apresentam uma estrutura comparável a um composto α/β-insaturado, sendo, portanto, classificado como um possível substrato para membros da família OYE.

Figura 11: **Estrutura química do lapachol (2) e do seu derivado, isolapachol (1).**



Fonte: Adaptado de (HUSSAIN et al., 2007)

Existem trabalhos na literatura que apontam o lapachol e seus derivados como compostos com atividades leishmanicida e tripanomicida (LIMA et al., 2004; TEIXEIRA; ALMEIDA, 2001), entretanto, não existem trabalhos publicados validando o possível alvo molecular. Portanto, estudos estruturais e funcionais de proteínas pertencentes à família das OYEs representam grande interesse não só para compreensão do comportamento dessas enzimas frente aos diversos substratos em potencial como uma melhor definição do seu papel fisiológico nos organismos os quais tem sido identificada (RODRIGUES, 2014).

É importante destacar o trabalho de Roux et al. (2015) que demonstrou que o FMN é capaz de transferir o íon hidreto proveniente do NAD(P)H para íons metálicos de monooxigenases (ROUX et al., 2015). Nesse sentido, o uso de compostos de coordenação parece ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos dirigidos à LbOYE e TcOYE, já que os centros metálicos desses compostos são capazes de coletar íons hidretos da enzima reduzida, levando a geração de espécies reativas de oxigênio tóxicas ao parasito(GONÇALVES et al., 2017).

1.3.4 Old Yellow Enzyme de Leishmania braziliensis (LbOYE)

A infecção bem-sucedida de *Leishmania* em macrófagos depende de uma grande variedade de mecanismos que permitem a sobrevivência do parasito no ambiente hostil de células fagocíticas. Seres humanos e algumas cepas de ratos infectados com *Leishmania spp.* exibem vários sintomas imunossupressores. De fato, tem se demonstrado

que o lisado de promastigotas de *Leishmania spp.* podem produzir prostaglandinas. Outros estudos mostraram que a infecção por *Leishmania spp.* leva a um aumento na expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) induzida pela geração de prostaglandina E2 (PGE2), em parte por uma via de proteína cinase C-dependente que favorece a persistência e progressão da *Leishmania spp.* (KUBATA et al., 2007).

Na busca por tratamentos mais efetivos, vários pesquisadores têm demonstrado o papel patológico que algumas classes de prostaglandinas (PGs) exercem nas leishmanioses e outras parasitoses. A título de exemplo pode-se citar a prostaglandina F2α (PGF2α), que é produzida a partir da prostaglandina H2 (PGH2) com a participação catalítica da enzima prostaglandina F2α sintase (PGFS). As PGs são ativamente produzidas e amplamente distribuídas em vários tecidos de mamíferos, onde elas são potentes mediadores de ampla variedade de respostas fisiológicas e patológicas incluindo a regulação do tônus vascular, aborto, disfunção ovariana, infertilidade, sonolência, inflamação, broncoconstricção, dores, febre, imunossupressão e outros sintomas. Entretanto, a produção de PGs não é restrita aos mamíferos. Estudos tem demonstrado a produção de PGs por parasitas como cestódeas, nematódeas, trematódeas e protozoários em resposta a adição de ácido araquidônico (AA) e cálcio ionofórico (KUBATA et al., 2000).

O conhecimento sobre o papel da LbOYE no metabolismo de cepas de *L. braziliensis* assim como sua relação estrutura-função é bastante limitado. Além disso, não se tem dados sobre atividade enzimática da LbOYE e sobre o efeito de compostos orgânicos neste processo. Buscas em bases de dados não retornaram estudos sobre a LbOYE, por esse motivo, novas pesquisas foram realizadas no intuito de se obter informações acerca da OYE em outras espécies de *Leishmania*, entretanto, não se obteve nenhum resultado.

1.3.5 Old Yellow Enzyme de Trypanosoma cruzi (TcOYE)

A TcOYE foi primeiramente identificada e caracterizada por Kubata *et al.* (KUBATA et al., 2002), que demonstrou que esta enzima catalisa a síntese da prostaglandina F2α (PGF2α) e que sua atividade catalítica é afetada por uma variedade de compostos tripanomicidas como naftoquinona e compostos nitroheterocíclicos. (KUBATA et al., 2002; SUGIYAMA et al., 2007).

Ainda dentro deste contexto, é importante mencionar os resultados encontrados por Murta *et al.* (2006), o qual evidenciou uma redução nos níveis de transcrição de até seis vezes da enzima TcOYE em cepas de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* a 2-nitroimidazol benznidazol (17-LER) em comparação ao tipo selvagem (17-WTS), indicando que o mecanismo de resistência ao composto envolve a deleção de cópias de genes da TcOYE (MURTA et al., 2006). Também é mostrado que a TcOYE é superexpressa em cepas susceptíveis ao benznidazol (ANDRADE et al., 2008) e que a imunoprecipitação da TcOYE em lisados celulares de *T. cruzi* elimina, em condições anaeróbicas, a atividade redutase sobre peróxidos, naftoquinonas e nitroheterocíclicos (KUBATA et al., 2002).

É importante destacar o trabalho de Mejía-Jaramillo *et al.* (2011) que mostrou que o gene TcOYE estava desregulado em parasitas resistentes ao benznidazol (Bz), indicando que a TcOYE participa na ativação do Bz gerando ânions radicais tóxicos no parasito (MEJÍA-JARAMILLO et al., 2011). Concordando com esses resultados, Garcia-Huertas et al. (2017) comprovou o papel da TcOYE na ativação do Bz, mostrando que parasitos que superexpressavam a TcOYE são mais sensíveis ao Bz e a H_2O_2. Interessantemente, quando os autores estimularam a superexpressão da TcOYE em parasitos resistentes, eles notaram que o protozoário não sobrevivia, provavelmente devido a incapacidade em lidar com o nível de estresse oxidativo e ao dano genético ocasionado pela superexpressão dessa proteína (GARCÍA-HUERTAS et al., 2017). Além disso, resultados recentes mostraram que a superexpressão da TcOYE reduz a capacidade do *T. cruzi* completar seu ciclo infectivo (DÍAZ-VIRAQUÉ et al., 2018).

A estrutura cristalográfica da TcOYE a 1,27 Å (acesso PDB 4E2B) foi resolvida pelo grupo de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, liderado pelo Prof. Dr. Júlio César Borges do Instituto de Química de São Carlos da USP. Em resumo, sua estrutura cristalográfica é compatível e condizente aos demais membros da família das OYEs, apresentando massa molecular de aproximadamente 45 kDa, estado monomérico e um enovelamento canônico do tipo barril-$(\alpha/\beta)_8$ (MURAKAMI et al., 2013). Contudo, não existem dados na literatura que relatem sobre a estabilidade química e térmica da TcOYE. Além disso, o conhecimento sobre o papel fisiológico dessa proteína ainda não é completamente compreendido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi caracterizar comparativamente, do ponto de vista estrutural e funcional, as enzimas LbOYE e TcOYE. Além disso, objetivou-se validar possíveis ligantes como substratos para essas enzimas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Produção das LbOYE e TcOYE recombinantes;
2. Análise comparativa das sequências de aminoácidos das LbOYE e TcOYE;
3. Determinação de elementos de estrutura secundária e terciária da proteína recombinante LbOYE;
4. Avaliar a estrutura terciária local das proteínas LbOYE e TcOYE por meio da fluorescência intrínseca do triptofano;
5. Caracterização dos parâmetros hidrodinâmicos e presença de estrutura quaternária da proteína recombinante LbOYE;
6. Avaliação da estrutura em baixa resolução e reconstrução de um modelo *ab initio* para a LbOYE;
7. Análise comparativa das estabilidades térmica e química das proteínas LbOYE e TcOYE;
8. Análise comparativa da interação das proteínas recombinantes com diferentes classes de ligantes (compostos α/β-insaturados e compostos de coordenação);
9. Identificação de moduladores e análise da atividade enzimática das proteínas LbOYE e TcOYE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções-tampão

A Tabela 3 sumariza as soluções-tampão que foram utilizadas, descrevendo sua composição e finalidade de uso.

Tabela 3: Relação de soluções-tampão utilizadas para purificação e caracterização das proteínas-alvo

Solução-tampão	Composição	Finalidade
A	Tris-HCl 50 mmol L^{-1} (pH 8,0), 100 mmol L^{-1} KCl	Lise bacteriana
B	Fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} (pH 7,4), NaCl 500 mmol L^{-1}, Imidazol 20 mmol L^{-1}	Etapa de lavagem na cromatografia de afinidade
C	Fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} (pH 7,4), NaCl 500 mmol L^{-1}, Imidazol 500 mmol L^{-1}	Eluição das proteínas na cromatografia de afinidade
D	Tris-HCl 25 mmol L^{-1} (pH 8,0), NaCl 100 mmol L^{-1}, 1 mmol L^{-1} de β-mercaptoetanol	Cromatografia de exclusão molecular e ensaios biofísicos e funcionais
E	Tris-HCl 25 mmol L^{-1} (pH 8,0), NaCl 100 mmol L^{-1}	Exclusivo para os ensaios de DSC

Fonte: Autoria própria

3.2 Análise da sequência de aminoácidos

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas LbOYE (XP001563080) e TcOYE (AAX5458.1) foi realizado com outros membros da família OYE. Para isso, foi elencado um total de seis proteínas, quatro delas que, assim como a LbOYE e a TcOYE, são pertencentes a subfamília clássica (LmOYE, OYE1, OPR1 e MR) e duas oriundas da subfamília *thermophilic-like* (Chr-OYE3 e YqjM). O alinhamento foi feito usando a plataforma Promals3D (http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php) e editado pelo software ESprit (ROBERT; GOUET, 2014).

3.3 Expressão, purificação e quantificação das proteínas recombinantes

Os DNAs codantes das proteínas LbOYE (gi|154333746) e TcOYE (gi|61741946) já se encontravam clonados no vetor pET28a e os testes de expressão sugeriram que as proteínas são produzidas na fração solúvel do lisado bacteriano. A expressão heteróloga do produto recombinante foi realizada em células *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET28a::TcOYE (MURAKAMI et al., 2013) e pET28a::LbOYE em meio LB (*Lysogeny Broth*) contendo 30 µg mL^{-1} do antibiótico canamicina. As células foram incubadas sobre agitação térmica (250 rpm) a 37 ºC durante 16 h. Posteriormente, inoculou-se o volume total da cultura anterior (5 mL) em um frasco

com 500 mL de meio LB e canamicina (30 µg mL^{-1}) e o deixou sobre agitação térmica a 37 ºC até atingir a $D.O_{600nm}$ (Densidade Óptica a 600 nm) ≈ 0,6 unidades de absorbância. Uma alíquota de 1 mL foi retirada nesta etapa como forma de representação da cultura antes da indução. Em seguida, a temperatura do agitador térmico orbital foi reduzida para 30 ºC. Após estabilizada a temperatura, a cultura foi induzida com 0,4 mM de IPTG (Isopropil β-D-tiogalactosídeo) e o frasco mantido sob agitação por 4h.

Após o período de indução, as células foram sedimentadas por centrifugação por 15 min à 12100 x *g* e 4 ºC. O precipitado assim obtido foi ressuspendido em 20 mL de solução-tampão A (conforme descrito na Tabela 3). Em seguida, adicionou-se 5U de DNAse (Promega) e 30 µg mL^{-1} de lisozima (Sigma) deixando a mistura em gelo por 30 min. As bactérias do pellet foram então lisadas por sonicação e centrifugado à 27000 x *g* por 30 min à 4 ºC. O sobrenadante, com o produto recombinante possuindo uma cauda de poli-histidina (His-LbOYE ou His-TcOYE), foi então filtrado e submetido à cromatografia de afinidade ao níquel em uma coluna *HiTrap Chelating HP* (GE Healthcare) equilibrada com a solução tampão B. Para eluição das proteínas heterólogas utilizou a solução tampão C (MURAKAMI et al., 2013).

A proteína de fusão eluída em 6 mL teve sua cauda de poli-histidina (poli-His) clivada através da incubação da amostra com trombina (Sigma) a 4 ºC overnight. A quantidade de trombina utilizada foi de 10 U para cada 10-15 mg de proteína com a cauda de poli-His. Após a clivagem, as proteínas foram aplicadas à coluna de exclusão molecular *HiLoad Superdex 200pg 16/60* (GE Healthcare) acoplada a um sistema HPLC (ÄKTA Purifier – GE Healthcare). Para o equilíbrio da coluna e eluição da proteína foi utilizado uma solução-tampão D sob o fluxo de 1,0 mL min^{-1}. A eluição de cada proteína foi monitorada pela absorbância no comprimento de onda de 280 nm. Cada passo de purificação foi verificado através da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 15%).

A quantificação da concentração de cada proteína foi feita por absorbância em 280 nm com o coeficiente de extinção molar de 52025 M^{-1} cm^{-1} para LbOYE e 64600 M^{-1} cm^{-1} para TcOYE determinado a partir da sequência de aminoácidos considerando a contribuição do grupo prostético FMN (MURAKAMI et al., 2013). As medidas de absorbância foram realizadas utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho

óptico em um espectrofotômetro UV-1800 (Schimadzu®). O cálculo da concentração molar foi conduzido após manuseio da equação de Beer-Lambert, descrito na equação 1.

$$A = Cxlx\varepsilon \qquad \text{[Equação 1]}$$

Onde, A é a absorbância em unidades arbitrárias, C é a concentração molar em mol L^{-1}, l é o caminho óptico em centímetros e ε é o coeficiente de extinção molar a 280 nm em mol L^{-1} cm^{-1} (Tabela 4).

3.4 Propriedades físico-químicas das proteínas alvos

Uma estimativa das propriedades físico-química teóricas foi predita a partir das respectivas composições de aminoácidos pelo programa Sednterp (http://www.jphilo.mailway.com/). As propriedades retornadas encontram-se reportadas na Tabela 4.

Tabela 4: Propriedades físico-químicas das proteínas recombinantes

Proteínas	ε_{280nm} (mol L^{-1} cm^{-1})	MM (kDa)	Vbar (cm^3 g^{-1})	R_0 (Å)	Nº de aminoácidos
LbOYE#	52025	41,1	0,7275	23	385
TcOYE#	64600	42,3	0,7368	23	382
LbOYE*	52025	43,2	0,7257	23	402
TcOYE*	64600	44,3	0,7323	24	409

Valores calculados considerando a proteína após a clivagem da cauda de polihistidina.

* Valores calculados considerando a proteína com a cauda de polihistidina.

Fonte: Autoria própria

3.5 Espectropolarimetria de dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar os elementos de estrutura secundária da proteína LbOYE e a estabilidade desta estrutura após o congelamento. Nesse ensaio, a proteína utilizada apresentava uma concentração de 18 μM.

As análises foram realizadas em equipamento *J-815 CD Spectrometer* (Jasco) acoplado a um sistema *peltier* para controle de temperatura e os espectros de CD foram coletados com 40 acumulativas e tempo de resposta de 1 segundo. Os resultados apresentados neste trabalho para o ensaio de CD mostram os valores da elipticidade molar

([θ]) em função do comprimento de onda, obtidos a partir da equação 1 (VAN HOLDE; JOHNSON; HO, 2006):

$$[\theta] = \frac{\theta x 100 x MM}{Cxlxn} \qquad \text{[Equação 1]}$$

onde, [θ] é a elipticidade molar residual média (em graus.cm².dmol^{-1}), θ é a elipticidade em graus (Deg), **MM** é a massa molecular da proteína em kDa, **C** é a concentração da proteína em mg.mL^{-1}, ***l*** é o caminho óptico em cm e **n** é o número de resíduos de aminoácidos da proteína.

3.6 Caracterização hidrodinâmica da proteína LbOYE

Os experimentos de caracterização hidrodinâmica da proteína LbOYE foram realizados através do uso de duas técnicas distintas, a saber: cromatografia de exclusão molecular analítica (aSEC) e ultracentrifugação analítica no modo de velocidade de sedimentação (SV-AUC).

A coluna Superdex 200 GL 10/30 (*GE Healthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema ÄKTA Prime Plus (*GE Healthcare Lifesciences*) foi utilizada para o experimento de cromatografia de exclusão molecular analítica. Foi aplicada uma concentração de 1,5 mg mL^{-1} de LbOYE a coluna previamente lavada com o Tampão D. A coluna foi calibrada com uma mistura de proteínas padrão (~1 mg mL^{-1}) de massa molecular conhecida: Apoferritina (480 kDa), γ-globulina (160 kDa), BSA (67 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo C (12,3 kDa). O tempo de retenção foi transformado no coeficiente de partição (k_{av}) aplicando a equação 2:

$$k_{av} = \frac{v_e - v_0}{v_t - v_0} \qquad \text{[Equação 2]}$$

onde $\mathbf{v_e}$ é o volume de eluição da proteína; $\mathbf{v_0}$ e $\mathbf{v_t}$ são o volume morto e total da coluna respectivamente (AMERSHAN BIOSCIENCE, 2006). O -log k_{av} foi plotado contra o raio de Stokes (R_s) para estimar o R_s da LbOYE por regressão linear.

Os experimentos de SV-AUC foram realizados em uma ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A. Os experimentos de velocidade de sedimentação para LbOYE foram realizados em sete concentrações diferentes, variando de 0,1 a 0,7 mg mL^{-1} preparados no mesmo tampão utilizado para o experimento de aSEC, a 20 °C, 35000 rpm (rotor AN-60Ti) e aquisição dos dados em 234 nm (concentrações mais baixas) e 239 nm (concentrações mais altas). Os dados experimentais foram ajustados pelo software SedFit

(versão 12.1). Como parâmetro de regularização, deixou-se a razão friccional (f/f_0) flutuar livremente. O coeficiente de sedimentação (s) foi obtido como o máximo do pico da curva de c(s) e convertido para condições padrão ($s_{20,w}$). Parâmetros como viscosidade do tampão (η = 1,0020 x 10^{-2}), densidade do tampão (ρ = 1,0031 g mL^{-1}) e volume parcial específico (Vbar = 0,7257 mL g^{-1}) foram estimados pelo programa Sednterp. Com os valores de $s_{20,w}$ para cada concentração da proteína, o coeficiente de sedimentação padrão foi estimado para 0 mg mL^{-1} ($s^0_{20,w}$) de proteína por regressão linear. A f/f_0 também foi calculada pela razão do s de uma esfera de massa equivalente ao dado experimental.

3.7 Desenovelamento térmico monitorado por DSC

A calorimetria de varredura diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) foi utilizada com o objetivo estimar a T_m (temperatura média na qual metade das moléculas de proteínas se encontram enovelada e metade desenovelada) para as proteínas LbOYE e TcOYE. Em geral, quanto maior o valor de T_m, mais estável termicamente é a proteína (REES; ROBERTSON, 2001).

O experimento de DSC para as proteínas LbOYE e TcOYE foi realizado no equipamento *Nano DSC (TA Instruments)*, no intervalo de monitoramento de 20 a 90 ºC usando taxa de aquecimento de 1 ºC/min com ajuste de pressão de ~3 atm. As concentrações de proteínas utilizadas nesse experimento estavam em torno de 1,3 a 1,7 mg mL^{-1} após diálise exaustiva em tampão contendo 25 mM de Tris (pH 8,0) e 100 mM de NaCl. Note que o tampão utilizado para esses experimentos é livre de β-mercaptoetanol, uma vez que esse composto, por ser um agente redutor, atua como interferente nos ensaios de DSC. É importante enfatizar que os experimentos foram realizados em duplicata e que os dados obtidos foram tratados no software *Launch NanoAnalyze (TA Instruments)* após dedução do branco (amostra contendo somente o tampão supracitado).

3.8 Fluorescência intrínseca do triptofano

A estrutura terciária local das proteínas LbOYE e TcOYE foi monitorada pela técnica de fluorescência intrínseca do triptofano. Para esse experimento, as proteínas obtidas em tampão D foram submetidas a análise no fluorímetro F-4500 (Hitachi). O comprimento de onda utilizado para excitação de cada proteína foi de 295 nm e a emissão da fluorescência foi coletada entre 305-420 nm. É importante enfatizar que os dados

foram coletados em duas situações distintas, uma com a proteína nativa e outra com a proteína desenovelada mediante a adição de 5 M de ureia (agente caotrópico).

Além da fluorescência intrínseca, testes de desenovelamento químico foram conduzidos fixando a concentração da proteína em aproximadamente 0,2 mg mL^{-1} e concentrações crescentes de ureia (0 a 8 M), ambos preparados em tampão D, com os dados coletados em um tempo de resolução da ordem de 50 ns por poço Os espectros coletados foram tratados para centro de massa espectral (<λ>) e ajustados pela função de Boltzmann para obtenção do valor de C_m.

$$\langle\lambda\rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \qquad \text{[Equação 3]}$$

onde, <λ> é o centro de massa espectral em nm; **Fi** é a intensidade de fluorescência medida e λ_i são os respectivos comprimento de onda (DORES-SILVA et al., 2012).

3.9 Determinação de forma e reconstrução de um modelo ab initio

A determinação de forma e reconstrução de um modelo *ab* initio se deu através de experimentos de SAXS (Espalhamento de raios-X a baixos ângulos) realizados no equipamento *D02-SAXS2* localizados no espaço do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS, Campinas – SP, Brasil). Os dados de SAXS foram registrados (dois frames consecutivos de 300 s) usando um detector multicanal sensível a posição MARCCD bidimensional. As medidas foram realizadas com um feixe de raios-X monocromático (λ=1,488 Å) em duas distâncias diferentes entre a amostra e o detector: ~2400 e ~550 mm cobrindo um vetor de espalhamento na faixa de 0,05 $Å^{-1} < q < 0,35$ $Å^{-1}$, onde q é a magnitude do vetor q definido como $\left({}^{4\pi}/_{\lambda}\right) sen2\theta$ (onde 2θ é o ângulo de espalhamento) (PETOUKHOV; SVERGUN, 2013). Para a realização do experimento, três concentrações da LbOYE foram obtidas: 1,5; 3,0 e 4,5 mg mL^{-1} em Tampão D. A função p(r) e os modelos *ab initio* foram obtidos conforme descrito por Murakami et al. (MURAKAMI et al., 2013; VELOSO-SILVA et al., 2019). Além disso, as propriedades hidrodinâmicas das estruturas em baixa resolução foram estimadas pelo programa *Hydropro* (GARCÍA DE LA TORRE; HUERTAS; CARRASCO, 2000). É importante destacar que o processo de coleta, tratamento e análise dos dados e geração do modelo *ab initio* foram conduzidos pelo colaborador Dr. Paulo Roberto Dores-Silva,.

3.10 Ensaios de prospecção de ligantes

Os ensaios de prospecção de ligantes foram realizados em leitor de microplacas no equipamento Varioskan™ LUX (Thermo Scientific™) utilizando uma microplaca (*Greiner, U-bottom, 96-well*). Foram avaliados um total de três ligantes para a LbOYE e seis ligantes para a TcOYE. Os ligantes testados são de diferentes identidades químicas. Alguns são derivados do lapachol (cortesia do professor Dr. Flávio da Silva Emery – FCF/USP), outros são compostos de coordenação preparados segundo os trabalhos de Dissertação de Mestrado das alunas Jackelinne Camargo de Lima e Ana Cristina Resende Gonçalves sob orientação do professor Dr. Pedro Ivo da Silva Maia (GONÇALVES, 2016; LIMA, 2017) e outro foi a menadiona, composto já referenciado como substrato padrão para a família OYE.

É importante ressaltar que, em princípio, todos os ligantes derivados do lapachol são passíveis de interagir com as proteínas da família OYE, conforme discutido na seção 1.3.3 desta tese. Além disso, a escolha desses ligantes se deu em virtude dos achados publicados nos trabalhos de Teixeira et al. (TEIXEIRA; ALMEIDA, 2001) e Lima et al. (LIMA et al., 2004), que demonstram que tanto o lapachol como seus derivados apresentam atividade leishmanicida. Como não há dados de validação do alvo para esses ligantes, assumimos que a interação dos ligantes no parasito seja mediada via LbOYE para *L. braziliensis* e TcOYE para *T. cruzi*. Já os compostos organometálicos, indicaram possibilidade de interação com a TcOYE mediante ensaios de docagem molecular realizado pelo grupo do professor Pedro Ivo S. Maia (UFTM). Além desses ligantes, ensaios de prospecção foram conduzidos para o ligante menadiona, cuja interação com a família OYE é devidamente comprovada (KUBATA et al., 2002; SUGIYAMA et al., 2007).

Com base em testes previamente realizados, a concentração de DMSO foi fixada em 1%, utilizando-se 295 nm como comprimento de onda de excitação. Além disso, o experimento foi realizado em duplicata, variando a concentração do ligante de 0 a 90,3 μM e mantendo a concentração da proteína constante em 2 μM. A solução estoque dos ligantes foi preparada em 100% de DMSO. O controle negativo de cada ligante foi preparado da mesma forma que a amostra, com a diferença que nos brancos não continha a proteína recombinante. Os dados foram coletados em um espectro de emissão de fluorescência nos intervalos de 313 a 420 nm em diferentes temperaturas (298 K; 300 K; 303 K e 308 K) e plotados em um primeiro gráfico a fim de se definir o $\lambda_{máx}$ para cada

ligante e proteína. Definido o $\lambda_{máx}$, gráficos de Stern-Volmer, ajuste de Hill e gráfico de duplo-log foram plotados para cada uma das temperaturas testadas.

É importante enfatizar que a intensidade de fluorescência em $\lambda_{máx}$ estabelecido para cada ligante foi corrigida pelo efeito do filtro interno, conforme equação 1 (LAKOWICZ, 2006).

$$F_{corr} = F_{obs}.antilog\left(\frac{A_{exc}+A_{emi}}{2}\right) \qquad \text{[Equação 4].}$$

Na equação 4, F_{corr} representa a intensidade de fluorescência corrigida, F_{obs} é a intensidade de fluorescência observada, A_{exc} e A_{emi} são a absorbância de excitação e emissão, respectivamente, para cada ligante avaliado.

Os dados de supressão de fluorescência do triptofano foram analisados pela equação de Stern-Volmer (Equação 5) (ANAND et al., 2011).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}.[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \qquad \text{[Equação 5].}$$

Onde, F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor, [Q] é a concentração do supressor, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, k_q é a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de meia vida não suprimida. Para estimar a constante de ligação aparente (K_A) e a estequiometria da reação (n), foi usada a equação de duplo-log conforme apresentado a seguir (ANAND et al., 2011).

Com os valores das intensidades de fluorescência corrigidos pelo efeito do filtro interno, um gráfico F_0-F/F_0 como uma função da concentração do ligante ([L]) foi construído. A curva hiperbólica foi ajustada como um modelo de ligação com um sítio independente (Origin software), resultando em uma constante de dissociação aparente (K_{Dapp}), como descrito pela seguinte equação (SILVA; SERAPHIM; BORGES, 2013).

$$(F_0 - F)/F_0 = [L]/([L] + K_D \qquad \text{[Equação 6].}$$

Na equação 7, [Qt] e [Pt] representam respectivamente a concentração do supressor e da proteína.

$$log\left[\frac{(F_0-F)}{F}\right] = nlogK_A - nlog\left(\frac{1}{[Q_t]} - \frac{\{(F_0-F)[P_t]\}}{F_0}\right) \qquad \text{[Equação 7].}$$

3.11 Ensaios de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio

Experimentos anteriores com a LbOYE e TcOYE mostraram que o oxigênio atua como um aceptor de elétrons ocasional (dados não mostrados), conforme demonstrado para outros membros dessa família de proteínas (MEAH; MASSEY, 2000; STUERMER et al., 2007; TOOGOOD; GARDINER; SCRUTTON, 2010). Por esse motivo, foi concebido um experimento no qual a pressão de oxigênio (pO_2) apresentava-se virtualmente reduzida, minimizando assim sua interferência no processo reacional.

Para esse experimento, foi utilizado uma concentração de proteína de 8 $\mu mol\ L^{-1}$ (~ 0,4 mg mL^{-1}) e NAD(P)H na ordem 80 $\mu mol\ L^{-1}$. Como o fluxo de argônio promove formação de espumas da proteína, optou-se por aquecer a mesma a uma temperatura de 35 ºC por 1h e assim minimizar o efeito do oxigênio na reação final. Vale deixar claro que o experimento foi conduzido em duas etapas, uma para retirar o oxigênio do sistema reacional composto pelo tampão, NAD(P)H e ligante através de um fluxo contínuo de argônio mantida por 40 min e outra etapa que consistiu na evaporação do oxigênio da proteína conforme descrito acima. A transferência da proteína para a cubeta de leitura foi realizada com o auxílio de uma seringa Hamilton com sistema *Gastight*® modelo #1001 para reduzir o contato do líquido no interior da seringa com o oxigênio atmosférico. A reação foi acompanhada em cubeta fechada durante 20 minutos registrando-se os espectros (300-600 nm) a cada 60 s. Para a avaliação da atividade enzimática foram utilizados os comprimentos de onda 340 nm, relativo a oxidação do NAD(P)H e 460 nm, relativo a reoxidação do FMN reduzido.

A análise dos dados ocorreu de forma visual e gráfica, acompanhando a modificação da absorbância em 340 nm e 460 nm ao longo do curso reacional. Em experimentos anteriores, foi evidenciado que a absorbância do NAD(P)H se mantinha constante na ausência da proteína e que, portanto, uma redução na absorbância do NAD(P)H nessa região do espectro indicaria que a proteína obtida se encontrava na sua forma funcional. Para uma avaliação mais precisa, um gráfico da absorbância em 340 nm em função do tempo reacional foi obtido. Uma curva de decaimento exponencial indica que o NAD(P)H está sofrendo oxidação na presença da proteína, do contrário, é esperado que a curva reacional se mantenha constante durante toda a reação.

A absorbância em 460 nm também foi monitorada de forma visual e gráfica, fixando esse comprimento de onda e observando sua modificação temporal. Um perfil

sigmoide em função do tempo reacional indica que o FMN da proteína está sendo reduzido pela ação do NAD(P)H. A adição de um composto que atue como substrato deve, em teoria, ser capaz de reoxidar o grupo prostético a ponto de recuperar a intensidade de absorbância registrada no início da reação na ausência do ligante.

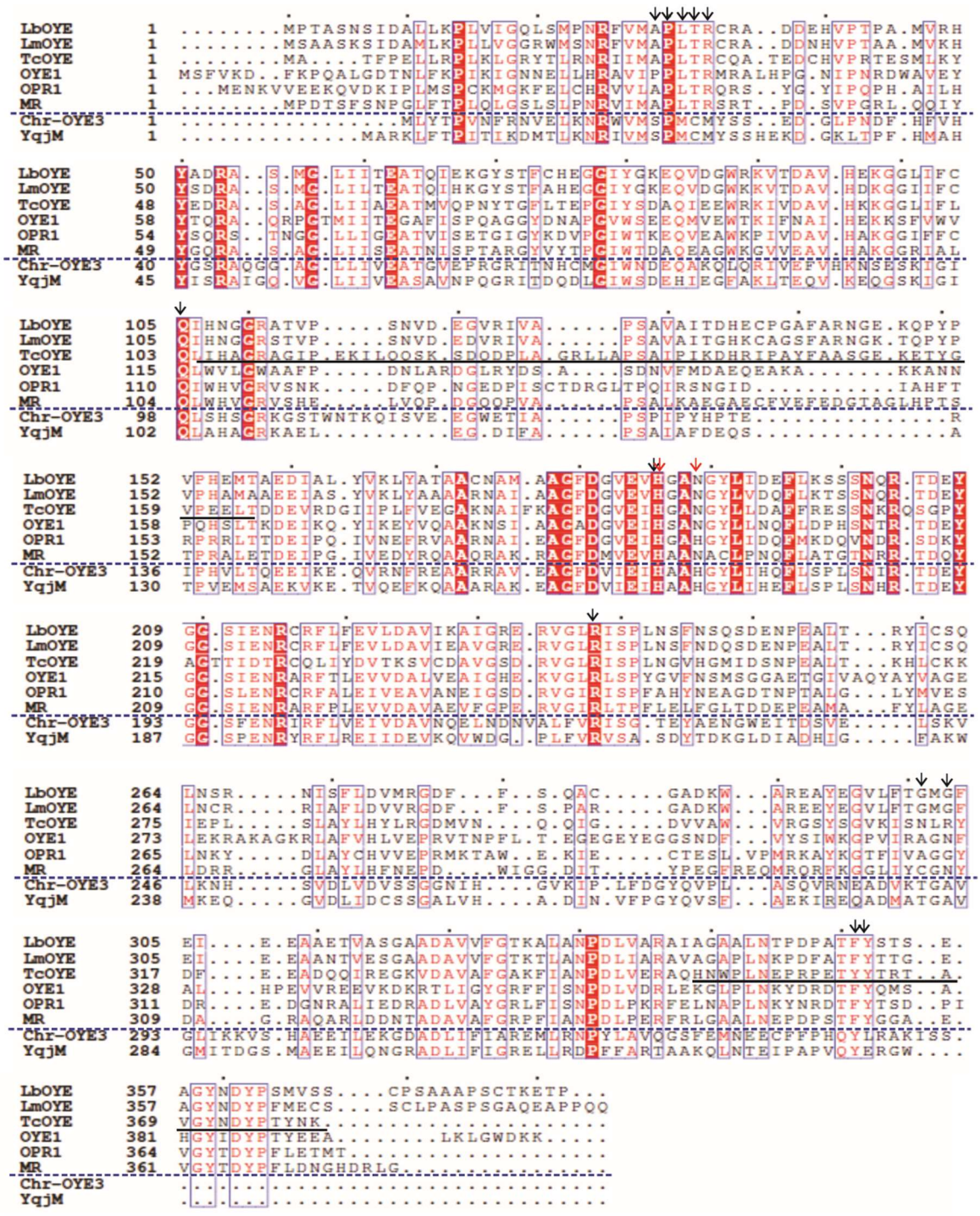
4 RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os principais resultados obtidos para caracterização estrutural e funcional das proteínas LbOYE e TcOYE. Para facilitar a compreensão, os dados de caracterização estrutural são apresentados antes dos de caracterização funcional com o intuito de ter uma visão mais didática e clara acerca dos resultados obtidos.

4.1 Análise da sequência de aminoácidos

As sequências de aminoácidos das proteínas LbOYE e TcOYE foram analisadas mediante a técnica de alinhamento sequencial com diferentes homólogos da família OYE. Para essa análise, além da comparação com proteínas da subfamília clássica, duas proteínas da subfamília *thermophilic*-like foram incorporadas na análise. O resultado obtido está ilustrado na Figura 12 e a matriz de identidade entre essas proteínas estão sumarizadas na Tabela 5.

Figura 12: Alinhamento das sequências de aminoácidos LbOYE e TcOYE com OYEs homólogas. Números de acesso: LbOYE (XP001563080), LmOYE (XP001681722), TcOYE (AAX5458.1), OYE1 (Q02899), OPR1 (Q9XG54), MR (AAC43569), Chr-OYE3 (KJ019329) e YqjM (P54550). A linha pontilhada em azul separa a subfamília clássica da *thermophilic-like*. O sublinhado nos resíduos de aminoácidos 105-165 e 351-379 de TcOYE representa o *loop* flexível. Os resíduos conservados são representados por caixas sombreadas em vermelho, enquanto resíduos similares são indicados por caixas não sombreadas. As setas pretas indicam os resíduos de aminoácidos que compõem o local de ligação da FMN e a seta vermelha indica os resíduos envolvidos na estabilização do substrato.



Fonte: (VELOSO-SILVA et al., 2019)

O resultado retratado na Figura 12 mostra que os resíduos envolvidos na ligação do FMN são bastante conservados dentro de uma mesma subfamília, como pode ser notado pelo motivo APLTR (resíduos 29 – 33 na LbOYE) na subfamília clássica. Além disso, é importante notar na Figura 12 que as proteínas da subfamília *thermophilic-like* apresentam, em geral, menor quantidade de resíduos de aminoácidos por unidade monomérica, conforme descrito em estudos anteriores (ADALBJÖRNSSON et al., 2010; TOOGOOD; SCRUTTON, 2014). O par catalítico H186-H/N189 é bem conservado ao longo de todos os membros da família OYE, reforçando sua importância evolutiva na ação catalítica dessas proteínas.

Apesar da alta conservação entre resíduos importantes na família OYE, é possível notar que existem regiões no alinhamento onde há pouca conservação. Dentre elas, a região do *loop* flexível. Isso é evidente quando se observa na Figura 12, a região sublinhada no alinhamento da TcOYE, que destaca o *loop* flexível desta proteína. É possível notar que existe baixa conservação dos resíduos de aminoácidos que compõe tal *loop*, o que pode explicar a grande diversidade de substratos categorizados para essa família de proteínas (VELOSO-SILVA et al., 2019).

Tabela 5: Matriz de identidade percentual de alguns membros da família OYE.

Proteína	LbOYE	LmOYE	TcOYE	OYE1	OPR1	MR	Chr-OYE3	YqjM
LbOYE	100	-	-	-	-	-	-	-
LmOYE	82	100	-	-	-	-	-	-
TcOYE	46	44	100	-	-	-	-	-
OYE1	36	35	31	100	-	-	-	-
OPR1	36	38	37	39	100	-	-	-
MR	41	40	39	36	45	100	-	-
Chr-OYE3	30	28	25	25	31	31	100	-
YqjM	31	28	26	25	26	30	53	100

Fonte: Criado e adaptado por *Clustal 2.1*.

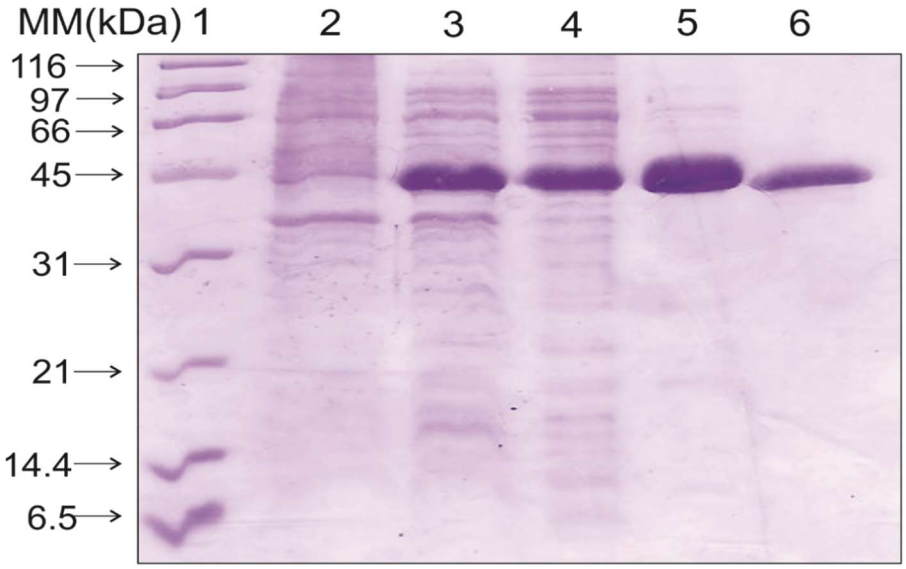
A análise da Tabela 5 mostra que a identidade percentual é maior entre membros de uma mesma subfamília, conforme esperado. Note, por exemplo, que a identidade entre os ortólogos LbOYE e TcOYE, foco dessa tese, é da ordem de 46%. Isso reforça que essas proteínas são estruturalmente similares e, provavelmente, compartilham um mesmo ancestral comum (ANDRADE; FILHO; ALENCASTRO, 2003).

4.2 Expressão, purificação e quantificação das proteínas recombinantes

A Figura 13 mostra o resultado do processo de expressão e purificação da proteína LbOYE. É importante enfatizar que a purificação das proteínas recombinantes

ocorreu em dois passos cromatográficos (afinidade ao Ni^{2+} e gel filtração preparativa) que estão representados nas canaletas 5 e 6. Note que a canaleta 6 evidencia uma pequena redução da massa molecular da proteína, sugerindo que a etapa de clivagem da cauda de histidina ocorreu de forma satisfatória. Além disso, a Figura 13 revela que a proteína foi produzida majoritariamente na fração solúvel e obtida com alto grau de pureza.

Figura 13: Gel SDS-PAGE 15% das frações obtidas durante a expressão e purificação da LbOYE. Nas canaletas, 1 representa o marcado molecular de proteínas padrão, 2 é a fração da LbOYE não induzida, 3 representa a fração LbOYE induzida à 30 ºC por 4h, 4 é a fração solúvel, 5 é a fração eluída a partir da purificação por afinidade em Níquel e 6 representa a fração eluída da LbOYE na Gel filtração após um período de 16h de clivagem em trombina.



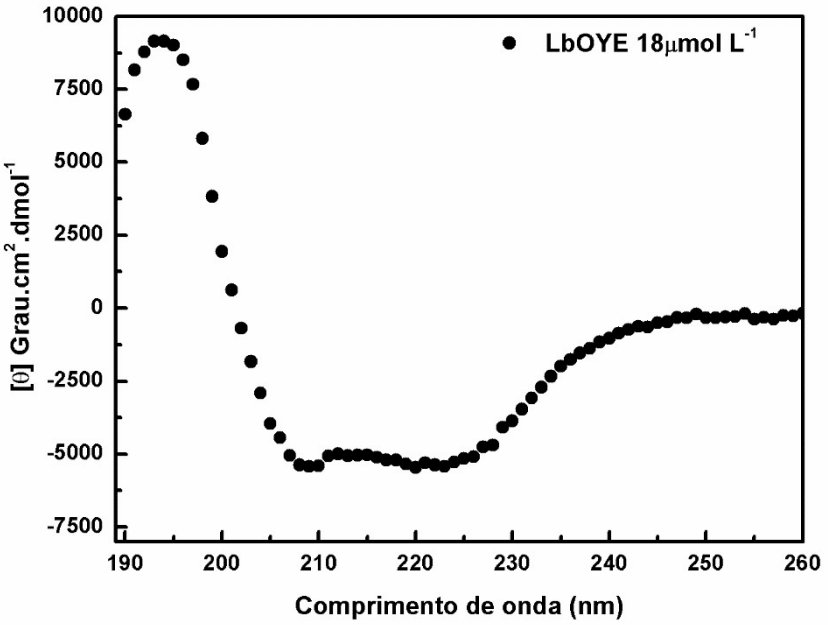
Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019)

4.3 Caracterização da estrutura secundária e terciária das proteínas recombinantes

Uma vez que a proteína foi obtida na fração solúvel e com alto grau de pureza, o próximo passo consistiu em avaliar se a proteína foi obtida de forma estruturada e, como primeira estratégia, foi verificado o conteúdo de estrutura secundária da LbOYE por CD. A Figura 14 mostra o espectrograma de CD obtido para proteína LbOYE no intervalo 260 – 190 nm.

É possível notar no espectro da Figura 14 três bandas principais: uma em 195 nm, outra em 208 nm e mais uma em 222 nm. Isso nos indica que a proteína LbOYE foi obtida na sua forma enovelada, apresentando em sua estrutura elementos de hélice-α e folha-β.

Figura 14: Espectro de CD para proteína LbOYE

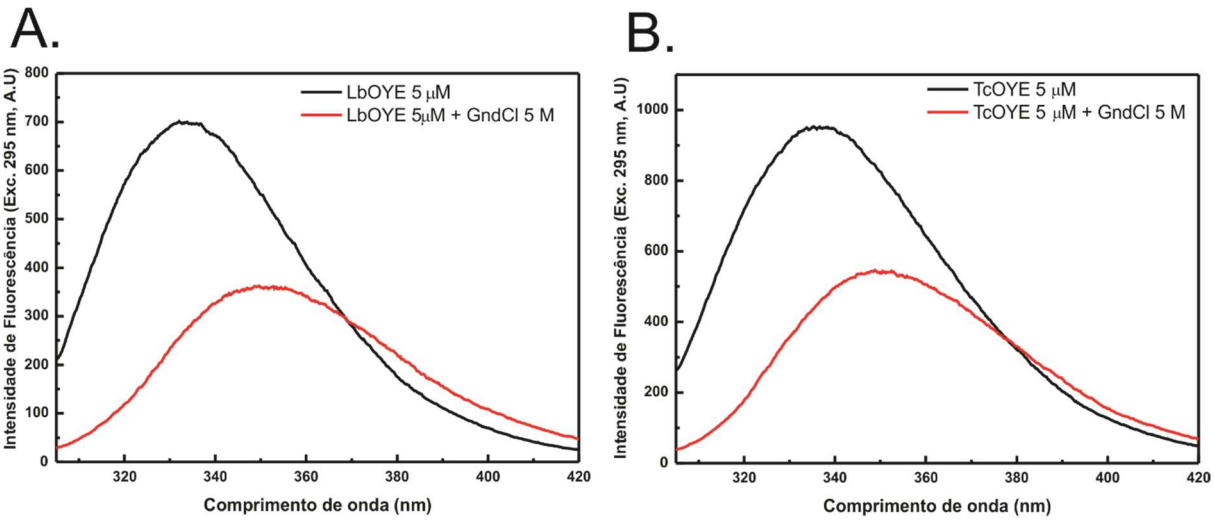


Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019)

Uma análise mais detalhada através do software *Dichroweb* foi conduzida para estimar o conteúdo de estrutura secundária da proteína LbOYE, resultando nos seguintes valores percentuais: 25% de hélices-α; 23% de folhas-β; 18% de voltas-β e 32% de estrutura randômica (*random-coil*).

A proteína LbOYE apresenta dois resíduos de triptofano enquanto a TcOYE apresenta três, dois dos quais encontram-se conservados com as da LbOYE. Esses triptofanos foram utilizados como sondas de estrutura terciária local nos experimentos de emissão de fluorescência. Esses experimentos foram realizados em duas situações distintas (proteína nativa e proteína nativa + agente desnaturante). Os espectros de emissão de fluorescência estão apresentados na Figura 15. O λ_{exc} para todas as medidas foi de 295 nm.

Figura 15: Fluorescência intrínseca do Trp para as proteínas em estudo. A. Fluorescência intrínseca do Trp para LbOYE nativa (curva em preto) e com 5 M de GndCl (curva em vermelho). **B.** Fluorescência intrínseca do Trp para TcOYE nativa (curva em preto) e com 5 M de GndCl (curva em vermelho).



Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019)

A Tabela 6 apresenta um resumo das propriedades estruturais e espectroscópicas provenientes do experimento de CD e fluorescência intrínseca do triptofano ilustrados nas Figuras 14 e 15.

Tabela 6: Propriedades estruturais e espectroscópicas das proteínas recombinantes

Técnica	Propriedades	Proteínas	
		LbOYE	TcOYE$^{\Delta}$
CD	Hélice-α (%)	25	15
	Folha-β (%)	23	21
	Estrutura randômica (%)	32	34
Fluorescência	$\lambda_{máx}$ (nm)	333 ± 1	336 ± 1
	$\lambda_{máx}$ 5M GndCl(nm)	350 ± 1	350 ± 1
	<λ> (nm)	344,6 ± 0,3	344,1 ± 0,1
	<λ>5 M GndCl (nm)	354,1 ± 0,2	352,4 ± 0,2

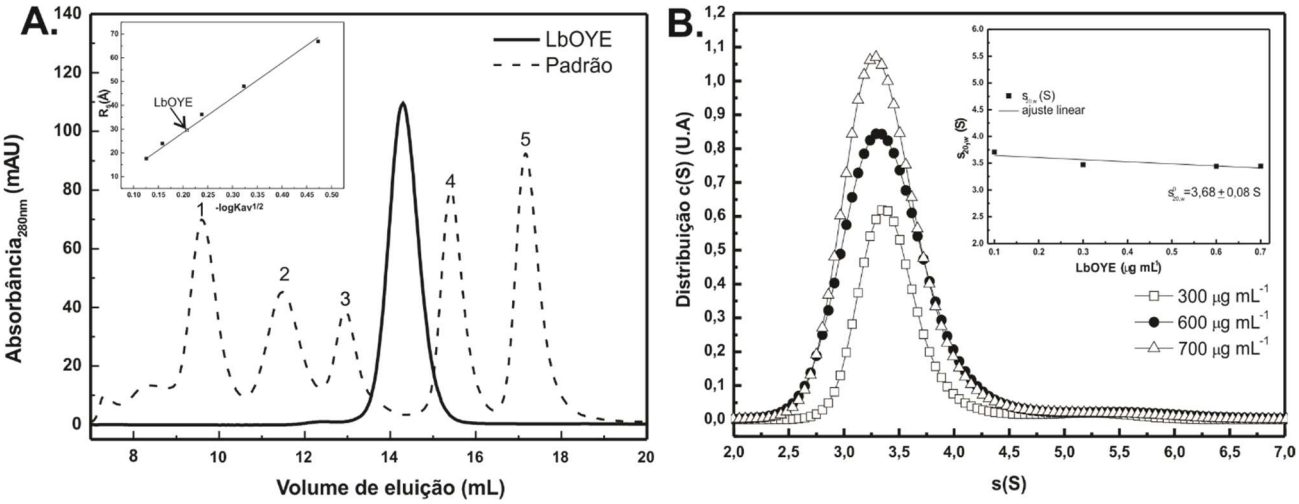
Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019) / $^{\Delta}$*Adaptado de* (MURAKAMI et al., 2013)

É importante notar que tanto o $\lambda_{máx}$ quanto o <λ> das duas proteínas foram menores com condições não desnaturantes (Tabela 6), indicando que o ambiente local dos Trps dessas proteínas encontra-se em ambientes parcialmente ou completamente protegidos do solvente.

4.4 Caracterização hidrodinâmica da LbOYE

Duas estratégias biofísicas diferentes foram utilizadas para caracterização hidrodinâmica da proteína LbOYE (aSEC e SV-AUC). Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 16.

Figura 16: Caracterização hidrodinâmica da proteína LbOYE. A. Cromatografia de exclusão molecular analítica realizada para proteína LbOYE. As numerações sobrescritas ao cromatograma pontilhado identificam as 5 proteínas que foram usadas como padrão: 1) Apoferritina (480 kDa), 2) γ-globulina (160 kDa), 3) BSA (67 kDa), 4) Anidrase carbônica (30 kDa) e 5) Citocromo C (12,3 kDa). **B.** Experimentos de velocidade de sedimentação em equilíbrio por Ultracentrifugação analítica obtida para proteína LbOYE.



Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019)

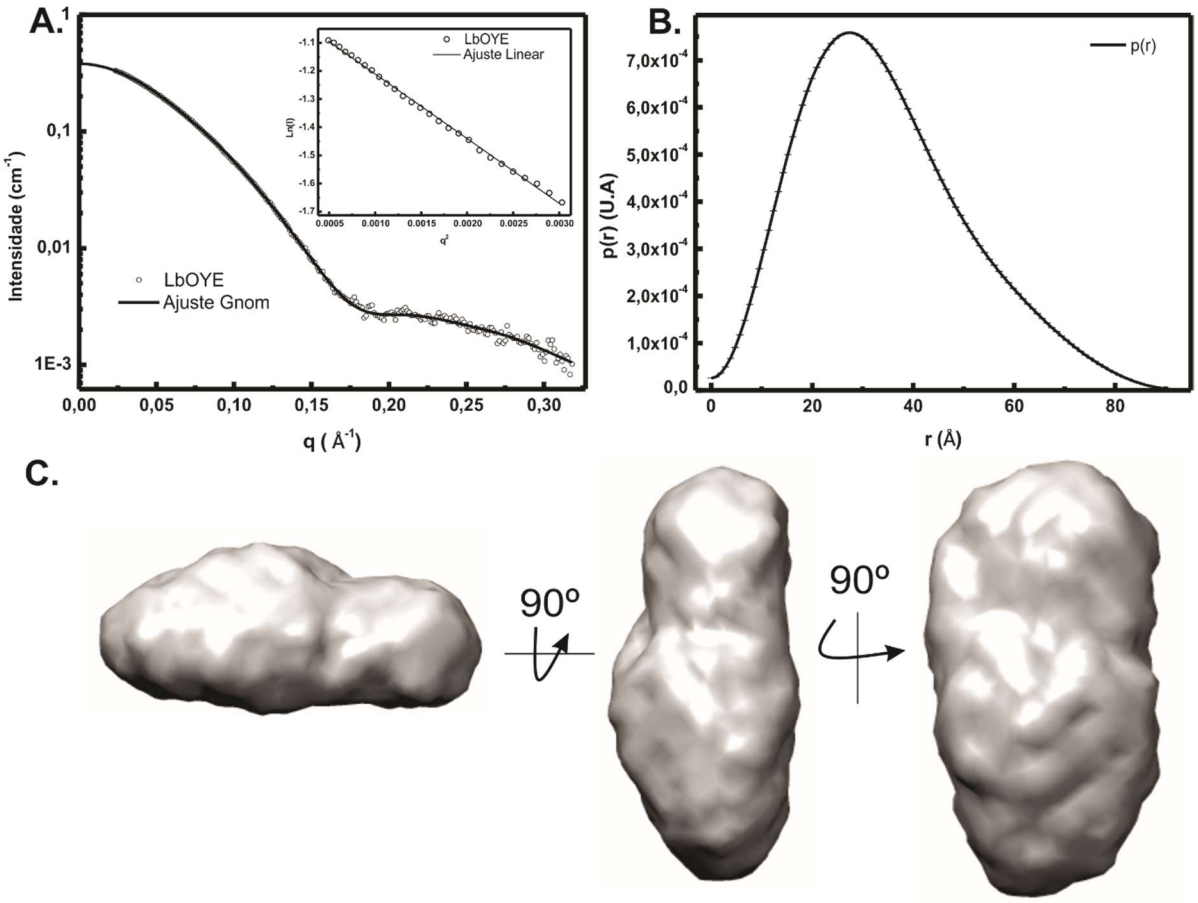
No painel 16A, o perfil de eluição da LbOYE está representado por uma linha contínua, evidenciando um volume de eluição de aproximadamente 14,5 mL. O padrão de proteínas com MM conhecida está representado por linhas pontilhadas. No inserto da Figura 16A é mostrado a curva padrão R_S x -log $K_{av}^{-1/2}$, que nos permitiu estimar os valores do R_S e do f/f_0 da LbOYE em 29 ± 1 e 1,3 ± 0,1 Å, respectivamente. Além disso, o experimento de aSEC nos forneceu uma estimativa da MMapp da LbOYE em aproximadamente 51 ± 6 kDa que é próxima ao valor da MM da proteína monomérica calculado a partir da sequência de aminoácidos.

Como estratégia complementar, foi realizado o experimento de SV-AUC cujo resultado obtido está ilustrado no painel 16B. Note que o perfil de distribuição c(S) revela a sedimentação de apenas uma espécie em solução, qualquer que seja a concentração de proteína utilizada. No inserto do painel 16B temos um ajuste linear para o gráfico $s_{20,w}$ x concentração da LbOYE que nos forneceu o valor de $s^0_{20,w}$ igual a 3,68 ± 0,08 S.

4.5 Determinação de forma e reconstrução de um modelo ab initio

Experimentos de SAXS foram realizados com o objetivo de ampliar o entendimento estrutural da LbOYE em solução. A curva experimental de SAXS obtida para proteína LbOYE à 3,0 mg mL^{-1} bem como o ajuste realizado pelo software GNOM estão retratados na Figura 17A. Os resultados obtidos a partir desses ajustes revelam que a LbOYE se comporta como um sistema monodisperso em solução, com valores de R_G de 27,0 ± 0,3 Å e MM de 40 ± kDa, sugerindo que a proteína é um monômero na faixa de concentração estudada (1,5 – 4,5 mg mL^{-1}). A Figura 17B mostra a função p(r) para LbOYE onde é possível notar que seu valor de Dmáx é da ordem de 80 Å, revelando assim um formato sutilmente alongado dessa proteína em solução.

Figura 17: Resultados dos ensaios de SAXS para proteína LbOYE. A. Curva de espalhamento da LbOYE a 3,0 mg mL^{-1} (círculos abertos)**.** A linha sólida preta representa o melhor ajuste obtido com o software GNOM. O inserto ilustra a região de Guinier evidenciando a monodispersividade da proteína em solução. **B.** Curva de distribuição de frequência para LbOYE. O dado sugere que a proteína é sutilmente alongada em solução com Dmáx próximo a 80 Å. **C.** Modelo *ab initio* gerado para LbOYE apresentado em diferentes orientações. O modelo gerado sugere que a LbOYE é sutilmente mais alongada e provavelmente mais flexível que a proteína TcOYE.



Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019)

Os dados de SAXS obtidos foram utilizados para gerar modelos *ab initio* pelo programa DAMMIM. É importante destacar que os modelos *ab initio* não fornecem uma solução única, dessa forma, 20 reconstruções independentes dos modelos *ab initio* foram geradas e uma média foi obtida a partir usando parâmetros de filtragem do programa DAMAVER. O resultado obtido a partir desse tratamento está ilustrado no painel 17C. Note que o modelo gerado evidencia uma proteína sultimente alongada, compatível com uma forma prolata. O modelo *ab initio* final foi analisado usando o software *HydroPro* para estimar as propriedades hidrodinâmicas e compará-los com os dados experimentais. Esses resultados podem ser consultados na Tabela 7.

Tabela 7: Resumo das propriedades estruturais e hidrodinâmicas para proteína LbOYE

Propriedades estruturais e hidrodinâmicas	Técnica/Metodologia				
	Predito	aSEC	SV-AUC	SAXS	*HydroPro*[*1]
MM (kDa)	42	51 ± 6	41 ± 1	40 ± 4[*2]	-
$s^0_{20,w}$ (S)	4,35	-	3,68 ± 0,08	-	3,14 ± 0,03
R_S (Å)	23	29 ± 1	-	-	33 ± 2
f/f_0	1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	-	1,4 ± 0,1
R_G (Å)	-	-	-	27,0 ± 0,3	28,0 ± 0,2
D_{max} (Å)	-	-	-	100 ± 10	100 ± 5

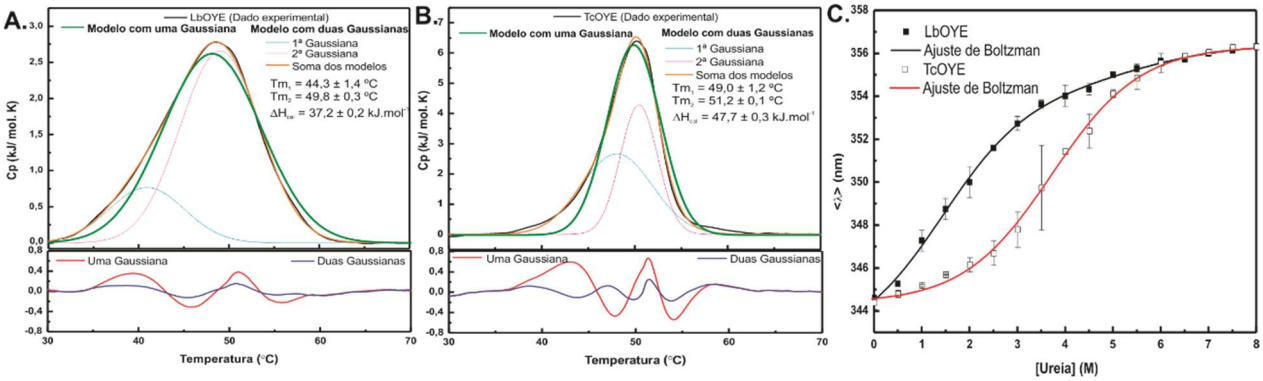
[*1]Predita a partir do modelo *ab initio* criado para LbOYE a partir dos dados de SAXS.
[*2]Usando BSA como padrão, os dados de SAXS indicam uma MM de cerca de 49 kDa.
Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019).

4.6 Investigação da estabilidade térmica e química das LbOYE e TcOYE

Para uma melhor compreensão da organização estrutural das proteínas recombinantes obtidas, ensaios de estabilidade térmica e química foram conduzidos sob o olhar de diferentes técnicas biofísicas. Para se verificar a estabilidade térmica, foi monitorado o perfil de desenovelamento da estrutura terciária global mediante ensaios calorimétricos por DSC. Os resultados obtidos estão ilustrados nos painéis 18 A e 18 B. É importante destacar que para cada proteína, foram realizados ajustes com uma e com duas Gaussianas e que para cada uma dessas análises, painéis contendo os residuais também foram gerados. Note que os ajustes com duas Gaussianas foram as que obtiveram menor dispersão residual para ambas proteínas. Os valores de Tm e ΔH_{den} estão resumidos na Tabela 8.

Em termos químicos, a estabilidade estrutural das proteínas recombinantes foi monitorada por fluorescência intrínseca do triptofano em diferentes concentrações do agente desnaturante. O perfil da curva obtida encontra-se no painel C da Figura 18 e os valores de Cm estimados estão resumidos na Tabela 8.

Figura 18: Experimentos de estabilidade térmica e química das proteínas LbOYE e TcOYE. A. e **B.** Estabilidade térmica das proteínas recombinantes monitoradas por DSC. **C.** Estabilidade química das proteínas recombinantes monitorados por fluorescência intrínseca.



Fonte: Adaptado de (VELOSO-SILVA et al., 2019)

Tabela 8: Resumo dos resultados obtidos para os ensaios de desenovelamento térmico e químico por DSC e espectrometria de fluorescência, respectivamente.

Técnica	Propriedades	Proteínas	
		LbOYE	TcOYE
DSC	T_m* (ºC)	48 ± 1	49.7 ± 0.3
	$T_{m1}$$ (ºC)	44 ± 1	49 ± 1
	$T_{m2}$$ (ºC)	49.8 ± 0.3	51.2 ± 0.1
	ΔH_{den} (kJ mol^{-1})	37.2 ± 0.2	47.7 ± 0.3
Espectrometria de fluorescência	C_m ($mol.L^{-1}$)	1.4 ± 0.2	3.8 ± 0.1

* Ajuste com uma Gaussiana; $ Ajuste com duas Gaussianas

4.7 Ensaios de prospecção de ligantes

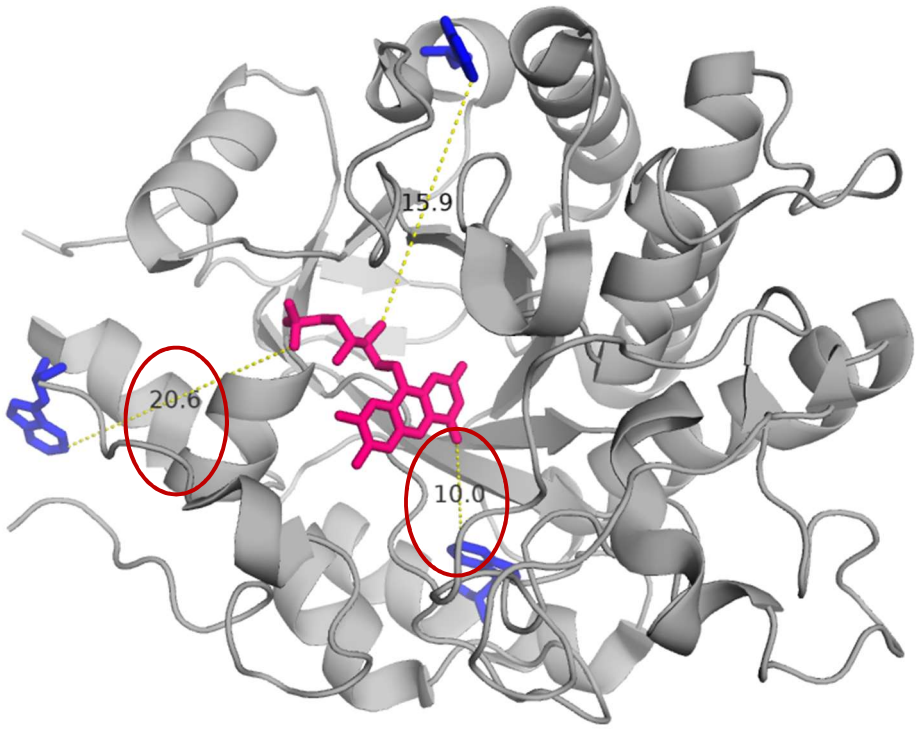
É esperado que toda proteína, mantida seu aspecto funcional, interaja com algum ligante, seja um composto químico inorgânico, orgânico ou até mesmo outra proteína (VAN HOLDE; JOHNSON; HO, 2006). A identificação de compostos que interajam com a proteína de estudo pode ser facilitada pela busca de ligantes que modulem a atividade funcional da mesma. Neste trabalho, em particular, modular a atividade funcional da OYE significa estimular sua ação catalítica, ativando-a ou inativando-a.

Do universo de vinte aminoácidos que podem fazer parte da estrutura de uma proteína, apenas três deles apresentam fluorescência intrínseca (Trp, Tyr e Phe). Por sorte,

esses aminoácidos são frequentemente raros na estrutura proteica. O triptofano, por exemplo, está geralmente presente em uma frequência de ~1 mol% em proteínas (LAKOWICZ, 2006). Isso permite que esses aminoácidos sejam monitorados via fluorescência intrínseca para avaliar afinidade da interação proteína-ligante. Pensando nisso e considerando que a LbOYE e a TcOYE apresentam 2 e 3 resíduos de triptofano, respectivamente, foi elencada a estratégia da supressão de fluorescência (*quenching*) como ferramenta de estudo na prospecção dos ligantes. Além disso, é importante ressaltar que 2 dos 3 resíduos de Trp da TcOYE são conservados na LbOYE conforme mostrado no alinhamento da Figura 12.

É interessante destacar que os resíduos de Trp conservados nas proteínas LbOYE e TcOYE encontram-se a uma distância 10 Å (W86) e 21 Å (W301) do grupo prostético FMN (Figura 19). A escolha dos ligantes se fundamentou essencialmente em três aspectos: 1) natureza química do ligante – nesses casos, compostos α,β-insaturados foram elencados; 2) interação *in silico* do ligante com a proteína (via docagem molecular); e 3) atividade tripanomicida *in vivo* do ligante.

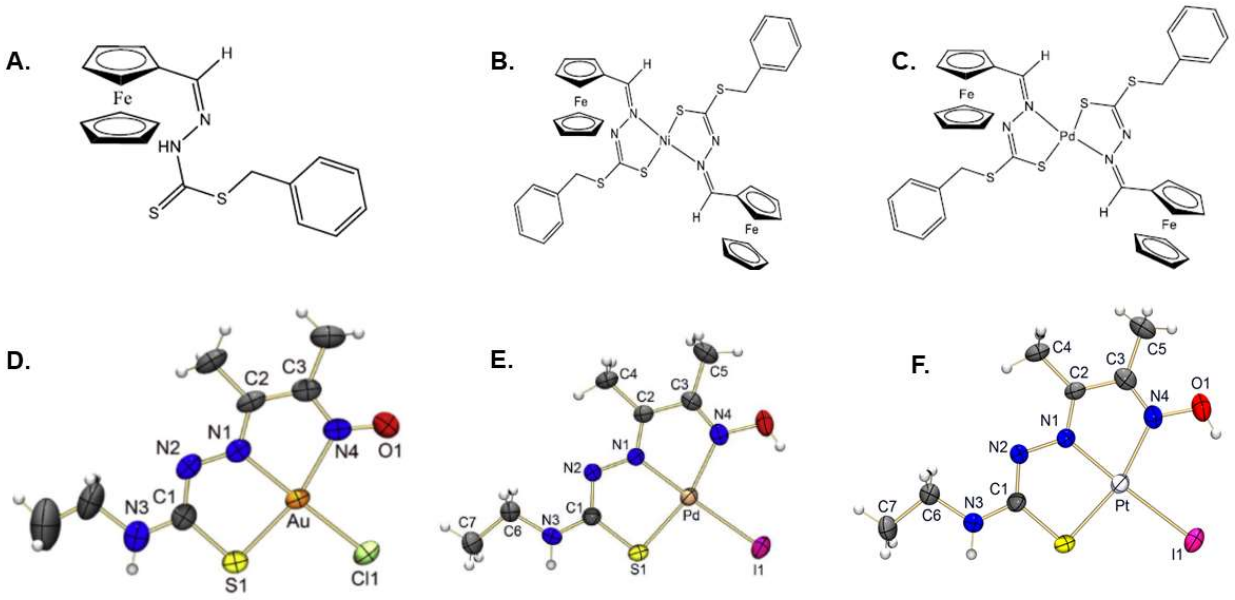
Figura 19: Distância relativa dos resíduos de triptofano da proteína TcOYE e o grupo prostético FMN. Na cor magenta, está representado o grupo FMN e em azul, os resíduos de triptofano presentes na proteína TcOYE. O circunscrito em vermelho destaca os resíduos de triptofano que são conservados na proteína LbOYE



Fonte: Autoria própria.

Como os triptofanos dessas enzimas localizam relativamente próximos ao sítio ativo, infere-se que a interação proteína-ligante promova uma perturbação na intensidade de emissão de fluorescência desses triptofanos. A estrutura química dos compostos de coordenação utilizados nos ensaios de prospecção de ligantes estão apresentados na Figura 20. Os resultados apresentados nas Figuras 21 e 22 são os encontrados para a interação dos ligantes isolapachol e α-lapachol com a proteína LbOYE a 298 K. A princípio, a supressão da fluorescência pode ser ocasionada pela perturbação dos Trp nas posições 86 e 301 (numeração LbOYE), por estarem relativamente próximas ao sítio ativo como anteriormente discutido. É importante enfatizar que a intensidade de fluorescência utilizada para determinação da afinidade e estequiometria da reação foi corrigida pelo efeito do filtro interno através da determinação dos coeficientes extinção molar nos λ_{exc} e λ_{em} para cada ligante monitorado. Os valores dos coeficientes de extinção molar dos ligantes avaliados encontram-se na Tabela 9.

Figura 20: Estrutura química dos ligantes testados contra as proteínas recombinantes TcOYE e LbOYE. A. HFedtc, **B.** $Ni(Fedtc)_2$, **C.** $Pd(Fedtc)_2$, **D.** [AuCl(L1)], **E.** [PdI(HL1)], **F.** [PtI(HL1)]

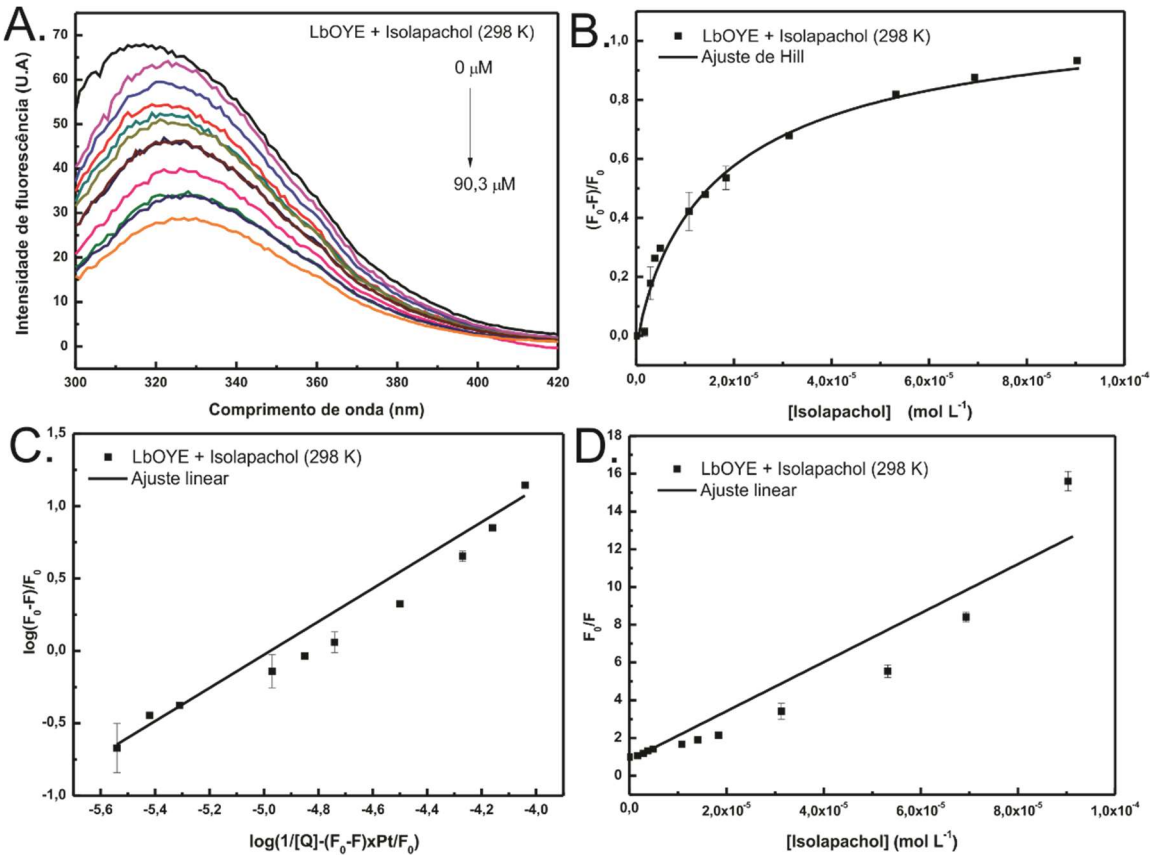


Fonte: Adaptado de (GONÇALVES et al., 2017)

Tabela 9: Resumo dos valores de coeficiente de extinção molar de excitação (295 nm) e emissão para cada um dos ligantes avaliados.

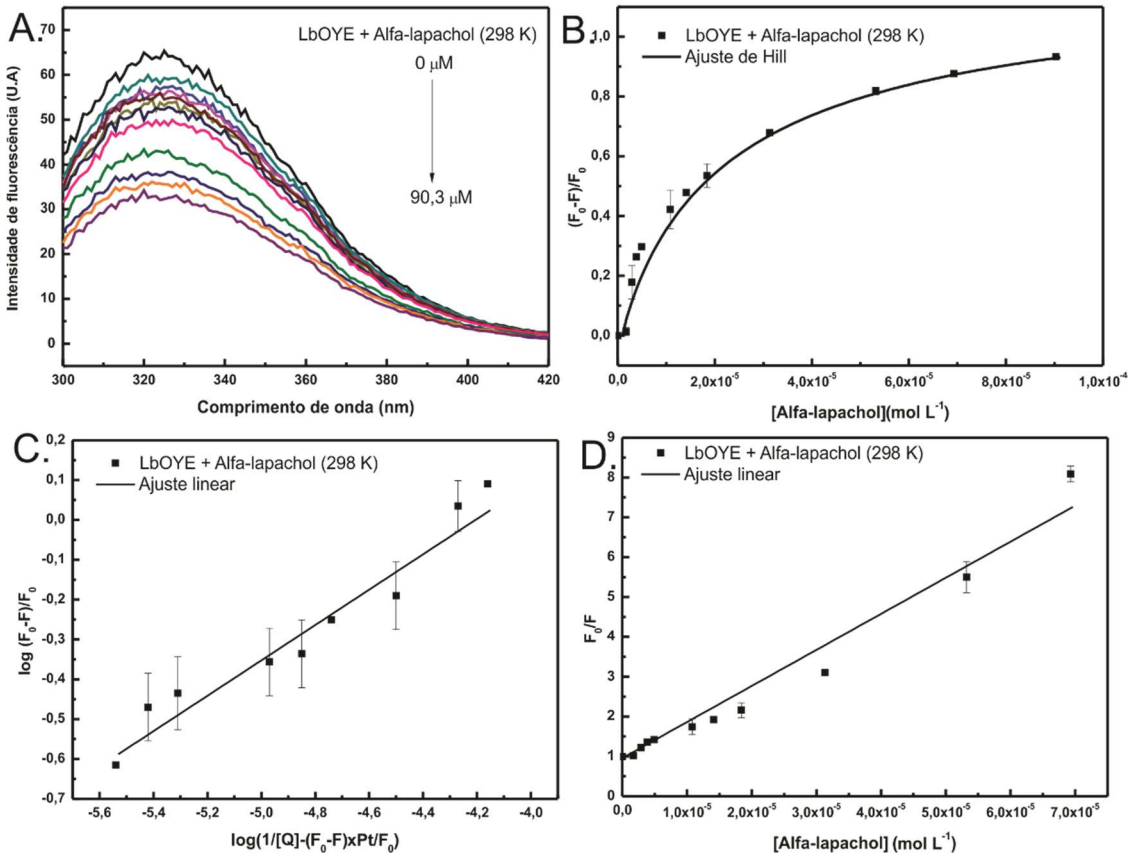
Ligante	ε_{exc} (295 nm) mol L^{-1} cm^{-1}	ε_{em}(variável) mol L^{-1} cm^{-1}	λ_{em} (nm)
Isolapachol	10995	3818	328
Menadiona	2365	2184	332
α-lapachol	10554	2887	328
[AuCl(L1)]	5872	4699	330
[PdI(HL1)]	8049	4771	328
[PtI(HL1)]	4513	3968	328
HFedtc	4844	5580	330
[Ni(Fedtc)$_2$]	6457	5814	330
[Pd(Fedtc)$_2$]	12141	11542	330

Figura 21: Interação da LbOYE com o ligante Isolapachol a 298 K. A. Espectro de supressão de fluorescência da interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill obtido para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Ajuste de duplo-log para interação proteína ligante a 298 K. **D.** Gráfico de Stern-Volmer da interação proteína-ligante a 298 K.



Fonte: Autoria própria

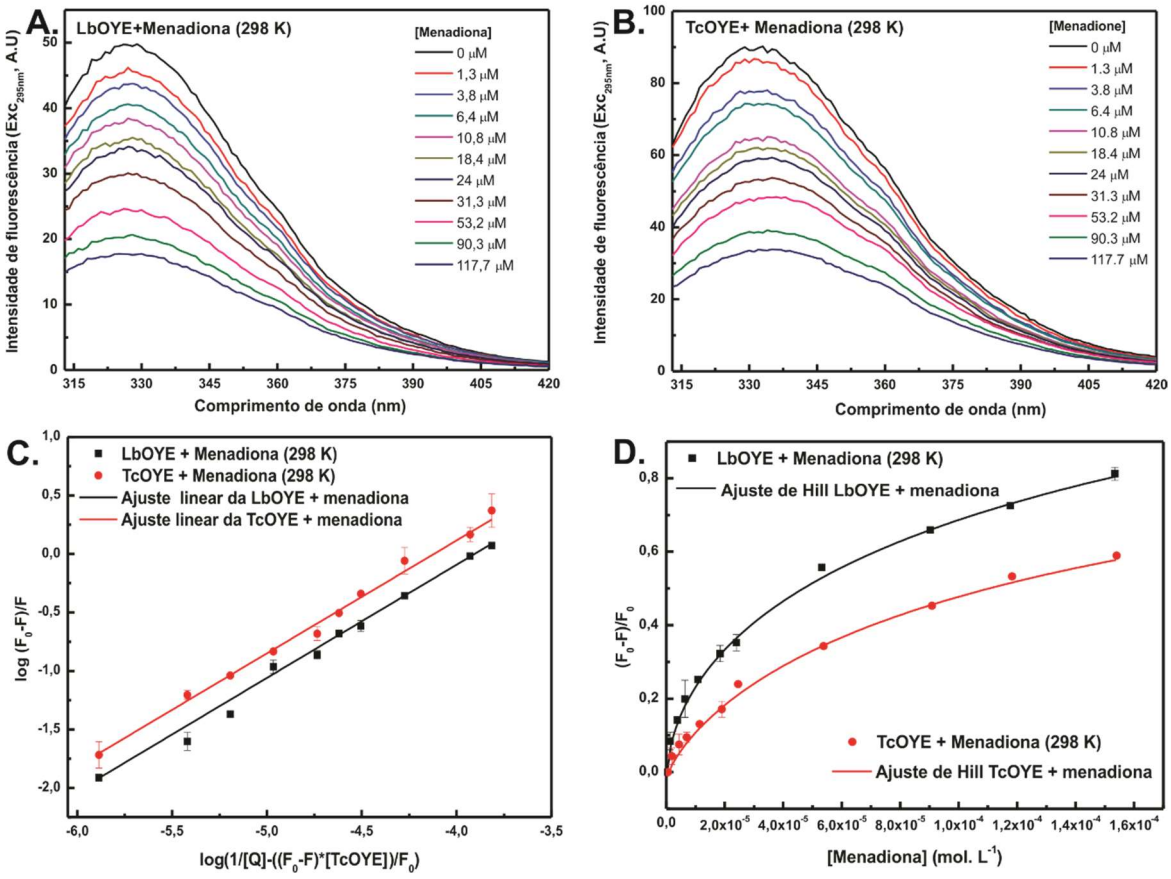
Figura 22: Interação da LbOYE com o ligante α-lapachol a 298 K. A. Espectro de supressão de fluorescência da interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill obtido para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Ajuste de duplo-log para interação proteína ligante a 298 K. **D.** Gráfico de Stern-Volmer da interação proteína-ligante a 298 K.



Fonte: Autoria própria.

Vários autores têm reportado o composto menadiona como substrato para diferentes membros da família OYE (KUBATA et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2011; YAMANO et al., 1993). A Figura 23 apresenta o resultado da interação das proteínas LbOYE e TcOYE com a menadiona.

Figura 23: Interação da LbOYE e TcOYE com o ligante menadiona a 298 K. A. Espectro de supressão de fluorescência da LbOYE com o ligante menadiona**. B.** Espectro de supressão de fluorescência da TcOYE com o ligante menadiona. **C.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante. Em preto, está representado o ajuste para proteína LbOYE e em vermelho o ajuste para proteína TcOYE. **D.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante. Em preto está representado o ajuste para proteína LbOYE e em vermelho o ajuste para proteína TcOYE.



Fonte: (VELOSO-SILVA et al., 2019).

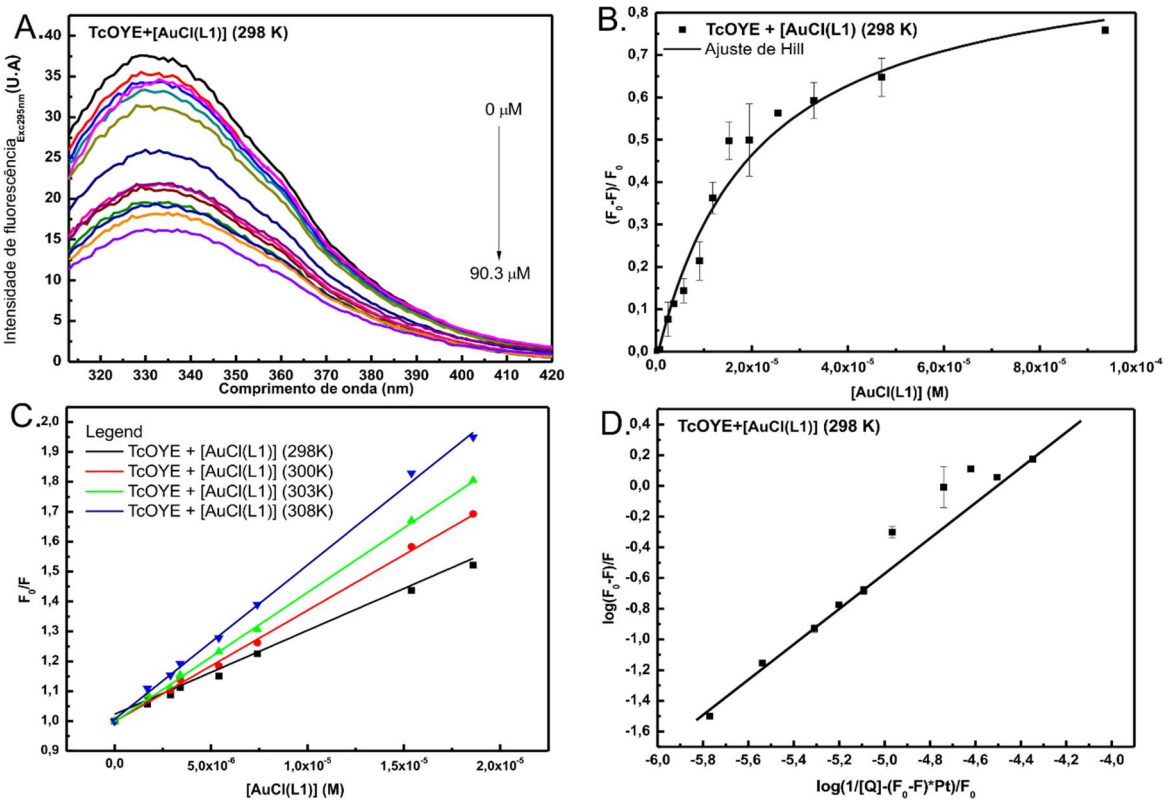
Note que os três compostos avaliados para LbOYE ocasionaram supressão da intensidade de fluorescência da proteína, indicando a possibilidade de interação desses compostos com a mesma. Para verificarmos a afinidade e estequiometria da interação, ensaios duplo-log e ajustes de Hill foram aplicados para cada ligante monitorado e os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 10.

Alguns compostos disponíveis para os ensaios de prospecção de ligantes apresentavam-se em quantidade limitada, de modo que houve a necessidade de racionamento no uso. A escolha da proteína TcOYE em relação a LbOYE para esses ensaios se fundamentou pelo conjunto de informações anteriormente conhecidas via testes de docagem molecular permitidas pelo acesso a estrutura cristalográfica da proteína disponível no PDB (código de acesso: 4E2B)(GONÇALVES et al., 2017). Para proteína

LbOYE isso não era possível, uma vez que não existem dados cristalográficos disponíveis da proteína no banco de dados até o momento.

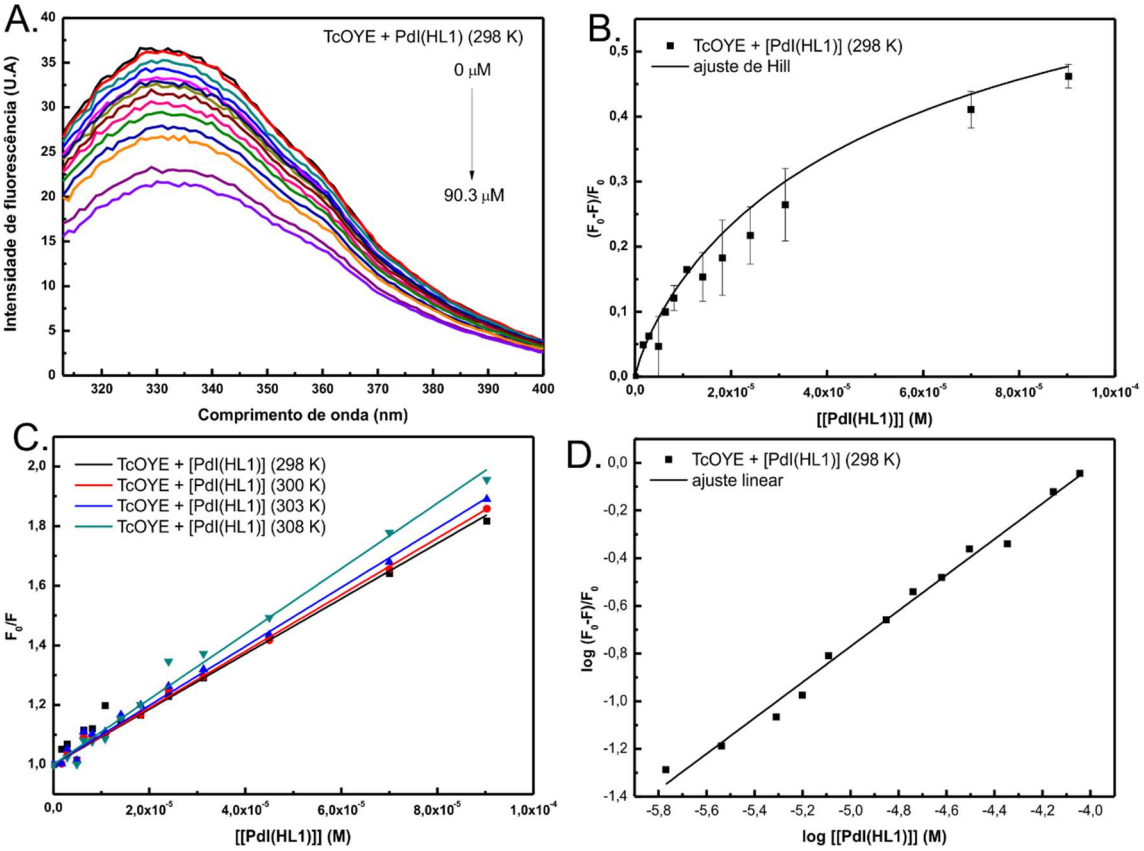
Uma vez predita a interação proteína-ligante com os compostos a seguir, houve a necessidade de verificar se o mecanismo de interação ocorria via formação de um complexo estático ou se ocorria via interação colisional. Para isso, os ensaios de supressão de fluorescência foram conduzidos em diferentes temperaturas a fim de monitorar a variação na K_{SV} com o aumento da temperatura. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas Figuras 24-29. As Tabelas 10 e 11 trazem um resumo dos resultados obtidos para interação dos ligantes com as proteínas LbOYE e TcOYE, respectivamente.

Figura 24: Interação da proteína TcOYE com o ligante [AuCl(L1)] em diferentes temperaturas. A. Espectro de supressão de fluorescência para interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Gráfico de Stern-Volmer para interação proteína-ligante em diferentes temperaturas. **D.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante a 298 K.



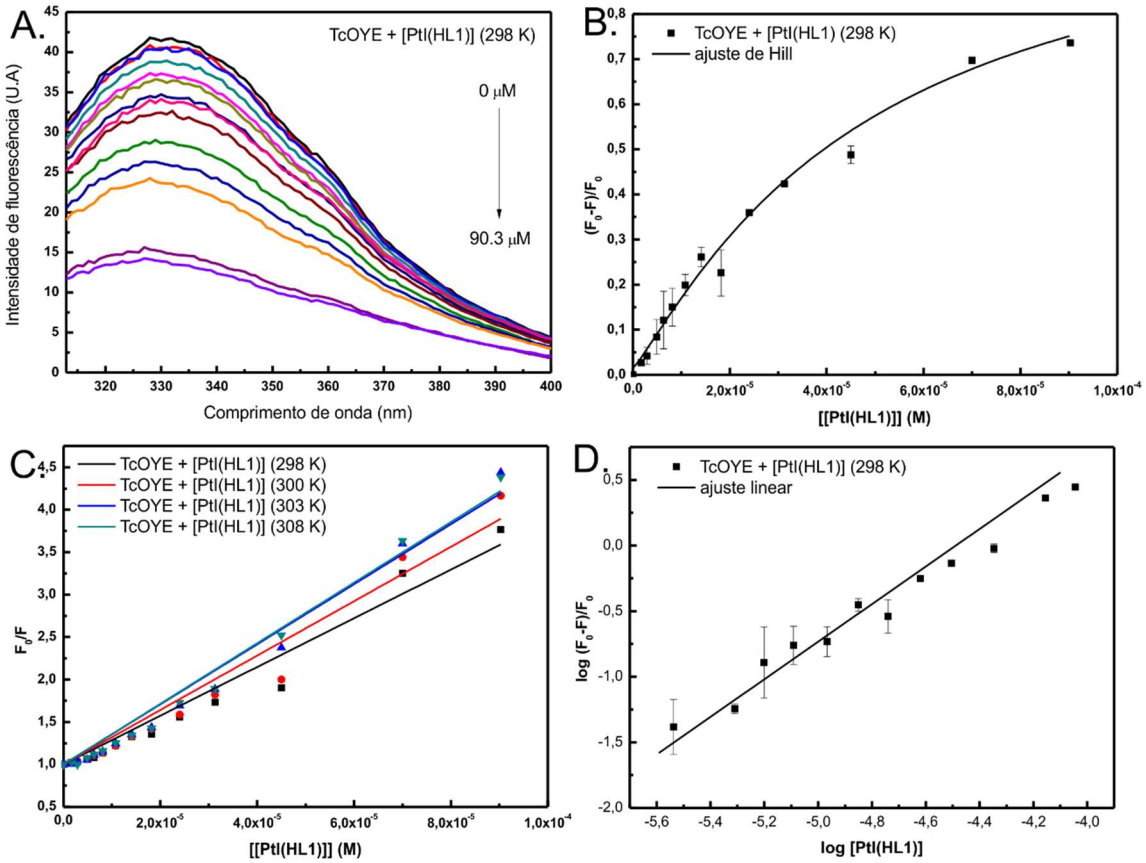
Fonte: (GONÇALVES et al., 2017)

Figura 25: Interação da proteína TcOYE com o ligante [PdI(HL1)] em diferentes temperaturas. A. Espectro de supressão de fluorescência para interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Gráfico de Stern-Volmer para interação proteína-ligante em diferentes temperaturas. **D.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante a 298 K.



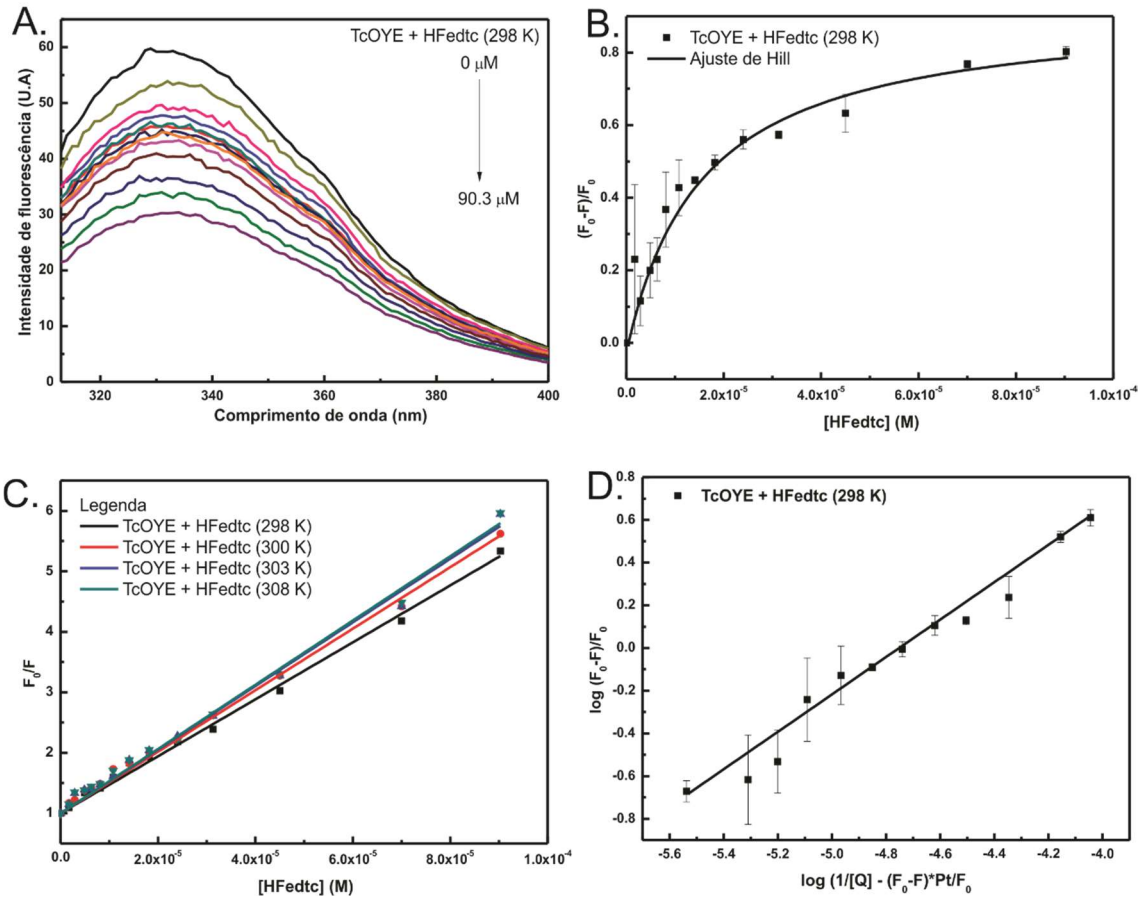
Fonte: Autoria própria.

Figura 26: Interação da proteína TcOYE com o ligante [PtI(HL1)] em diferentes temperaturas. A. Espectro de supressão de fluorescência para interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Gráfico de Stern-Volmer para interação proteína-ligante em diferentes temperaturas. **D.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante a 298 K.



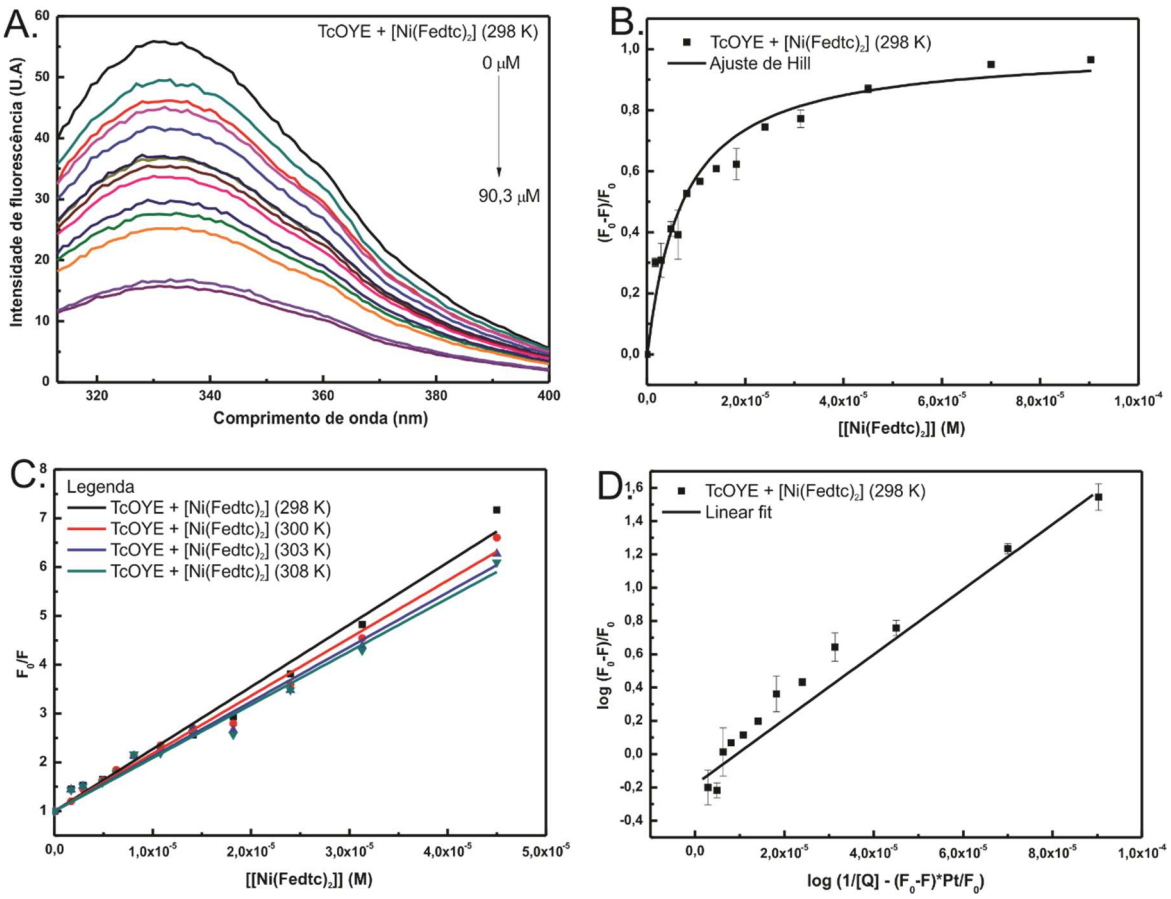
Fonte: Autoria própria.

Figura 27: Interação da proteína TcOYE com o ligante HFedtc em diferentes temperaturas. A. Espectro de supressão de fluorescência para interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Gráfico de Stern-Volmer para interação proteína-ligante em diferentes temperaturas. **D.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante a 298 K.



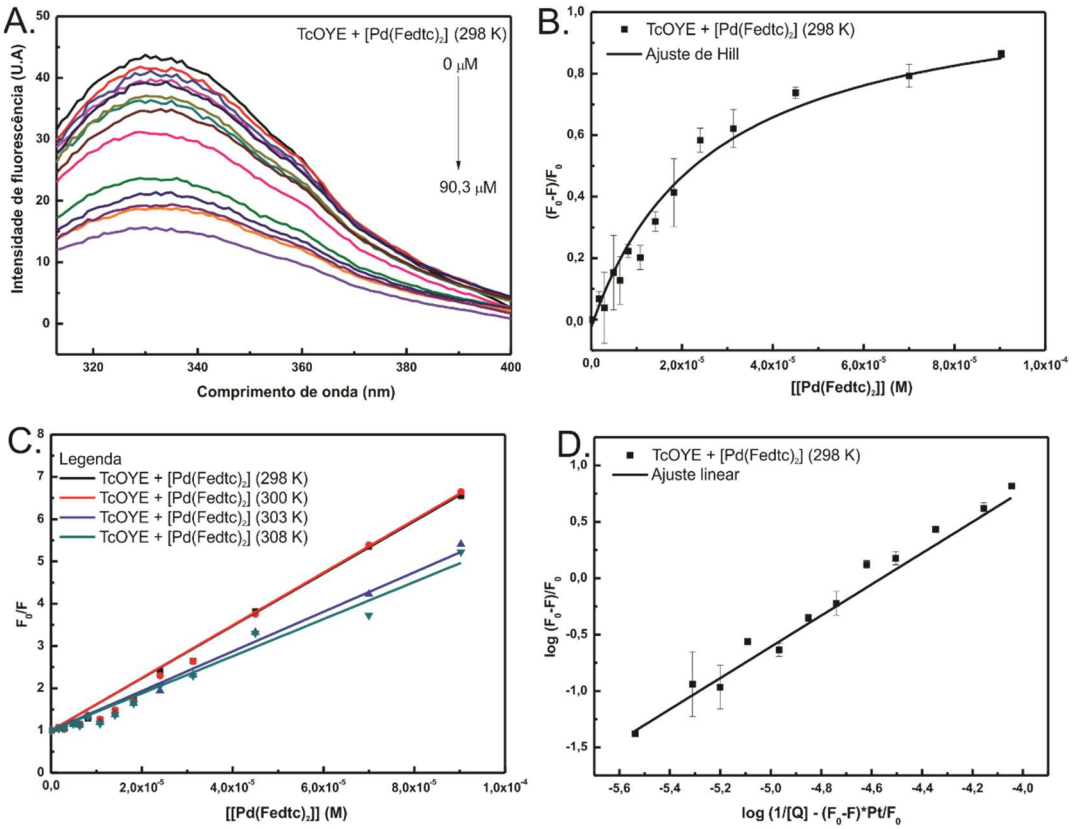
Fonte: Autoria própria.

Figura 28: Interação da proteína TcOYE com o ligante [Ni(Fedtc)$_2$] em diferentes temperaturas. A. Espectro de supressão de fluorescência para interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Gráfico de Stern-Volmer para interação proteína-ligante em diferentes temperaturas. **D.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante a 298 K.



Fonte: Autoria própria.

Figura 29: Interação da proteína TcOYE com o ligante [Pd(Fedtc)2] em diferentes temperaturas. A. Espectro de supressão de fluorescência para interação proteína-ligante a 298 K. **B.** Ajuste de Hill para interação proteína-ligante a 298 K. **C.** Gráfico de Stern-Volmer para interação proteína-ligante em diferentes temperaturas. **D.** Gráfico duplo-log para interação proteína-ligante a 298 K.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 10: Resumo dos resultados obtidos pelos ensaios de supressão de fluorescência com a proteína LbOYE.

	LbOYE				
Ligante	**n**	**K_{SV} ($x10^{-4}$ mol L^{-1})**	**K_A ($x10^{4}$ mol L^{-1})**	**K_D ($\mu mol.L^{-1}$)*1**	**K_D ($\mu mol.L^{-1}$)*2**
Isolapachol	1,2 ± 0,1	10,0 ± 0,1	7,6 ± 0,2	24 ± 1	13 ± 1
Menadiona	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	69 ± 4	53 ± 2
α-lapachol	0,5 ± 0,1	9,0 ± 0,4	6,6 ± 0,5	24 ± 3	15 ± 2

*1 valor de K_D estimado a partir do ajuste de dose-resposta como descrito pela equação 6.
*2 valor de K_D estimado a partir do inverso de K_A obtido como descrito pela equação 7.

Tabela 11: Resumo dos resultados obtidos pelos ensaios de supressão de fluorescência com a proteína TcOYE.

TcOYE					
Ligante	**n**	**K_{SV} ($x10^{-4}$ mol L^{-1})**	**K_A ($x10^{4}$ mol L^{-1})**	**K_D** ($\mu mol.L^{-1}$)*1	**K_D** ($\mu mol.L^{-1}$)*2
Isolapachol	1,5 ± 0,2	16 ± 2	6,8 ± 0,4	19 ± 2	15 ± 1
Menadiona	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	88 ± 6	59 ± 4
[AuCl(L1)]	1,1 ± 0,1	2,8 ± 0,3	4,1 ± 0,2	24 ± 2	20 ± 4
[PdI(HL1)]	0,7 ± 0,1	9,2 ± 0,7	4,0 ± 0,5	25 ± 3	26 ± 7
[PtI(HL1)]	1,2 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,5 ± 0,2	40 ± 2	48 ± 2
HFedtc	0,9 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,4	17 ± 1	16 ± 2
$[Ni(Fedtc)_2]$	1,2 ± 0,2	9,9 ± 1	13,3 ± 1	7,5 ± 1	7,5 ± 1
$[Pd(Fedtc)_2]$	1,3 ± 0,3	7,1 ± 0,2	2,2 ± 0,3	22,9 ± 5	44,6 ± 6

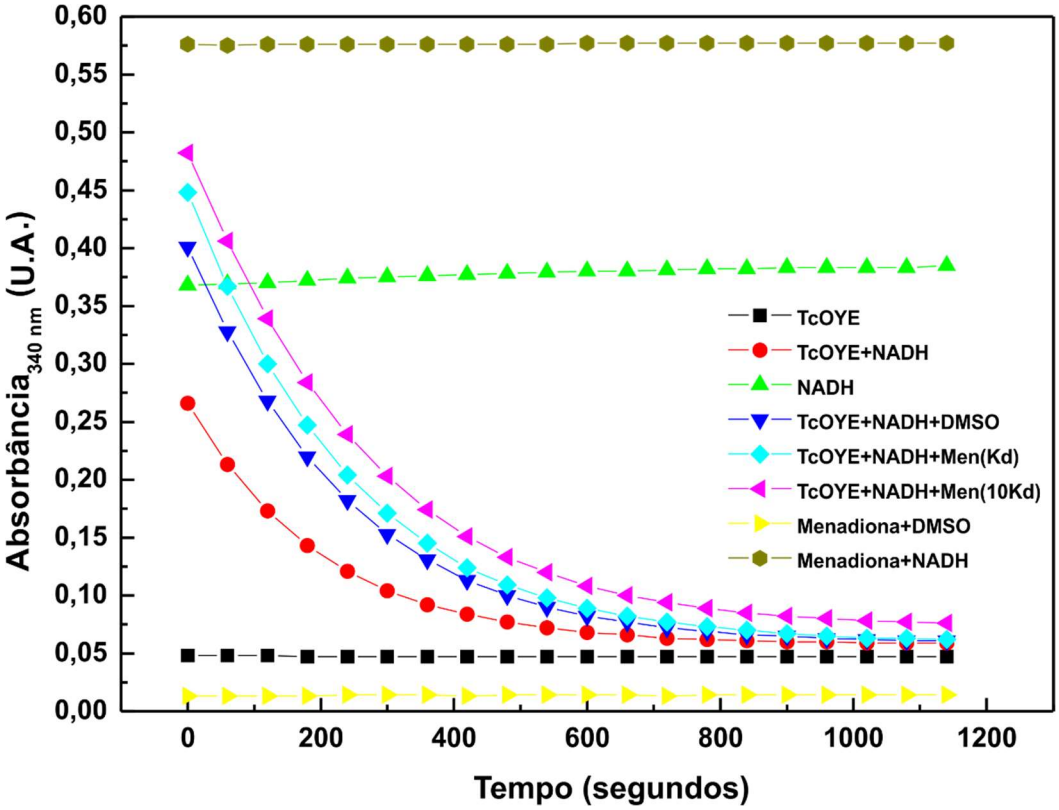
*1 valor de K_D estimado a partir do ajuste de dose-resposta como descrito pela equação 6.
*2 valor de K_D estimado a partir do inverso de K_A obtido como descrito pela equação 7.

4.8 Ensaios de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio

O mecanismo de reação das OYEs foi descrito sucintamente na seção 1.3.2. Dentre outras coisas, é importante ressaltar que durante a ação enzimática da OYE o grupo prostético é temporariamente reduzido pela ação do NAD(P)H que, na etapa seguinte, transfere o hidreto recebido para o substrato. Dessa forma, a atividade enzimática da OYE pode ser avaliada pelo monitoramento da absorbância do NAD(P)H (em 340 nm) e/ou absorbância do FMN (em aproximadamente 460 nm). Dito isso, é apresentado nessa seção os resultados de atividade enzimática obtidos para as proteínas TcOYE e LbOYE.

A Figura 30 mostra o resultado de atividade enzimática em ambiente aeróbico para TcOYE. Experimentos controle na ausência da proteína e/ou ligante são também apresentados.

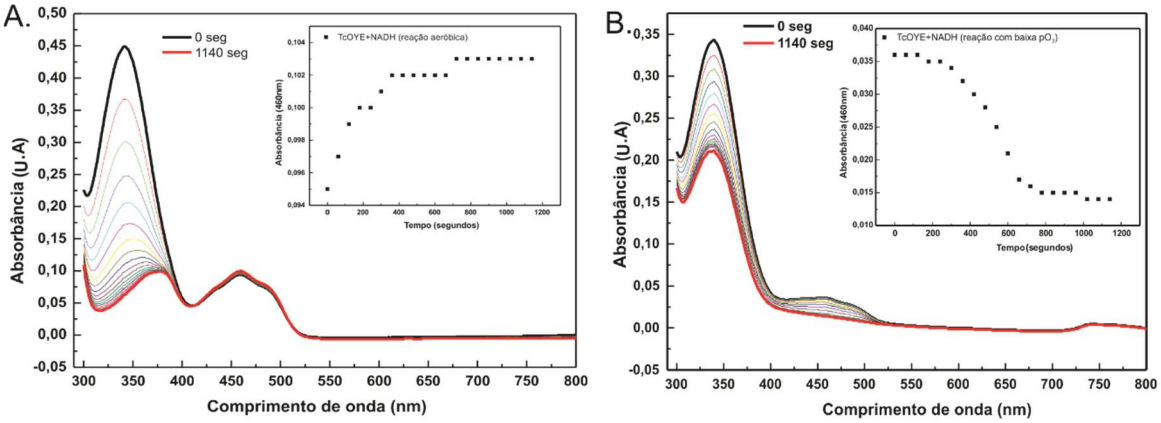
Figura 30: Atividade enzimática da TcOYE em condições aeróbicas. O resultado encontrado revela que em 340 nm, a proteína, NADH, menadiona e menadiona + NADH apresentam comportamento linear. Nas condições onde se tem a proteína e NADH é notório um perfil de decaimento tempo-dependente que é acentuado com a adição do ligante, sugerindo que a TcOYE foi obtida na forma funcional.



Fonte: Autoria própria.

Na introdução desse trabalho, foi apresentado o contexto de descoberta da proteína OYE. É importante notar que essa proteína tem sua identificação associada ao consumo do oxigênio, permitindo ao sistema de Warburg tornar-se uma cadeia respiratória completa. Assim, é esperado que o oxigênio atmosférico atue como um interferente no sistema reacional de tal modo que, houve a necessidade de um ensaio comparativo dessas proteínas em baixa pressão de oxigênio. O resultado obtido para os ensaios aeróbicos e em baixa pressão de oxigênio encontra-se ilustrado na Figura 31 (painéis A e B, respectivamente). No inserto da Figura 31 é apresentado o perfil espectro-temporal à 460 nm dos ensaios conduzidos.

Figura 31: Ensaios de atividade enzimática para proteína TcOYE. A. Reação aeróbica (inserto: perfil espectro-temporal monitorado em 460 nm). **B.** Reação em baixa pressão de oxigênio (inserto: perfil espectro-temporal monitorado em 460 nm).

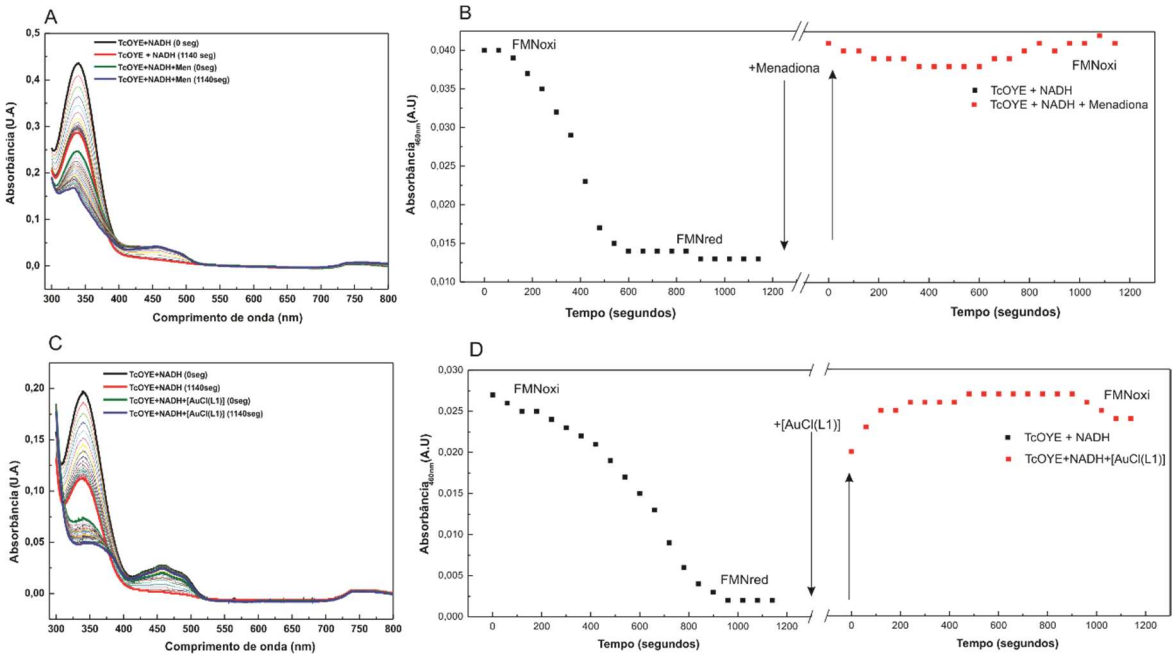


Fonte: Autoria própria.

É possível notar no inserto das Figuras 31A e 31B que na ausência do ligante, o FMN em ambiente aeróbico é mantido permanentemente na sua forma oxidada (inserto da Figura 31A), enquanto que em situações de baixa pressão de oxigênio o FMN é gradativamente reduzido (FMN→FMNred), se estabilizando nessa conformação com o curso temporal da reação.

Foi visto na introdução dessa tese, que o mecanismo de reação das OYEs é do tipo *ping-pong bi-bi*, com os substratos redutivos e oxidativos ligando-se no mesmo sítio ativo. Assim, preconizou-se que na presença do substrato, o FMNred se reoxidaria, voltando a conformação oxidada original (FMNred →FMN). A fim de verificar se isso de fato ocorria, o experimento foi conduzido em baixa pressão de oxigênio em duas etapas, como discutido anteriormente na seção 3.11. O resultado encontrado está ilustrado na Figura 32.

Figura 32: Ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio para proteína TcOYE. A. Espectro de absorbância no UV-Vis na ausência e presença do ligante menadiona. **B.** Perfil espectro-temporal monitorado em 460 nm. A curva em preto representa a mudança no estado redox do FMN na ausência do ligante e a curva em vermelho evidencia a manutenção do estado redox com a adição da menadiona. **C.** Espectro de absorbância no UV-Vis na ausência e presença do ligante [AuCl(L1)].

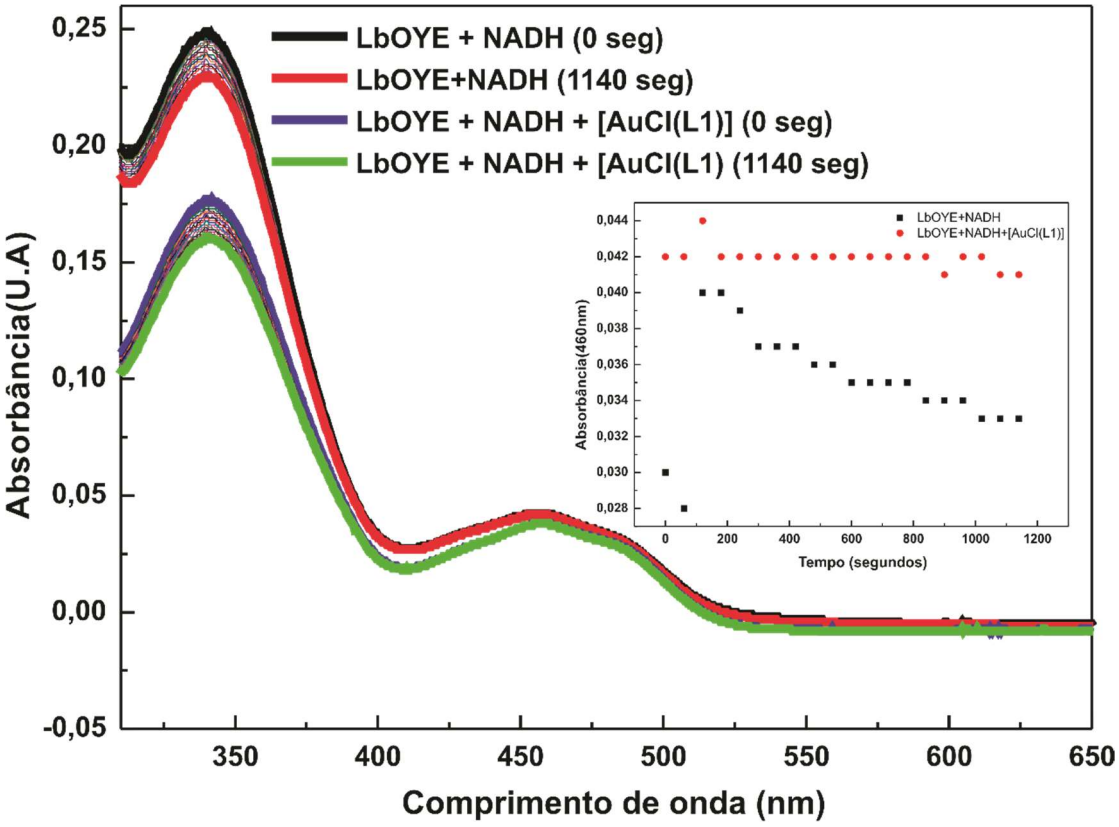


Fonte: Adaptado de (GONÇALVES et al., 2017)

O resultado ilustrado na Figura 32 mostra o efeito de dois compostos diferentes no perfil espectral do FMN (absorbância em 460 nm) em condições de baixa pressão de oxigênio. A menadiona, que já é sabidamente um substrato para as proteínas TcOYE (embora com baixa afinidade, como será oportunamente discutido nas seções posteriores) e o composto [AuCl(L1)], que representa o composto teste.

Os experimentos de atividade enzimática também foram projetados para a proteína LbOYE, porém, o perfil espectral obtido difere sobremaneira do perfil registrado para a proteína TcOYE, como pode-se observar na Figura 33.

Figura 33: Ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio para proteína LbOYE. *Inserto:* Perfil espectro-temporal à 460 nm na ausência (curva em preto) e presença do composto [AuCl(L1)] (curva em vermelho).

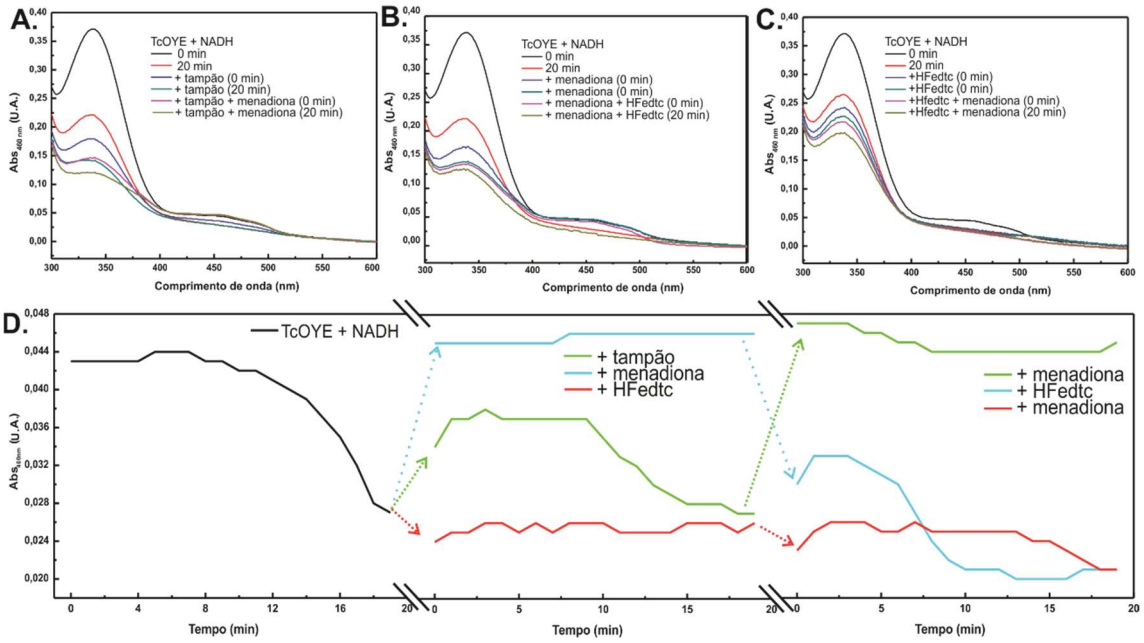


Fonte: Autoria própria.

É possível perceber que, mesmo em condições de baixa pressão de oxigênio, o ambiente do FMN (absorbância em 460 nm) para a proteína LbOYE é mantido permanentemente no estado oxidado. Além disso, nota-se que oxidação do NADH (absorbância em 340 nm) pela proteína parece ser menos efetiva quando comparada com a proteína TcOYE.

Na busca por novos substratos para proteína TcOYE, foi verificada a capacidade de modulação do composto HFedtc na ausência e presença do substrato menadiona em ensaios de atividade enzimática. A Figura 34 mostra os resultados encontrados para seis circunstâncias avaliadas: 1) TcOYE + NADH; 2) TcOYE + NADH + tampão (controle negativo); 3) TcOYE + NADH + menadiona (controle positivo); 4) TcOYE + NADH + HFedtc (teste 1); 5) TcOYE + NADH+HFedtc + menadiona (teste 2) e 6) TcOYE + NADH + menadiona + HFedtc (teste 3).

Figura 34: Ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio para proteína TcOYE. A., B. e C. Espectros de UV-Vis obtido para os ensaios de atividade enzimática na presença de tampão, menadiona, menadiona + HFedtc, HFedtc e HFedtc + menadiona. **D.** Perfil espectro-temporal em 460 nm. A curva em preto representa a situação inicial da reação redox promovida pela adição do agente redutor (NADH). No segundo quadrante da Figura D, as curvas em verde, azul e vermelho representam o perfil espectral obtido após adição de tampão, menadiona e HFedtc, respectivamente. No terceiro quadrante da Figura D, as cores supracitadas representam respectivamente a adição de menadiona, HFedtc e menadiona ao sistema reacional do segundo quadrante.



Fonte: Autoria própria.

O resultado da Figura 34 é interessante por mostrar como a ordem de adição dos ligantes afetou de maneira diferente a ação enzimática da TcOYE. Note que quando foi adicionado menadiona ao sistema reacional do segundo quadrante (contendo o ligante HFedtc), o ambiente do FMN não foi reoxidado, como pode ser notado pelo percurso indicado pelas setas vermelhas no painel 34D. Todavia, quando o oposto aconteceu, ou seja, quando foi adicionado HFedtc ao sistema que já continha o ligante menadiona, foi notada uma modificação transitória no estado redox do FMN (ver percurso indicado pela seta azul no painel 34D). Além disso, é possível notar que, como era previsto, a adição de tampão não alterou o estado redox do FMN (curva em verde no segundo quadrante do painel 34D), indicando que as modificações no estado redox ocorria em decorrência da natureza química do ligante.

5 DISCUSSÃO

Nesta seção, os resultados obtidos são reapresentados e a discussão dos mesmos é conduzida de forma integrada, reagrupando resultados estreitamente correlacionados e apresentando-os de modo a obter uma discussão com maior profundidade e amplitude. Nesse sentido, foi priorizada a discussão dos resultados de uma forma comparativa entre a LbOYE e a TcOYE, enfatizando os pontos em que elas guardam similaridade, mas, sobretudo, destacando os aspectos em que elas se individualizam.

5.1 Aminoácidos envolvidos na estabilização do substrato são conservados na família OYE

A Figura 12 mostra o alinhamento das proteínas LbOYE e TcOYE com outros membros da família OYE e a matriz de identidade entre essas proteínas é mostrada na Tabela 5. Note no alinhamento que regiões importantes da proteína, tais como o sítio de ligação ao FMN (indicado por setas pretas na Fig. 12) e estabilização do substrato (indicados por setas vermelhas da referida figura) são conservadas em toda a família, incluindo a subfamília *thermophilic-like*. Esses resultados estão de acordo com a literatura atual, que diz que dentro de uma mesma subfamília existe alta conservação em resíduos importantes da proteína, dentre os quais destaco o sítio de ligação do FMN e o par catalítico H186-H/N189 (numeração LbOYE) (ADALBJÖRNSSON et al., 2010).

Curiosamente, na subfamília *thermophilic-like*, o resíduo T32 (numeração LbOYE), que é responsável pela regulação do potencial redox da FMN é substituído por C26 (numeração YqjM) (KITZING et al., 2005). Apesar desses resíduos serem bioquimicamente similares (ambos apresentam grupo R polar e não carregado), a cisteína apresenta uma particularidade isolada pois, sua polaridade em relação a treonina é bastante modesta, devido sobretudo ao seu grupo sulfidrila. Isso faz da cisteína um ácido mais fraco, permitindo a ela apenas fracas ligações de hidrogênio com oxigênio ou nitrogênio (NELSON; COX, 2011).

Como dito anteriormente na seção 1.3.1, a região de *loop* flexível nas OYEs é a região que apresenta maior variabilidade entre os diferentes membros da família e nesse sentido, o resultado ilustrado na Fig.12 se mostra coerente com os dados reportados na literatura. Adicionalmente, é importante notar na Fig. 12 que essa variabilidade persiste até dentro de uma mesma subfamília (VELOSO-SILVA et al., 2019).

Apesar de regiões importantes para proteína OYE ser conservada ao longo do eixo evolutivo da família, a matriz de identidade estrutural da sequência completa de aminoácidos revela uma conservação de resíduos da ordem de 25% a 30%. É possível notar que em proteínas de organismos evolutivamente próximos, esses valores podem ultrapassar a margem dos 40%, como no caso da TcOYE e LbOYE, que apresentam uma identidade percentual de 46% (ver Tabela 5). Esse achado, até certo ponto, pode justificar ou pelo menos fornecer um caminho para explicar a grande variedade de substratos que interagem com as OYEs.

5.2 A estrutura secundária e terciária da LbOYE e TcOYE são similares

Na Tabela 4 dessa tese, algumas propriedades físico-químicas das proteínas LbOYE e TcOYE são apresentadas. Dentre outras coisas, é importante destacar a MM da proteína com e sem a His_6-tag. Resgatando essa informação, é possível notar que a MM das proteínas supracitadas são próximas e da ordem de 45 kDa com a His_6-tag e cerca de 43 kDa sem a His_6-tag. Nesse sentido, a análise da Fig. 13 sinaliza que o protocolo de expressão e purificação da LbOYE resultou na produção de uma proteína com MM comparável a uma proteína monomérica e com pureza satisfatória (~97% conforme análise feita pelo software GelQuant, dados não mostrados). Além disso, uma redução da ordem de 2 kDa na canaleta 6 (atestada pelo software GelQuant, dados não mostrados) sugere que a clivagem da His_6-tag foi efetiva. Resultados similares foram reportados para proteína TcOYE (MURAKAMI et al., 2013).

Os resultados de CD e fluorescência ilustrado nas Figs. 14 e 15 e sumarizados na Tabela 6 indicam que as proteínas em estudo foram obtidas na forma enovelada. Além disso, os dados de CD obtido para LbOYE, guardando as devidas limitações da análise, sugerem uma similaridade em termos de conteúdo de estrutura secundária com a TcOYE indicados pelos dados da Tabela 6.

A similaridade das proteínas em estudo vai além da estrutura secundária. Os resultados de fluorescência corroboram com essa prerrogativa ao indicar valores de $\lambda_{máx}$ e $<\lambda>$ equivalentes entre si, indicando que o microambiente local dos triptofanos dessas proteínas é similar e parcialmente protegido do solvente, uma vez que os valores de λ_{max} foram 333 nm e 336 nm para LbOYE e TcOYE, respectivamente. Além disso, a presença de GndCl, usado como desnaturante químico, causou uma supressão na intensidade de fluorescência e um deslocamento para região do vermelho, indicando que ambas

proteínas recombinantes foram obtidas no estado enovelado (VELOSO-SILVA et al., 2019)

5.3 A LbOYE se apresenta como monômero sutilmente alongado em solução

Como muitas proteínas da família OYE são descritas como oligômeros, houve a necessidade de investigarmos a existência de estrutura quaternária da LbOYE por aSEC e SV-AUC. Os parâmetros hidrodinâmicos assim obtidos estão ilustrados na Fig. 16 (painéis A e B). É importante lembrar que MM da LbOYE determinada a partir da sequência de aminoácidos é da ordem de 43 kDa (ver Tabela 4). Assim, a MMapp estimada por aSEC no valor de 51 ± 6 kDa somado aos valores do R_S e do f/f_0 da LbOYE em 29 ± 1 e 1,3 ± 0,1 Å sugerem que tal proteína se apresenta sob a forma de um monômero sutilmente alongado em solução.

A Figura 17A retrata a curva de espalhamento experimental da proteína LbOYE à 3,0 mg mL^{-1} bem como o ajuste teórico realizado pelo software GNOM. É possível perceber pelo inserto da Figura 17A que a LbOYE se comporta como um sistema de solução monodispersa com R_G = 27,0 ± 0,3 Å e MM de 40 ± 4 kDa, sugerindo que a proteína se apresenta como um monômero na faixa de concentração estudada (1,5 a 4,5 mg mL^{-1}). Esses resultados são compatíveis com os obtidos por outras técnicas biofísicas aqui apresentadas, tais como aSEC e SV-AUC.

No painel 17B é apresentado a função p(r) para a LbOYE. Note que o $D_{máx}$ é próximo de 80 Å, sugerindo que a LbOYE é sutilmente alongada em solução. Quando comparado aos valores de R_G (22 Å) e $D_{máx}$ (80 Å) reportados para proteína TcOYE, fica evidente que a proteína LbOYE é comparativamente mais alongada em solução que a TcOYE.

O resultado apresentado na Figura 17C sugere que a LbOYE tem uma forma sutilmente alongada, compatível com uma forma prolata. Esses resultados diferem do reportado para proteína TcOYE, que gerou uma forma mais globular, embora com a presença de alguma estrutura flexível (MURAKAMI et al., 2013; VELOSO-SILVA et al., 2019). É interessante notar que a maioria dos parâmetros hidrodinâmicos preditos pelo programa HydroPro para o modelo *ab initio* estão em acordo com os dados experimentais, exceto para o parâmetro $s_{20,w}$. Isso porque o modelo *ab initio* pode ser definido como uma representação de "corpo rígido" e, portanto, propriedades estruturais e hidrodinâmicas

inerentes ao modelo não explicam a flexibilidade intrínseca da proteína (VELOSO-SILVA et al., 2019).

Os dados em solução obtidos para LbOYE indicam que a estrutura mais alongada dessa proteína se deve, provavelmente, à flexibilidade do subdomínio *capping*. A estrutura mais alongada da LbOYE pode estar relacionada a maior flexibilidade dessa em relação à TcOYE, permitindo àquela proteína movimentos conformocionais de "abre-fecha".

5.4 A LbOYE apresenta menor estabilidade estrutural que a TcOYE

As Figuras 18A e 18B ilustram os resultados de estabilidade térmica das proteínas LbOYE e TcOYE monitorados por DSC e a Tabela 8 apresenta os valores de Tm obtidos para esses experimentos. Vale destacar que a Tm é uma propriedade biofísica que pode, ocasionalmente, do ponto de vista matemático, não ter uma distribuição normal (GLYNN, 2017). Por esse motivo, os ajustes aplicados aos termogramas gerados por DSC foram feitos com uma e duas Gaussianas, sendo que essa última apresentou menor variação residual comparado aos ajustes com apenas uma Gaussiana (ver residuais nos painéis 18A e 18B). Isso implica dizer que o processo de desnaturação térmica dessas proteínas é pouco cooperativo, sugerindo a possibilidade de estados intermediários de desenovelamento. Em adição, o ajuste Gaussiano aplicado aos resultados ilustrados na Figura 18 A e B e sumarizados na Tabela 8, estimou valores de Tm_2 da ordem de 50 ºC para ambas proteínas, entretanto, a temperatura crítica para LbOYE foi 5 ºC menor que a obtida para TcOYE, sugerindo que a LbOYE apresenta uma região de menor estabilidade estrutural quando comparado com a TcOYE (VELOSO-SILVA et al., 2019). O resultado obtido ainda revela um termograma de base mais larga para a LbOYE frente à TcOYE, sugerindo mecanismos distintos de desenovelamento térmico.

A análise do resultado ilustrado no painel 18C mostra que o perfil de estabilidade química das proteínas LbOYE e TcOYE diferem sobremaneira, revelando uma menor estabilidade química para proteína LbOYE. Entretanto, para as duas proteínas em análise, parece existir uma transição pouco cooperativa com valores de Cm de 1,4 mol L^{-1} (LbOYE) e 3,8 mol L^{-1} (TcOYE), sugerindo mais uma vez a menor estabilidade estrutural para LbOYE, concordando assim com os dados obtidos por DSC.

5.5 As proteínas LbOYE e TcOYE foram produzidas na sua forma funcional

Os ensaios de *quenching* realizados para proteína LbOYE revelou que os ligantes testados foram capazes de reduzir a intensidade de fluorescência do triptofano, como pode ser notado no painel A das Figuras 21, 22 e 23. Do mesmo modo, os ligantes avaliados para TcOYE mostraram uma mesma tendência, como pode ser visto nas Figuras 24 a 29. Isso implica dizer que os ligantes avaliados interagiram com a proteína de tal modo que os triptofanos presentes próximo ao sítio ativo da enzima tiveram suas energias de emissão "roubadas" pela presença do ligante. A afinidade dessa interação foi estimada através de dois ajustes matemáticos independentes a fim de se obter o K_D aparente, que é matematicamente igual a K_B^{-1}. No primeiro tratamento, um gráfico de (F_0-F/F_0) em função da concentração do ligante foi gerado, originando uma curva hiperbólica como a ilustrada na Figura 21B, cujo ajuste aplicado conforme descrito pela equação 6 foi capaz de estimar o valor de K_D aparente. O mesmo raciocínio também foi aplicado aos ligantes representados nas Figuras 22 a 29. Além disso, em um segundo tratamento, foi utilizada a equação do duplo-log, como a descrita na equação 7, que além dos valores de K_D, nos forneceu uma ideia da estequiometria da reação. Os resultados de K_D obtidos para LbOYE estão resumidos na Tabela 7 e os obtidos para TcOYE estão sumarizados na Tabela 8. Note que os valores de K_D obtidos pelos dois ajustes apresentam diferenças entre si, provavelmente devido as limitações matemáticas entre os ajustes (VELOSO-SILVA et al., 2019).

Dos três ligantes avaliados para proteína LbOYE, a que apresentou menor afinidade de interação foi o composto menadiona, enquanto os outros dois compostos (isolapachol e α-lapachol) obtiveram valores equivalentes de K_D, sugerindo um mecanismo de interação com afinidades similares. Apesar disso, o gráfico de Stern-Volmer para os ligantes isolapachol e α-lapachol (painel D das Figuras 21 e 22) guardam diferenças entre si. Note que para o ligante isolapachol existe um desvio da linearidade na curva à medida que a concentração do ligante aumenta. Isso sugere que o composto interage por uma combinação entre uma supressão estática e outra dinâmica, conforme previsto por Lakowicz (LAKOWICZ, 2006, p. 282). Para o ligante α-lapachol não há uma clareza sobre o mecanismo de supressão de fluorescência.

O composto menadiona foi também avaliado para proteína TcOYE (representado pela curva em vermelho nos painéis C e D da Figura 23. Note que a Figura 23C exibe um perfil de curva equivalente entre as proteínas LbOYE e TcOYE, sugerindo que o microambiente de interação do fluoróforo e o mecanismo de supressão de fluorescência são essencialmente similares nos dois casos.

Além da menadiona, outros ligantes foram testados para proteína TcOYE. A Figura 24 reporta os dados de *quenching* obtidos para o composto [AuCl(L1)]. Note que, com o aumento da temperatura, há um incremento na inclinação da curva de Stern-Volmer (painel 24C), sugerindo a existência de uma componente dinâmica de interação(GONÇALVES et al., 2017). Para o ligante [PdI(HL1)], o gráfico de Stern-Volmer (painel 25C) não resultou em mudanças significativas na K_{SV} nas primeiras temperaturas avaliadas, apresentando um incremento positivo nas temperaturas seguintes. Uma explicação para isso é a possibilidade de o composto em questão formar um complexo temporário com a proteína, estabilizando o microambiente do fluoróforo. Em temperaturas acima de 300 K, esse complexo é desfeito, promovendo choques dinâmicos entre o ligante e o fluoróforo, resultando em uma componente de supressão colisional. Esse mesmo raciocínio se aplica também aos ligantes apresentados nas Figuras 26 e 27.

Os ligantes $[Ni(Fedtc)_2]$ e $[Pd(Fedtc)_2]$ parecem se comportar de forma diferente dos ligantes anteriormente discutidos. Aparentemente, esses ligantes formam um complexo escuro especificamente com o fluoróforo que é paulatinamente desfeito com o aumento da temperatura, resultando em redução na K_{SV}.

É importante destacar que a estequiometria dos ligantes avaliados para ambas proteínas são todas próximas de 1, indicando que a interação ocorre na proporção de 1 ligante por proteína. Dos ligantes avaliados para TcOYE o que apresentou maior afinidade foi o ligante $[Ni(Fedtc)_2]$, com K_D da ordem 7 μmol L^{-1} e, como já discutido anteriormente, a menadiona foi o composto que apresentou menor afinidade.

A Figura 30 mostra os resultados dos ensaios de atividade enzimática em ambientes aeróbicos. É possível notar que nas condições onde a proteína não foi adicionada, a absorbância do NADH se mantinha constante ao longo do curso reacional. Todavia, nas condições que continham a TcOYE + NADH, TcOYE + NADH + menadiona e TcOYE + NADH + DMSO, houve um decréscimo na absorbância do NADH, sugerindo que o mesmo estava sendo oxidado pela ação da proteína.

Curiosamente, mesmo na ausência do ligante, o NADH foi oxidado pela proteína. Isso é possível porque, como discutido anteriormente, o oxigênio molecular é um interferente ocasional nos testes de atividade enzimática na família OYE. Buscando minimizar esses efeitos, foi desenhado um procedimento experimental com baixa pressão de oxigênio e o resultado obtido foi comparado com os ensaios conduzidos em ambiente aeróbico. Esse resultado está ilustrado na Figura 31. Note que o declínio na absorbância do NADH (340 nm) foi menor quando realizado em ambiente de baixa pressão de oxigênio (painel 31B). Além disso, vale destacar, que em torno de 460 nm (relativo ao FMN) é perceptível uma redução na absorbância, sugerindo que em baixa pressão de oxigênio, o FMN é reduzido. Isso implica que, em ambientes aeróbicos, o oxigênio atuou como aceptor de elétrons (na forma de hidretos) a partir do FMNred. Esse achado nos motivou a usar o ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio como estratégia na prospecção de ligantes.

A Figura 32 ilustra o ensaio de atividade enzimática em baixa pressão de oxigênio conduzido para os ligantes menadiona e [AuCl(L1)]. A informação de que a menadiona interagia com a TcOYE já era conhecida e isso também foi comprovado com resultado ilustrado nos painéis 32A e 32B. Perceba que a partir do ponto onde o FMN se encontra completamente reduzido é adicionado o ligante menadiona que, imediatamente restaura o estado oxidativo do FMN, mantendo a absorbância em 460 nm praticamente constante. Para o composto teste, o experimento foi conduzido do mesmo modo e os resultados obtidos (painéis 32C e 32D) foram essencialmente similares, sugerindo que tal composto é, de algum modo, processado pela TcOYE. Esses ensaios contribuíram para mostrar que a TcOYE pode ser um dos alvos moleculares dos compostos cujo a atividade tripanomicida já tinha sido verificada por outros ensaios (GONÇALVES et al., 2017).

O experimento também foi conduzido para proteína LbOYE, que não se mostrou viável conforme ilustrado na Figura 33. Algumas hipóteses podem ser levantadas aqui para justificar esses resultados. Uma delas é que, de repente, a necessidade de agente redutor para LbOYE seja maior que a praticada para TcOYE, uma vez que a redução na absorbância do NADH (340 nm) se mostrou mais discreta que a reportada para TcOYE e, se a quantidade de NADH é insuficiente, o FMN não é adequadamente reduzido e, por conseguinte, não haveria mudança no estado redox do grupo prostético. Outra possibilidade é que o NADH não seja o redutor fisiológico para LbOYE. Isso é raro, mas não incomum na família OYE. Como discutido na introdução dessa tese, algumas

proteínas OYE tem preferência seletiva para NADPH ou NADH, talvez esse seja o caso da LbOYE.

É possível que alguns leitores pensem que o resultado se deva ao fato de a LbOYE não ter sido obtida na forma funcional, entretanto, tal hipótese é refutada pelos ensaios de supressão de fluorescência ter revelado mudanças no microambiente do fluoróforo com a adição de ligantes. Além disso, apesar do teste de atividade enzimática não ter sido efetivo para o nosso propósito, pode-se notar que existe, ainda que discreta, uma oxidação do NADH. Se a proteína obtida não estivesse funcional, a absorbância em 340 nm deveria ser constante, o que não é o caso aqui.

Na Figura 34 procurou-se ir além, nela tentou-se mostrar como a presença de um ligante interfere na ação de outro ligante. É importante destacar que para cada teste conduzido, o ambiente de partida foi o mesmo. Ou seja, o primeiro passo consistiu em reduzir o FMN, atestado pela redução da absorbância em 460 nm. A partir daí o tampão e os ligantes foram adicionados conforme o percurso ilustrado pelas setas no painel 34. Note que quando o tampão é adicionado ao sistema contendo o FMNred, há uma reoxidação temporária do FMN, devido ao oxigênio residual adicionado importunamente junto ao tampão, mas que, tão logo esse oxigênio é consumido, o FMN volta ao seu estado reduzido.

Quando foi adicionado menadiona, o FMNred foi reoxidado e mantido nessa configuração ao longo do curso reacional, uma vez que tal composto é substrato para essa proteína, como já discutido. Curiosamente, a adição do HFedtc não só impediu a reoxidação do FMN como o manteve nesse estado redox durante o tempo de monitoramento. A esses sistemas obtidos, foram adicionados os compostos menadiona, HFedtc e menadiona, respectivamente, conforme indicado pelas setas no painel 34D. Perceba que após a adição da menadiona ao sistema que outrora recebera tampão, houve uma recuperação no estado oxidativo do FMN, como de fato era esperado. Curiosamente, o que chamou atenção foi que a adição de HFedtc ao sistema que já continha menadiona, induziu mudança no estado redox do FMN, levando-o ao estado permanentemente reduzido. Isso implica uma competitividade entre a menadiona e o HFedtc pelo sítio ativo. Como pode ser visto aqui, o HFedtc tem maior afinidade de interação com a TcOYE do que a menadiona, de modo que o HFedtc se ligou ao sítio ativo da enzima e impediu a ligação da menadiona, justificando assim a redução do FMN. Quando foi adicionado menadiona ao sistema contendo HFedtc, nada acontece. Isso porque, como discutido

acima, o HFedtc tem maior afinidade à enzima e impediu que a menadiona se ligasse ao sítio ativo da TcOYE.

Em linhas gerais, esses ensaios foram úteis para comprovar que as proteínas foram obtidas no seu estado funcional, evidenciar quais ligantes interagiam com maior afinidade com as proteínas em estudo, demonstrar através de ensaios de atividade enzimática a possibilidade da TcOYE ser um dos alvos moleculares dos compostos tripanomicidas avaliados e validar esses ensaios como uma estratégia alternativa na prospecção de ligantes para proteínas da família OYE.

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados mostram que o protocolo de expressão, indução e purificação para as proteínas LbOYE e TcOYE aqui desenvolvidos nos permitiram obter essas proteínas em suas formas solúvel e monomérica.

Ensaios de CD e fluorescência intrínseca do triptofano mostraram que a purificação das proteínas em estudo apresentava estrutura secundária e terciária local, mostrando que tais proteínas foram obtidas em sua forma enovelada.

Testes de aSEC e SV-AUC confirmaram que as proteínas eram de fato produzidas na fração solúvel e na conformação monomérica. Além disso, os parâmetros hidrodinâmicos obtidos, como raio de Stokes e coeficiente de sedimentação apontam que todos os testes estruturais e funcionais foram conduzidos com a proteína na sua conformação nativa. Indo no mesmo caminho, os dados de SAXS corroboram com a observação de que a LbOYE é monomérica em solução e que, comparada a TcOYE, é sutilmente mais alongada.

Os resultados de desnaturação química e térmica das proteínas LbOYE e TcOYE revelaram que a proteína LbOYE apresenta, comparativamente, menor estabilidade estrutural e que o processo de desenovelamento é pouco cooperativo em ambas proteínas.

Ensaios funcionais de prospecção de ligantes e atividade enzimática revelaram que todos os compostos avaliados interagiram com as proteínas em estudo, sendo que o composto menadiona foi o que apresentou uma afinidade de interação menor comparada aos outros ligantes. Complementarmente, foi verificado que o ligante isolapachol interage com a LbOYE através de uma combinação entre uma supressão estática e dinâmica. Para TcOYE, foi demonstrado que o composto [AuCl(L1)] apresenta uma componente dinâmica de interação, já os outros ligantes parecem formar um complexo com a proteína (como é o caso do [PdI(HL1)]) ou com o fluoróforo ([Ni(Fedtc)$_2$] e [Pd(Fedtc)$_2$]). Apesar disso, todos os compostos avaliados pareciam interagir com as proteínas em estudo numa estequiometria de 1:1. Adicionalmente, os ensaios de atividade enzimática a baixa pressão de oxigênio se mostraram uma alternativa viável para identificação de possíveis substratos para proteína TcOYE, o que possibilitou o uso dessa estratégia como validação de alvo molecular para os compostos cujo a atividade tripanomicida já havia sido verificada. Entretanto, vale enfatizar que ajustes nessa metodologia precisam ser redesenhados para os ensaios de atividade com a proteína LbOYE.

7 LISTA DE PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Gonçalves, A.C.R., Carneiro, Z.A., Oliveira, C.G., Danuello, A., Guerra, W., Oliveira, R.J., Ferreira, F.B., **Veloso-Silva, L.L.W.**, Batista, F.A.H., Borges, J.C., de Albuquerque, S., Deflon, V.M., Maia, P.I.S., 2017. PtII, PdII and AuIII complexes with a thiosemicarbazone derived from diacethylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. Eur. J. Med. Chem. 141, 615–631. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.013

Veloso-Silva, L.L.W., Dores-Silva, P.R., Bertolino Reis, D.E., Moreno Oliveira, L.F., Libardi, S.H., Borges, J.C., 2019. Structural studies of Old Yellow Enzyme of Leishmania braziliensis in solution. Arch. Biochem. Biophys. 87–96. https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.11.009

Veras, L. da S., **Veloso-Silva, L.L.W.**, Alexandrino, D.M., 2018. Estudo de caso: Contaminação das águas do rio Parnaíba: a quem será que se destina?, in: Queiroz, S.L., Alexandrino, D.M. (Eds.), Estudos de Caso Para o Ensino de Química 2. CRV, Curitiba, p. 152. https://doi.org/10.24824/978854442862.7

8 REFERÊNCIAS

ADALBJÖRNSSON, B. V. **Thermophilic Old Yellow Enzyme: Structure and kinectic characterisation**. [s.l.] University of Manchester, 2012.

ADALBJÖRNSSON, B. V. et al. Biocatalysis with thermostable enzymes: Structure and properties of a thermophilic 'ene'-reductase related to old yellow enzyme. **ChemBioChem**, v. 11, n. 2, p. 197–207, 2010.

AL-MOMANY, B.; ABU-ROMMAN, S. Review Article Homologs of old yellow enzyme in plants. v. 10, n. 4, p. 584–590, 2016.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

AMERSHAN BIOSCIENCE. **Gel-filtration chromatography: Principles and Methods**. [s.l: s.n.]. v. 3

ANAND, U. et al. Exploring the Mechanism of Fluorescence Quenching in Proteins Induced by Tetracycline. p. 6312–6320, 2011.

ANDRADE, H. M. et al. Proteomic analysis of trypanosoma cruzi resistance to benznidazole. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 6, p. 2357–2367, 2008.

ANDRADE, O.; FILHO, S.; ALENCASTRO, B. DE. Modelagem de proteínas por homologia. v. 26, n. 2, p. 253–259, 2003.

BARNA, T. M. et al. Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme. **Journal of molecular biology**, v. 310, n. 2, p. 433–47, 2001.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania-host interactions: What has imaging taught us? **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659–1667, 2011.

BENDER, D. A. **Metabolism on-line: the virual tutorial room**. Disponível em: <http://david-bender.co.uk/metabonline/energy/ATP/ATP11.html>. Acesso em: 10 fev. 2018.

BENNION, B. J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5142–7, 2003.

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7. ed. New York: W.H Freeman and Company, 2002.

BERN, C. et al. Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655–681, 2011.

BINKS, P. R. et al. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by Enterobacter cloacae PB2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1214–1219, 1996.

BREITHAUPT, C. et al. X-ray structure of 12-Oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. **Structure**, v. 9, n. 5, p. 419–429, 2001.

BRIGÉ, A. et al. Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from Shewanella oneidensis indicate differences in physiological function. **The Biochemical journal**, v. 394, n. Pt 1, p. 335–344, 2006.

BROCCHIERI, L.; KARLIN, S. Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 10, p. 3390–3400, 2005.

BRODERICK, J. B. Coenzymes and cofactors: Glutathione. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–11, 2001.

BROWN, B. J. et al. On the Active Site of Old Yellow Enzyme turnover . Solution of the crystal structure of OYE1 from. **Biochemistry**, v. 273, n. 49, p. 32753–32762, 1998.

BROWN, B. J. et al. The role of glutamine 114 in Old Yellow Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 3, p. 2138–2145, 2002.

CANUTO, G. A. B. et al. Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. **Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2336–2347, 2015.

CHANDRASEKARAN, M. **Enzymes in Food and Beverage Processing**. New York: CRC Press, 2016.

COPELAND, R. A. **Enzymes**. 2. ed. Canada: Wiley-VCH, 2000.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy — challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478–1483, 2011.

DÍAZ-VIRAQUÉ, F. et al. Old Yellow Enzyme from Trypanosoma cruzi exhibits in vivo Prostaglandin F2α synthase activity and has a key role in parasite infection and drug

susceptibility. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, 2018.

DORES-SILVA, P. R. et al. Low resolution structural characterization of the Hsp70-interacting protein - Hip - from Leishmania braziliensis emphasizes its high asymmetry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 520, n. 2, p. 88–98, 2012.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies : parasite- vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, p. 1–12, 2012.

ENTSCH, B.; VAN BERKEL, W. J. H. Structure and mechanism of para-hydroxybenzoate hydroxylase. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 7, p. 476–483, 1995.

EXPASY. **Enzyme nomenclature database**. Disponível em: <https://enzyme.expasy.org/>. Acesso em: 24 mar. 2019.

FONTANELLA, G. H. et al. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental Trypanosoma cruzi infection: A vaccine candidate. **Vaccine**, v. 26, n. 19, p. 2322–2334, 2008.

FOX, K. M.; KARPLUS, P. A. Old yellow enzyme at 2 Angstron resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. **Structure**, v. 2, n. 11, p. 1089–1105, 1994.

FRAAIJE, M. W.; MATTEVI, A. Flavoenzymes: Diverse catalysts with recurrent features. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 126–132, 2000.

GARCÍA-HUERTAS, P. et al. Prostaglandin F2α synthase in *Trypanosoma cruzi* plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. **R Soc Open Sci**, v. 4, n. 9, p. 170773, 2017.

GARCÍA DE LA TORRE, J.; HUERTAS, M. L.; CARRASCO, B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 2, p. 719–730, 2000.

GLYNN, E. F. **Mixtures of Gaussians**. Disponível em: <http://research.stowers.org/mcm/efg/R/Statistics/MixturesOfDistributions/index.htm>. Acesso em: 28 dez. 2018.

GONÇALVES, A. C. R. **Complexos de Pd(II), Pt(II) e Au(III) com tiossemicarbazonas derivadas da diacetilmonooxima: síntese, caracterização,**

atividade anti-Trypanosoma cruzi e citotoxicidade. [s.l.] Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2016.

GONÇALVES, A. C. R. et al. Pt^{II}, Pd^{II} and Au^{III} complexes with a thiosemicarbazone derived from diacethylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, 2017.

HALL, M. et al. Asymmetric bioreduction of C=C bonds using enoate reductases OPR1, OPR3 and YqjM: Enzyme-based stereocontrol. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 350, n. 3, p. 411–418, 2008.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659–688, 2001.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 2007, n. ii, p. 145–171, 2007.

KARPLUS, M. The Levinthal paradox: yesterday and today. **Folding & design**, v. 2, n. 4, p. S69–S75, 1997.

KARPLUS, P. A.; FOX, K. M. Structure-function relations for old yellow enzyme relations for old yellow enzyme. n. August, 2015.

KATAOKA, M. et al. Old Yellow Enzyme from Candida macedoniensis catalyzes the stereospecific reduction of the C=C bond of ketoisophorone. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 12, p. 2651–7, 2002.

KITZING, K. et al. The 1.3 Å crystal structure of the flavoprotein YqjM reveals a novel class of old yellow enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27904–27913, 2005.

KOSHLAND, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 33, n. 2324, p. 2375–2378, 1995.

KUBATA, B. K. et al. Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in Trypanosoma brucei. **J Exp Med**, v. 192, n. 9, p. 1327–1338, 2000.

KUBATA, B. K. et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi. **J Exp Med**, v. 196, n. 9, p. 1241–1251, 2002.

KUBATA, B. K. et al. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and

parasites. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 7, p. 325–331, 2007.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006.

LI, H. M. et al. Physicochemical bases for protein folding, dynamics, and protein-ligand binding. **Science China Life Sciences**, v. 57, n. 3, p. 287–302, 2014.

LIMA, J. C. **Síntese e caracterização de complexos de metais de transição do grupo 10 derivados da Benzil bis(4-fenil-3-tiossemicarbazona) e do Ferrocenil S-Benzil Ditiocarbazato visando a obtenção de novos catalisadores e agentes antiparasitários**. [s.l.] Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2017.

LIMA, N. M. F. et al. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 757–761, 2004.

MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinectics: a modern approach**. 1. ed. NewJersey: John Wiley & Sons Inc., 2003.

MASSEY, V. Introduction: flavoprotein structure and mechanism. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, p. 473–475, 1995.

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

MAYHEW, S. G. The effects of pH and semiquinone formation on the oxidation-reduction potentials of flavin mononucleotide. A reappraisal. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 698–702, 1999.

MEAH, Y.; MASSEY, V. Old yellow enzyme: stepwise reduction of nitro-olefins and catalysis of aci-nitro tautomerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 10733–10738, 2000.

MEHLER, A. H. **Introduction to Enzymology**. New York: Academic Press Inc, 1957.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M. et al. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benzonidazole in Trypanosoma cruzi. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 169, 2011.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? **The Journal of infectious diseases**, v. 189, p. 1018–1023, 2004.

MOLOO, A. **Neglected Tropical Disease**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 23 out. 2017.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases : progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 6736, n. 16, 2016.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889–1920, 2013.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural studies of the Trypanosoma cruzi Old Yellow Enzyme: Insights into enzyme dynamics and specificity. **Biophysical Chemistry**, v. 184, p. 44–53, 2013.

MURTA, S. M. F. et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 151–162, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 5. ed. New York: W.H Freeman and Company, 2011.

NIZAM, S. et al. Comparative structural modeling of six Old Yellow Enzymes (OYEs) from the necrotrophic fungus Ascochyta rabiei: Insight into novel OYE classes with differences in cofactor binding, organization of active site residues and stereopreferences. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014a.

NIZAM, S. et al. Comprehensive genome-wide analysis reveals different classes of enigmatic old yellow enzyme in fungi. **Scientific reports**, v. 4, p. 4013, 2014b.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013.

PATTERSON-ORAZEM, A.; SULLIVAN, B.; STEWART, J. D. Pichia stipitis OYE 2.6 variants with improved catalytic efficiencies from site-saturation mutagenesis libraries. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 20, p. 562–5632, 2014.

PEI, X. Q.; XU, M. Y.; WU, Z. L. Two “classical” Old Yellow Enzymes from Chryseobacterium sp. CA49: Broad substrate specificity of Chr-OYE1 and limited activity of Chr-OYE2. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 123, p. 91–99, 2016.

PETOUKHOV, M. V; SVERGUN, D. I. Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. **The International Journal of Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 429–437, 2013.

RAFATI, S. et al. Building research and development capacity for neglected tropical diseases impacting leishmaniasis in the middle east and north africa: A case study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. 8–11, 2015.

RASSI, A.; RASSI JR., A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

REES, D. C.; ROBERTSON, A. D. Thermostability of Proteins. n. 3, p. 1187–1194, 2001.

REVEIZ, L. et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 320–324, 2014.

RODRIGUES, N. C. **Estudo estrutural das enzimas Topoisomerase II Mitocondrial e Old Yellow Enzyme de Trypanosoma cruzi**. [s.l.] Universidade de São Paulo - USP, 2014.

ROUX, Y. et al. Bio-inspired electron-delivering system for reductive activation of dioxygen at metal centres towards artificial flavoenzymes. **Nature Communications**, v. 6, n. Umr 8182, p. 8509, 2015.

SAITO, K. et al. The cloning and expression of a gene encoding old yellow enzyme from Saccharomyces carlsbergensis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 31, p. 20720–20724, 1991.

SANTOS, D. M. et al. Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) braziliensis. **PLoS Neglected Tropical**

Diseases, v. 8, n. 10, 2014.

SCHWARTZ, S. D.; SCHRAMM, V. L. Enzymatic transition states and dynamic motion in barrier crossing. **Nat Chem Biol**, v. 5, n. 8, p. 551–558, 2009.

SERAPHIM, T. V.; RAMOS, C. H. .; BORGES, J. C. The Interaction Networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and Leishmania parasites. In: HOURY, W. A. (Ed.). . **The Molecular Chaperones Interactions Networks in Protein Folding and Degradation**. 1. ed. Toronto, Canada: Springer, 2014. p. 481.

SHENG, X. et al. Identification and characterization of a novel Old Yellow Enzyme from Bacillus subtilis str.168. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVA JUNIOR, E. N. et al. Anti- Trypanosoma cruzi Compounds : Our Contribution for the Evaluation. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 25, n. October, p. 1780–1798, 2014.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 351–361, 2013.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

STRASSNER, J. et al. A homolog of old yellow enzyme in tomato. Spectral properties and substrate specificity of the recombinant protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 35067–35073, 1999.

STUERMER, R. et al. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 203–213, 2007.

SUGIYAMA, S. et al. Preparation, crystallization and preliminary crystallographic analysis of old yellow enzyme from Trypanosoma cruzi. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. 10, p. 896–898, 2007.

TEIXEIRA, M.; ALMEIDA, Y. DE. In vitro and in vivo Leishmanicidal Activity of 2-

Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4- naphthoquinone (Lapachol). **Phytotherapy**, v. 48, n. February 2000, p. 44–48, 2001.

THOMA, J. A.; KOSHLAND, D. E. Competitive Inhibition by Substrate during Enzyme Action. Evidence for the Induced-fit Theory1,2. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, n. 13, p. 3329–3333, 1960.

TOOGOOD, H. S.; GARDINER, J. M.; SCRUTTON, N. S. Biocatalytic Reductions and Chemical Versatility of the Old Yellow Enzyme Family of Flavoprotein Oxidoreductases. **ChemCatChem**, v. 2, n. 8, p. 892–914, 2010.

TOOGOOD, H. S.; SCRUTTON, N. S. New developments in 'ene'-reductase catalysed biological hydrogenations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 107–115, 2014.

UZIR, M. H.; NAJIMUDIN, N. On the bi-enzymatic behaviour of Saccharomyces cerevisiae-mediated stereoselective biotransformation of 2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione. **Molecular Catalysis**, v. 447, p. 56–64, 2018.

VAN HOLDE, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of Physical Biochemistry**. 2nd. ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2006.

VAZ, A. D. N.; CHAKRABORTY, S.; MASSEY, V. Old Yellow enzyme: aromatization of cyclic enones and the mechanism of a novel dismutation reaction. **Biochemistry**, v. 34, p. 4246–4256, 1995.

VELOSO-SILVA, L. L. W. et al. Structural studies of Old Yellow Enzyme of Leishmania braziliensis in solution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 87–96, 2018.

VELOSO-SILVA, L. L. W. et al. Structural studies of Old Yellow Enzyme of Leishmania braziliensis in solution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 661, 2019.

VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from Trypanosoma and Leishmania as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 2017.

WARBURG, V. O.; CHRISTIAN, W. Über das neue Oxydationsferment. **Die Naturwissenschaften**, v. 20, n. 51, p. 980–981, 1932.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

the United States of America, v. 105, n. 13, p. 5022–7, 2008.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 11, n. October 2009, p. e31, 2009.

WILLIAMS, R. E.; BRUCE, N. C. “New uses for an old enzyme” - The Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. **Microbiology**, v. 148, n. 6, p. 1607–1614, 2002.

XU, M. Y.; PEI, X. Q.; WU, Z. L. Identification and characterization of a novel “thermophilic- like” Old Yellow Enzyme from the genome of Chryseobacterium sp. CA49. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 64–71, 2014.

YAMAGUCHI, K. et al. Structure of the inhibitor complex of old yellow enzyme from Trypanosoma cruzi. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 18, n. 1, p. 66–69, 2011.

YAMANO, T. et al. Characterization of the Electron Acceptors of Old Yellow Enzyme Mechanistic Approach to the Mode of One Electron Transfer from Enzyme to Menadione or Dyestuffs1 was content in brewer ’ s yeast is considerably high . Interaction only from a mechanistic poi. v. 114, n. 6, p. 879–884, 1993.