



**DAIANA TEIXEIRA MANCINI**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE  
POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA  
NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE *BRUCELLA*  
*SUIS***

**LAVRAS - MG**

**2011**

**DAIANA TEIXEIRA MANCINI**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE POTENCIAIS INIBIDORES DA  
ENZIMA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE *BRUCELLA SUI*S**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Teodorico de Castro Ramalho

Coorientador

Dr. Tanos Celmar Costra França

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Mancini, Daiana Teixeira.

Estudos computacionais de potenciais inibidores da enzima nucleosídeo hidrolase de *Brucella suis* / Daiana Teixeira Mancini. – Lavras : UFLA, 2011.

159p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Ancoramento molecular. 2. Dinâmica molecular. 3. Guerra biológica. 4. Modelagem por homologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 615.19

**DAIANA TEIXEIRA MANCINI**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE POTENCIAIS INIBIDORES DA  
ENZIMA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE *BRUCELLA SUI*S**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dra. Magdalena Nascimento Rennó      UFRJ

Dr. Matheus Puggina de Freitas      UFLA

Dr. Cleber Paulo Andrada Anconi      UFLA

Dr. Teodorico de Castro Ramalho

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2011**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho e dar forças nas horas difíceis.

Aos meus pais, Heliodalvo e Salete, pelo amor, confiança e dedicação.

À minha irmã, Luana, pelo carinho e paciência.

Ao meu noivo Ramon, pelo companheirismo, amor e por sempre me animar nas horas mais difíceis.

A toda a minha família, pela credibilidade e amizade.

Aos professores Teodorico de Castro Ramalho, Elaine F. F. da Cunha e Tanos Celmar Costa França, pela orientação, paciência, ensinamentos e amizade.

A todos os colegas do grupo de Química Computacional, em especial à Karina, Mel, Jú, Marcola, Regis e Robocop, por tornarem tudo mais divertido.

A todos os professores do curso de Química que nos transmitiram conhecimento da melhor forma possível.

À Universidade Federal de Lavras e ao Instituto Militar de Engenharia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq, à Capes e ao Ministério da Defesa, Edital CAPES/PRODEFESA 2008, pelo financiamento dos recursos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho.

## RESUMO

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*. Apesar da disponibilidade de quimioterapia contra esta doença, o risco de resistência contra esses fármacos está sempre presente. Considerando o risco que esta bactéria pode representar como agente de guerra biológica, é imperativa a descoberta de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da brucelose. A enzima nucleosídeo hidrolase (NH) se encontra largamente distribuída na natureza e, por não ter sido encontrada ainda em mamíferos, tem sido vista como um alvo ideal para a quimioterapia seletiva de doenças parasitárias e bacterianas. Com base nisso, foi proposta neste trabalho a estrutura tridimensional da NH de *Brucella suis* (*BsNH*), construída através de modelagem por homologia, como alvo molecular para o planejamento de novos fármacos contra a brucelose. Foram realizados também estudos por ancoramento molecular, visando analisar o modo de interação, dos substratos naturais e de 4 inibidores, conhecidos da NH de *Chritidia fasciculata* (*CfNH*), no sítio ativo da *BsNH*. Posteriormente, foram realizadas simulações por dinâmica molecular (DM) para checar os resultados do ancoramento e selecionar os inibidores mais promissores como protótipos para o planejamento de potenciais inibidores para a *BsNH*. Neste trabalho também foram realizados estudos por ancoramento e dinâmica molecular destes inibidores e substratos naturais com a enzima *CfNH*, a fim de validar o protocolo utilizado. Devido a grande similaridade sequencial entre a enzima molde e a enzima alvo (45,1%), foi possível construir um modelo para a *BsNH* com uma excelente qualidade estereoquímica. Os resultados de ancoramento, além de corroborar com os de dinâmica, sugerem uma boa correlação com os resultados experimentais dos ligantes. Também foi observado que os inibidores de *CfNH* podem vir a ser excelentes inibidores da *BsNH*.

Palavras chave: Nucleosídeo hidrolase. *Brucella suis*. Ancoramento molecular. Dinâmica molecular. Modelagem por homologia. Guerra biológica.

## ABSTRACT

Brucellosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Brucella*. Despite the availability of chemotherapy against this disease today, the risk of resistance against these drugs is always present. Considering further the risk that this bacteria represents a biological warfare agent, it is imperative the search for new therapeutic targets and the development of new drugs against brucellosis. The enzyme nucleoside hydrolase (NH) is largely found in nature but not in mammals being, for this reason, seen as an ideal target to selective chemotherapy against parasitic and bacterial diseases. In line with this, was proposed in this work the three-dimensional structure of the NH from *B.suis* (*BsNH*), built through homology modeling, as a molecular target to the design of new drugs against brucellose. Further molecular docking studies, aiming to analyze the binding mode of the natural substrates and 4 known inhibitors of *Chritidia fasciculata* NH (*CfNH*) in the active site of *BsNH* were also performed. Subsequently, we carried out Molecular Dynamics (MD) simulations in order to check the docking results and select the most promising inhibitors as lead compounds to the design of potential inhibitors to *BsNH*. Additional *docking* and MD studies of these inhibitors and natural substrates with the *CfNH* were also performed in order to validate the protocol used. Due to the large sequence similarity between template and target (45,1%), it was possible to build a model to *BsNH* with an excellent stereochemical quality. Docking results, besides corroborating with the MD simulations, suggested a good correlation with experimental results. We also observed that *CfNH* inhibitors could, as well, be excellent *BsNH* inhibitors.

Keywords: Nucleoside hydrolase. *Brucella suis*. Molecular docking. Molecular dynamics. Homology modeling. Biological warfare.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema das interações no sítio ativo da enzima IU-CfNH complexada com o pAPIR (PDB-2MAS).....	29
Figura 2	Esquema da reação catalisada pela enzima Nucleosídeo Hidrolase (como exemplo foi apresentado a adenosina como nucleosídeo purina).....	30
Figura 3	Sequência monomérica da BsNH no formato FASTA.....	43
Figura 4	Alinhamento simples entre a BsNH e a EcNH. Os resíduos de aminoácidos em vermelho são idênticos, os resíduos em verde são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa.....	51
Figura 5	Modelo tridimensional da BsNH.....	52
Figura 6	Sobreposição dos esqueletos da enzima alvo (BsNH- azul) e da enzima molde (EcNH- laranja).....	54
Figura 7	Volume da cavidade (verde) da BsNH com a ribose (amarelo) ancorada. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	57
Figura 8	Sobreposição dos inibidores depois do ancoramento. A ribose está representada em amarelo e os inibidores em rosa. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	60
Figura 9	Inibidor 1 ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	63
Figura 10	Inibidor 2 ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	64
Figura 11	Inibidor 3 ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	65



Figura 12	Inibidor 4 ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	65
Figura 13	Sobreposição dos substratos naturais depois do ancoramento. A ribose é mostrada em amarelo os substratos (1 inosina, 2 adenosina e 3 uridina) em roxo. Para melhor visualização omitiu-se a proteína.....	68
Figura 14	Inosina ancorada na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	71
Figura 15	Adenosina ancorada na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	72
Figura 16	Uridina ancorada na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados.....	72
Figura 17	Sobreposição do pAPIR depois do ancoramento (Redocking). Para melhor visualização omitiu-se a proteína.	81
Figura 18	Ilustração qualitativa do DRMQ espacial para o sistema BsNH/Inibidor 1. Quanto maior a espessura do tubo, maior o DRMQ. O ligante foi omitido na figura.....	87
Figura 19	Ilustração qualitativa do DRMQ espacial para o sistema CfNH/Inibidor 1. Quanto maior a espessura do tubo, maior o DRMQ. O ligante foi omitido na figura.....	88
Figura 20	Quadros da dinâmica molecular do inibidor 1 no sítio ativo da BsNH.....	90
Figura 21	Quadros da dinâmica molecular do inibidor 2 no sítio ativo da BsNH.....	93
Figura 22	Quadros da dinâmica molecular do inibidor 3 no sítio ativo da BsNH.....	97
Figura 23	Quadros da dinâmica molecular do inibidor 4 no sítio ativo da BsNH.....	101

Figura 24	Quadros da dinâmica molecular da Inosina no sítio ativo da BsNH.....	105
Figura 25	Quadros da dinâmica molecular da Adenosina no sítio ativo da BsNH.....	108
Figura 26	Quadros da dinâmica molecular da Uridina no sítio ativo da BsNH.....	112
Figura 27	Quadros da dinâmica molecular do inibidor 1 no sítio ativo da CfNH.....	115
Figura 28	Interação hidrofóbica entre o resíduo Phe167 e o inibidor 1 observada durante a DM.....	116
Figura 29	Quadros da dinâmica molecular da Inosina no sítio ativo da CfNH.....	118
Gráfico 1	Gráfico de Ramachandran. As regiões mais favoráveis são mostradas em vermelho, as permitidas em amarelo, as generosamente permitidas em amarelo claro e as não permitidas em branco.....	53
Gráfico 2	Correlação entre os valores de constante de inibição experimental (pKi) e energia intermolecular (E.) obtida no ancoramento molecular para os inibidores 1-4.....	58
Gráfico 3	Correlação entre os valores de constante de inibição experimental (pKi) e energia intermolecular (E.) obtida no ancoramento molecular para os inibidores 1-4.....	78
Gráfico 4	Varição do DRMQ temporal para a simulação BsNH/Inibidor 1. A curva da enzima está representada em preto e a do inibidor, em vermelho.....	83
Gráfico 5	Varição DRMQ temporal para a simulação CfNH/Inibidor 1. A curva da enzima está representada em preto e a do inibidor, em vermelho.....	84

Gráfico 6	Varição do DRMQ espacial para a simulação BsNH/Inibidor 1. Em preto, a variação da BsNH (cadeia principal + cadeia lateral); em vermelho a cadeia principal e, em verde, a cadeia lateral.....	86
Gráfico 7	Varição DRMQ espacial para a simulação CfNH/Inibidor 1. Em preto, a variação da CfNH (cadeia principal + cadeia lateral); em vermelho a cadeia principal e, em verde, a cadeia lateral.....	87
Gráfico 8	Varição da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 1, durante a simulação de DM.....	90
Gráfico 9	Varição da distância entre o resíduo His262 e o inibidor 1, durante a simulação de DM.....	91
Gráfico 10	Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor 1 e a BsNH.....	92
Gráfico 11	Varição da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 2, durante a simulação de DM.....	94
Gráfico 12	Varição da distância entre o resíduo His262 e o inibidor 2, durante a simulação de DM.....	94
Gráfico 13	Varição da distância entre o resíduo Asn101 e o inibidor 2, durante a simulação de DM.....	95
Gráfico 14	Varição da distância entre o resíduo Glu100 e o inibidor 2, durante a simulação de DM.....	95
Gráfico 15	Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor 2 e a BsNH.....	96
Gráfico 16	Varição da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 3 durante a simulação de DM.....	98
Gráfico 17	Varição da distância entre o resíduo Asn181 e o inibidor 3, durante a simulação de DM.....	98

Gráfico 18	Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor 3 e a BsNH.....	99
Gráfico 19	Variação da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 4 durante a simulação de DM.....	101
Gráfico 20	Variação da distância entre o resíduo Gly59 e o inibidor 4 durante a simulação de DM.....	102
Gráfico 21	Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor 4 e a BsNH.....	103
Gráfico 22	Variação da distância entre o resíduo Phe188 e a Inosina, durante a simulação de DM.....	105
Gráfico 23	Variação da distância entre o resíduo Gly59 e a Inosina, durante a simulação de DM.....	106
Gráfico 24	Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Inosina e a BsNH.....	107
Gráfico 25	Variação da distância entre o resíduo Phe188 e a Adenosina, durante a simulação de DM.....	109
Gráfico 26	Variação da distância entre o resíduo Gly59 e a Adenosina, durante a simulação de DM.....	109
Gráfico 27	Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Adenosina e a BsNH.....	110
Gráfico 28	Variação da distância entre o resíduo Asp35 e a Uridina, durante a simulação de DM.....	112
Gráfico 29	Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Uridina e a BsNH.....	113
Gráfico 30	Número de ligações de hidrogênio formadas entre o Inibidor 1 e a CfNH.....	117
Gráfico 31	Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Inosina e a CfNH.....	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Inibidores de NH e seus respectivos valores de constante de inibição para CfNH.....	45
Tabela 2	Substratos das NHs que foram estudados no presente trabalho e seus respectivos valores de KM para CfNH.....	46
Tabela 3	Resíduos de aminoácidos pertencentes aos sítios ativos da BsNH e da CfNH. Os resíduos de aminoácidos que se conservam estão representados em negrito.....	56
Tabela 4	Valores de constante de inibição experimental ( $pK_i = -\log K_i$ ) (Miles et al., 1999), energia de interação intermolecular proteína/inibidores e ligação de hidrogênio obtidos do ancoramento para os inibidores 1-4.....	58
Tabela 5	Valores do comprimento das ligações de hidrogênio, das energias das ligações de hidrogênio, e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima.....	61
Tabela 6	Valores da constante de Michaelis-Menten experimental ( $pK_M = -\log K_M$ ) (Horenstein et al., 1991; Versées et al., 2001), energia de interação intermolecular proteína/substratos e ligação de hidrogênio obtidos do ancoramento para os substratos naturais.....	67
Tabela 7	Valores de comprimento de ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio, e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os substratos naturais e a enzima.....	69
Tabela 8	Valores de constante de inibição experimental ( $pK_i = -\log$	

	Ki) (Miles et al., 1999), energia de interação intermolecular proteína/inibidores e pAPIR, comprimento das ligações de hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores/enzima e pAPIR/enzima.....	76
Tabela 9	Valores da constante de Michaelis-Menten experimental ( $pKM = -\log KM$ ) (Horenstein et al., 1991; Versées et al., 2001), energia de interação intermolecular proteína/substratos, comprimento das ligações de hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os substratos e a enzima.....	79
Tabela 10	Médias dos DRMQ temporais e desvios médios tomados ao longo de cada sistema simulado com a BsNH.....	85
Tabela 11	Médias dos DRMQ temporais e desvios médios tomados ao longo de cada sistema simulado com a CfNH.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Phe	Fenilalanina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

## LISTA DE SIGLAS

BsNH	Nucleosídeo hidrolase de <i>Brucella suis</i>
CfNH	Nucleosídeo hidrolase de <i>Chritidia fasciculata</i>
Cf-IUNH	Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase da <i>Chritidia fasciculata</i>
CPAB	Convenção para Prevenção de Armas Biológicas
CPAQ	Convenção para Prevenção de Armas Químicas
Def QBN	Defesa Química Biológica e Nuclear
DM	Dinâmica molecular
DRMQ	Desvio da raiz média quadrática
EcNH	Nucleosídeo hidrolase de <i>Escherichia coli</i>
EsIE	Escola de instrução especializada
EUA	Estados Unidos da América
HF	Hartree-Fock
IAGNH	Inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase
IUNH	Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase
IUPAC	Do inglês "International Union of Pure and Applied Chemistry"
Ld-IUNH	inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de <i>Leishmania donovane</i>
Lm-IUNH	inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de <i>Leishmania mayor</i>
LQC	Laboratório de Química Computacional
MM	Mecânica molecular
MDV	Molegro virtual docker
NH	Nucleosídeo hidrolase
NHs	Nucleosídeo hidrolases
pAPIR	p-aminofenil-(1S)-iminoribitol
PDB	Protein Data Bank

Tv-IAGNH Inosina-uridina nucleosídeo hidrolase de *Tripanossoma vivax*

### LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
Ψ	Ângulo psi
Φ	Ângulo phi
μM	Micromolar
K	Kelvin
$K_i$	Constante de inibição
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
l-bgps	<i>quasi</i> Newton rapsom
cg	Do inglês “conjugate gradients”
fs	Fentossegundos
nm	Nanômetro
ns	Nanossegundos
ps	Picossegundos



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	Guerra biológica (Histórico).....	20
2.2	Agentes de guerra biológica.....	22
2.3	Brucelose.....	24
2.4	As nucleosídeo hidrolases.....	27
2.4.1	Recuperação de purinas.....	30
2.5	Métodos computacionais.....	31
2.5.1	Modelagem por homologia.....	31
2.5.2	Mecânica molecular.....	34
2.5.2.1	Ancoramento molecular ( <i>docking</i> ).....	36
2.5.2.2	Dinâmica molecular.....	38
2.5.2.2.1	Método do máximo declive.....	40
2.5.2.2.2	Método dos gradientes conjugados.....	40
2.5.2.2.3	Método quase Newton-Raphson.....	40
3	OBJETIVOS.....	41
4	METODOLOGIA.....	42
4.1	Modelagem por homologia da nucleosídeo hidrolase de <i>Brucella suis</i> .....	42
4.1.1	Construção do modelo.....	42
4.1.2	Validação do molelo.....	43
4.1.3	Construção do complexo (enzima-ribose cofator).....	43
4.2	Comparação do sítio da enzima modelo ( <i>BsNH</i> ) com o sítio ativo da enzima nucleosídeo hidrolase de <i>C. fasciculata</i> .....	44
4.3	Dados Biológicos.....	44
4.4	Estudo por ancoramento molecular ( <i>docking</i> ).....	47
4.5	Dinâmica Molecular.....	48
4.6	Análise de estruturas e obtenção de figuras e gráficos.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	Modelagem por homologia.....	50
5.1.1	Validação do modelo.....	52
5.2	Estudo dos sítios ativos da enzima alvo ( <i>BsNH</i> ) e da <i>CfNH</i> .....	55
5.3	Estudo por ancoramento molecular da <i>BsNH</i> com os substratos naturais e os inibidores de <i>CfNH</i> .....	56
5.4	Estudo por ancoramento molecular entre a <i>CfNH</i> , os substratos naturais e os inibidores 1- 4.....	74
5.5	Estudos por dinâmica molecular.....	81

5.5.1	Análise dos gráficos de desvio padrão.....	82
5.5.2	Análise do comportamento dinâmico dos inibidores no sítio ativo da <i>BsNH</i> .....	89
5.5.3	Análise do comportamento dinâmico dos substratos no sítio ativo da <i>BsNH</i> .....	103
5.5.4	Análise do comportamento dinâmico do inibidor 1 e do substrato natural inosina no sítio ativo da <i>CjNH</i> .....	114
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
	REFERÊNCIAS.....	122
	APÊNDICE.....	138

## 1 INTRODUÇÃO

A guerra biológica se baseia no uso de microorganismos e de seus produtos tóxicos para provocar lesões, enfermidades e morte em homens, animais e plantas (DIOMEDI, 2003).

Os principais agentes de guerra biológica são as bactérias, (p.ex. *Bacillus anthracis*; *Yersinia pestis*; *Coxiella burnetti*; *Brucella suis*); os vírus (p.ex. Variola virus; Vírus da encefalite equina, da febre amarela; ebola) e as toxinas: (p.ex. toxina botulínica; ricina e enterotoxina estafilocócica) (FRISCHKNECHT, 2003).

Infecções causadas por bactérias constituem uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são responsáveis pela doença conhecida como brucelose ou febre de Malta (GODFROID et al., 2005; GORVEL, 2008; GUERRA, 2007; VULLO et al., 2010; WHATMORE, 2009), uma zoonose que causa uma grande preocupação em todo o mundo. A doença em humanos é causada por uma das quatro espécies do gênero *Brucella*: *B. melitensis*; *B. abortus*; *B. suis* e *B. canis* (CARRERA et al., 2006; YOUNGET et al., 2004).

A *Brucella* há muito tempo vem sendo considerada um potencial agente de guerra biológica (FRANCO et al., 2007; JOSEPH et al., 2010; PAPPAS et al., 2006a, 2006b). O potencial uso desta bactéria como arma biológica seria motivado pelo seu alto poder infectante, pela habilidade de incapacitar indivíduos infectados e a natureza altamente persistente da infecção em humanos (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005).

O tratamento da brucelose humana se baseia na combinação do antibiótico doxiciclina com estreptomicina ou com rifampicina (TURUNÇ et al., 2008). Porém, já há relatos de casos de resistência a estes fármacos (HASANJANI-ROUSHAN et al., 2010). Esses fatos, aliados ao risco cada vez

mais real do surgimento de cepas de *Brucella* geneticamente modificadas, para as quais não haveria quimioterapia disponível, torna necessária a descoberta de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da brucelose.

A enzima nucleosídeo hidrolase (NH) é uma enzima que vem sendo bastante estudada e já foi estabelecida como um potencial alvo molecular para o planejamento de fármacos contra infecções parasitárias e bacterianas (FRANÇA et al., 2008a; VERSÉES; STEYAERT, 2003). Essa enzima é fundamental para a síntese *de novo* de purinas e pirimidinas em bactérias e protozoários, e não foi até o momento identificada em mamíferos, fato que a torna um ótimo alvo molecular para o planejamento de inibidores seletivos (FRANÇA et al., 2008a; VERSÉES; STEYAERT, 2003).

Neste trabalho, a NH de *Brucella suis* (*BsNH*) é proposta como um potencial alvo molecular para o planejamento de protótipos seletivos contra a brucelose a partir de um modelo da estrutura 3D dessa enzima construído por modelagem comparativa. Este modelo foi posteriormente utilizado em estudos por ancoramento molecular (*docking*) a fim de estudar as interações de seu sítio ativo com inibidores conhecidos de NH. Como uma terceira etapa do trabalho foram realizados estudos por dinâmica molecular, com o objetivo de se entender melhor o comportamento destes inibidores no sítio ativo da *BsNH*, a fim de subsidiar o planejamento de novos protótipos contra a brucelose. A fim de validar a metodologia proposta, foram realizados também estudos por ancoramento e dinâmica molecular destes inibidores com a enzima *CjNH*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Guerra biológica (Histórico)**

As armas biológicas vêm sendo utilizadas desde a antiguidade quando já eram comuns tentativas de contaminar exércitos e populações inimigas com agentes infecciosos. Estas armas constituem uma ameaça silenciosa, porém de grande potencial destruidor, tendo em vista sua capacidade de levar morte e terror, de modo rápido, imperceptível e nem sempre, combatível (FERNANDES; OLIVEIRA, 2009).

Como principal exemplo do uso de uma arma biológica na Idade Média, podemos citar o episódio da cidade sitiada de Caffa (na atual Criméia) em 1346, quando os tártaros lançaram cadáveres de vítimas da peste para dentro dos muros da cidade (SILVA, 2001) com o objetivo de vencer a resistência dos Genoveses que controlavam as rotas comerciais para o oriente. Acredita-se que como consequência desse ataque teve início a primeira grande pandemia de peste da Europa, pois os genoveses sobreviventes teriam levado a peste consigo para a Europa ao voltar para casa.

Na época das navegações há relatos da disseminação de varíola entre os nativos da América Latina pelos espanhóis, durante o século XV (FRANÇA et al., 2008b; FRISCHKNECHT, 2003). A partir do século XVI, os projetos coloniais europeus se beneficiaram da introdução da sífilis, da gripe, da varíola, do tifo e da tularemia, para aniquilar as populações nativas do Novo Mundo (CARDOSO et al., 2008).

O uso de armas biológicas também foi bastante intenso no século XX, tendo contribuído para isso o advento da industrialização e os avanços da biotecnologia (LIM et al., 2005). Durante a primeira guerra mundial, a Alemanha contaminou com antraz e melioidose o gado exportado para as forças

aliadas (FERNANDES; OLIVEIRA, 2009). Entre 1932 e 1945, o Japão criou na Manchúria (região da China que estava sob domínio japonês) um centro de pesquisas de armas biológicas, utilizando experimentalmente inoculações nos prisioneiros. Foram realizadas experiências com: *Bacillus anthracis*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia pestis*. Cidades chinesas eram atacadas pela pulverização das culturas, onde também foram lançadas mais de 15 milhões de pulgas contaminadas com a peste bubônica (FERNANDES; OLIVEIRA, 2009).

Durante a segunda guerra mundial, a Inglaterra iniciou pesquisas para a adaptação de munições para a utilização com cargas biológicas (*weaponization*). Foram testadas granadas de artilharia contendo esporos de antraz em uma ilha próxima à costa escocesa, a ilha de Gruinard (FRANÇA et al., 2008b; TASCHETO, 2002; WILLIS, 2002). Para verificar a viabilidade dos esporos, ovelhas eram amarradas em cercas de madeira e as granadas lançadas próximas a elas. Em três dias as ovelhas começaram a morrer. Todavia, apesar dos esforços para a descontaminação, os esporos remanescentes dos testes mantiveram a ilha inabitável por quase 50 anos (FRANÇA et al., 2008b; WILLIS, 2002).

Os EUA também mantiveram um programa de armas biológicas no forte Detrick (localizado em Frederick Maryland), onde havia uma planta piloto para a produção de agentes biológicos que empregava 3.800 militares e 100 civis, no ano de 1943. Muitos dos padrões de biossegurança utilizados hoje em dia, em laboratórios de nível 3 e 4, foram ali desenvolvidos. Os esforços de produção se concentravam, principalmente, em antraz e toxina botulínica, no entanto, tularemia, brucelose, pseudomonose e psitacose também foram estudadas. Agentes que atacam plantas também foram pesquisados e havia planos para dizimar as plantações japonesas. As pesquisas americanas, entre os anos 1940 – 1950, envolveram testes de campo que incluíram testes de vulnerabilidade ao ar

livre e contaminação de sistemas de distribuição de água urbana com microrganismos vivos supostamente inofensivos, em grandes cidades americanas (FRANÇA et al., 2008b; MOON, 1999; TASCHETO, 2002).

A ex-União Soviética manteve durante os anos 80 e 90, onze laboratórios especializados na pesquisa e produção destes agentes (FERNANDES; OLIVEIRA, 2009). Há relatos de um acidente ocorrido em 1979, com escape de esporos de *B. anthracis*, ocasionando 69 mortes (CARDOSO et al., 2008; MESELSON et al., 1994). Outro acontecimento diz respeito ao conflito entre os EUA e o Iraque, revelando a existência de plantas produtoras de agentes biológicos infecciosos (*B. anthracis*, rotavírus, aflatoxina, micotoxinas e toxina botulínica) para serem utilizados como armas de destruição em massa (CARDOSO et al., 2008; ZILINSKAS, 1997).

## **2.2 Agentes de guerra biológica**

Os agentes biológicos de guerra consistem em microorganismos vivos ou suas toxinas quando empregados como armas (GUIMARÃES et al., 2011a). Os agentes clássicos são bactérias, vírus, fungos, protozoários e toxinas. Estas últimas, em particular, por se tratarem de substâncias químicas tóxicas, são incluídas nas categorias de armas químicas e biológicas, sendo banidas tanto pela Convenção para Prevenção de Armas Químicas (CPAQ) (<http://www.opcw.org/>), quanto pela Convenção para Prevenção de Armas Biológicas (CPAB) (<http://www.opbw.org/>). Esses agentes têm sido utilizados como instrumentos de guerra e terror por milhares de anos para provocar o medo e danos em seres humanos, animais e plantas. Isso porque eles são invisíveis, silenciosos, inodoros e podem ser usados como uma arma absoluta de fácil dispersão e produção barata (HAWLEY; EITZEN JUNIOR, 2001).

Os agentes de maior interesse para emprego como armas biológicas são aqueles pouco estudados, de grande virulência, alta letalidade e para os quais não se conhecem tratamentos adequados. Estes são focos de grande risco à segurança das populações (CARDOSO et al., 2008).

As armas biológicas são fundamentalmente diferentes das químicas no que diz respeito às seguintes características: habilidade do microorganismo se reproduzir no hospedeiro; efeito retardado (Os sintomas resultantes da contaminação por um microorganismo aparecem apenas após um período específico para cada agente, conhecido como período de incubação, dificultando a identificação da origem de um ataque); inexistência, atualmente, de detectores biológicos com as mesmas capacidades dos detectores químicos (portáteis, confiáveis e rápidos) dificultando a identificação de um ataque biológico antes que seus efeitos se espalhem; impacto psicológico ainda maior que o das armas químicas; relativa simplicidade e baixo custo de produção; possibilidade de disseminação através de animais e insetos (vetores) (FRANÇA et al., 2008b; SIDELL; TAKAFUJI; FRANZ, 1997; TAYLOR; TAYLOR JUNIOR, 1992).

A produção de agentes biológicos, tal como agentes químicos, não oferece grandes obstáculos técnicos, sendo ainda mais simples e barata. A cultura destes agentes em laboratório é feita por técnicas básicas de microbiologia, utilizando materiais de amplo emprego e fácil aquisição (FRANÇA et al., 2008b).

A defesa civil contra um ataque terrorista ou mesmo convencional por agentes biológicos é complicada por uma variedade de fatores. Equipes civis de emergência geralmente não possuem equipamentos de proteção e detecção nem são treinadas especificamente para a resposta a este tipo de incidente. No caso específico de agentes biológicos, a identificação de um ataque é complicada pela inexistência de detectores com desempenho satisfatório e pelo período de incubação da doença, que dificulta a determinação da origem do ataque. Além



disso, nem sempre é possível distinguir entre um ataque biológico e uma epidemia natural (FRANÇA et al., 2008b).

Desde a década de 1950, os Estados Unidos da América (PARKINSON; RAJIC; JENSON, 2003), a Rússia e as potências europeias possuem programas de defesa biológica envolvidos em pesquisas, com o objetivo de desenvolver medidas defensivas contra ataques desse tipo. Todos os anos, o governo dos EUA gasta centenas de milhões de dólares em seus programas de biodefesa, com o objetivo de preparar o país para um ataque biológico que eles têm certeza de que não tardará a acontecer (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005).

No Brasil, a pesquisa em defesa biológica ainda está em seu estágio inicial. Em termos de unidade de pronto emprego para resposta a ataques biológicos o país dispõe apenas da Companhia de Defesa Química, Biológica e Nuclear (Cia Def QBN), instalada na Escola de Instrução Especializada (EsIE) do Exército Brasileiro, localizada no Rio de Janeiro (FRANÇA et al., 2008b).

### **2.3 Brucelose**

Infeções causadas por bactéria constituem uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (JOSEPH et al., 2010; PAYNE et al., 2007; TSOLIS et al., 2008). As bactérias pertencentes ao gênero *Brucella* são pequenos cocobacilos gram-negativos (ABDO et al., 2007) não capsulados, sem capacidade de locomoção e de formar esporos, parasitas intracelulares facultativos (PESSEGUEIRO; BARATA; CORREIA, 2003). Essas bactérias são capazes de causar a doença conhecida como brucelose ou febre de Malta (GODFROID et al., 2005; GORVEL, 2008; GUERRA, 2007; VULLO et al., 2010; WHATMORE, 2009). A brucelose é uma zoonose (OLUKMAN, 2008) que continua sendo um grande problema na saúde pública em todo mundo, especialmente na região do Mediterrâneo e em países em desenvolvimento

(COLMENERO et al., 1996; HASANJANI-ROUSHAN et al., 2010; YOUNG, 1995a).

A doença em humanos é causada por qualquer uma das quatro espécies do gênero *Brucella*: *B. melitensis*, que é encontrada principalmente em caprinos e ovinos e é a mais comum em crianças; *B. abortus*, encontrada em bovinos; *B. suis*, comum em suínos e *B. canis* encontrada em cães (CARRERA et al., 2006; YOUNG et al., 2004).

A transmissão da brucelose se dá através do contato direto com animais infectados e do consumo de produtos contaminados, tais como leite não pasteurizado e seus derivados (GLASGOW, 1976; MICHELI; IRELAND, 1987; OZGOCMENET et al., 2003; YOUNG, 1995b), ou inalação de partículas de aerossóis contendo fragmento bacteriano (CUTLER; WHATMORE; COMMANDER, 2005; GODFROID et al., 2005; MELLO et al., 2007; SALATA, 2003). A transmissão da doença entre pessoas é bastante rara, porém há casos na literatura de transmissão por meio de transfusão de sangue, transplante de medula e até por relação sexual. Existem casos em que a infecção pode ocorrer durante o parto ou após o parto pelo leite materno (CARRERA et al., 2006; LUBANI et al., 1988).

Os sintomas da doença são heterogêneos e começam geralmente, pelo menos, duas semanas após o contágio (CARRERA et al., 2006) e na maioria das vezes é difícil de se diagnosticar (TURUNÇ et al., 2008). As principais manifestações clínicas são febre (AL-TAWFIQ, 2006), acompanhada por calafrios, cefaléia, artralgia, mialgias, suor, dor nas costas, mal estar e fadiga (AYGEN et al., 2002; COLMENERO et al., 1996; GUR et al., 2003; TURUNÇ et al., 2008). Geralmente o curso agudo da doença pode levar de 5 a 6 meses durante os quais a vítima sofre considerável perda de peso. Casos não tratados podem durar meses ou anos (brucelose crônica), geralmente com melhoras e recaídas (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005).

Quando indivíduos suscetíveis são contaminados por *Brucella*, a bactéria entra através da mucosa, é ingerida por fagócitos mononucleares, viaja até o sistema linfático de onde, então, se dissemina, via duto torácico e corrente sanguínea, dentro dos fagócitos mononucleares (PAULIN; FERREIRA NETO, 2008). Durante a disseminação, o paciente desenvolve febre, calafrios e fraqueza. Além disso, anomalias neuropsiquiátricas incluindo depressão e dificuldade de concentração são comuns (SPINK, 1950). Surto psicóticos podem ocorrer em casos mais raros. Focos da doença podem ocorrer em praticamente qualquer órgão, porque os fagócitos mononucleares são largamente distribuídos, mas tendem a se desenvolver em sítios onde o suprimento sanguíneo é particularmente rico.

Aproximadamente um terço dos pacientes humanos apresentam focos em vértebras e uma ou mais juntas, especialmente as sacroilíacas. A osteomielite vertebral causada por *Brucella*, que pode ser quase indistinguível clinicamente da tuberculose, tende a ocorrer em pacientes mais velhos (MELLO et al., 2007). Epididimite ou epididimoorquite ocorre em aproximadamente 1-2% dos homens infectados (COLMENERO, 1996). O envolvimento neurológico é relatado em 2-5% dos casos de brucelose. Embora raras, as complicações neurológicas são de grande importância clínica por causar graves morbidades e sequelas. O quadro clínico pode incluir meningite, encefalite, meningoencefalite, radiculite, mielite e neurite (MCCLEAN; RUSSEL; KHAN, 1992; THOMAS et al., 1993; TURUNÇ et al., 2008).

A *brucella*, há muito tempo, vem sendo considerada um potencial agente de guerra biológica (FRANCO et al., 2007; JOSEPH et al., 2010; PAPPAS et al., 2006a, 2006b). O potencial uso desta bactéria como arma biológica seria motivado pelo seu alto poder infectante, pela habilidade de incapacitar indivíduos infectados e a natureza altamente persistente da infecção em humanos (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005). Como um parasita

intracelular de fagócitos mononucleares, esse agente é capaz de escapar com sucesso de muitas reações imunológicas do hospedeiro e é resistente à erradicação por agentes antimicrobianos. Essas duas características aumentam a necessidade de estratégias efetivas de proteção contra a infecção e criam desafios ao desenvolvimento de vacinas e outras medidas contra este organismo (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005).

Há vacinas disponíveis em muitos países, mas são de eficácia não comprovada (LINDLER; LEBEDA; KORCH, 2005). O tratamento da brucelose humana se baseia na combinação do antibiótico doxiciclina com estreptomicina ou com rifampicina (TURUNÇ et al., 2008). Porém, já há relatos de casos de resistência a estes medicamentos (HASANJANI-ROUSHAN et al., 2010). Esses fatos, aliados ao risco cada vez mais real do surgimento de cepas de *Brucella* geneticamente modificadas, para as quais não haveria quimioterapia disponível, torna necessária a descoberta de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da brucelose (GUIMARÃES et al., 2011b).

A busca de novos agentes mais eficazes e seletivos contra a brucelose visa não somente reduzir os efeitos adversos e o número de doses e/ou tempo de tratamento, mas principalmente atender aos pacientes com elevada resistência aos medicamentos. Esta busca pode ser classificada em três categorias (PATRICK, 2003): 1) O rejuvenescimento de fármacos, através de triagem de fármacos já existentes – uma tendência mundial; 2) O desenvolvimento de novos fármacos a partir de moléculas antigas e 3) A produção de novas classes de fármacos focados em alvos bioquímicos ainda não explorados.

#### **2.4 As Nucleosídeo hidrolases**

As Nucleosídeo Hidrolases são enzimas largamente distribuídas na natureza e já foram encontradas em bactérias (OGAWA et al., 2001;

PETERSEN; MOLLER, 2001), fungos (KURTZ et al., 2002), protozoários (CUI; RAJASEKARIAH; MARTIN, 2001) e insetos (RIBEIRO; VALENZUELA, 2003). Seus genes estão presentes em plantas, anfíbios e peixes, mas ainda não foram detectados em mamíferos (GUIMARÃES et al., 2011a; VERSÉES; STEYAERT, 2003). Este fato torna a NH um alvo molecular ideal para o planejamento de inibidores seletivos contra infecções parasitárias e bacterianas (FRANÇA et al., 2008a).

Estas enzimas fazem parte de uma super família de metaloproteínas, estruturalmente relacionadas, com uma topologia original de folhas beta (MURZIN et al., 1995; ORENCO et al., 1997). As NHs estudadas até hoje são homodímeros, como, por exemplo, a NH Inosina, Adenina, Guanina específica de *Trypanosoma vivax* (Tv-IAGNH) (VERSÉES et al., 2001) ou homotetrâmeros, como, por exemplo, as NHs Inosina, Uridina não específicas de *Leishmania major*, *Chitidia fasciculata* e de *Leishmania donovani* (Lm-IUNH, Cf-IUNH e Ld-IUNH) (CUI; RAJASEKARIAH; MARTIN, 2001; DEGANO et al., 1998; SHI; SCHRAMM; ALMO, 1999). Essas enzimas apresentam grandes similaridades nas sequências de aminoácidos do sítio ativo, o que indica que elas são intimamente relacionadas em estrutura e mecanismo catalítico. O sítio ativo é estreito, profundo e fortemente ligado ao íon  $Ca^{2+}$  (DEGANO et al., 1998; VERSÉES et al., 2001; VERSÉES; STEYAERT, 2003). Devido à grande similaridade entre os sítios ativos, é bem provável que inibidores de uma NH sejam ativos contra NHs de muitas outras espécies (FRANÇA et al., 2008a).

As NHs são divididas pela especificidade com os substratos (VERSÉES; STEYAERT, 2003). As NHs não específicas catalisam a hidrólise de nucleosídeos purina e pirimidina e preferem os substratos inosina-uridina (IU-NH). Em contraste, as NHs específicas preferem os substratos purínicos inosina-adenosina-guanosina (IAG-NH) e são catalisadores fracos para pirimidina

(ESTUPIÑÁN; SCHRAMM, 1994; PARKIN, 1996; PARKIN et al., 1991; ROCHA, 2005).

A *Cf*-IUNH, que é uma NH do tipo não específica, pode ser utilizada como modelo para o estudo das NHs. A estrutura dessa enzima complexada com o *p*-aminofenil-(1*S*)-iminoribitol (*p*APIR) obtida por cristalografia (DEGANO et al., 1996) revela fatores importantes que corroboram a importância da ativação do grupo ribosil nas NHs (Figura 1): (1) o ancoramento da hidroxila-5' em uma orientação ótima para a formação do íon carbênio, (2) a quelação direta de ambas as hidroxilas (2' e 3') com o  $\text{Ca}^{2+}$  ligado aos resíduos do sítio ativo em uma geometria favorável à estabilização do íon oxocarbênio e (3) a ligação hidrogênio imino a grupos enzimáticos que podem estabilizar eletrostaticamente o estado de transição do íon oxobarbênio (MILES et al., 1999; ROCHA, 2005).

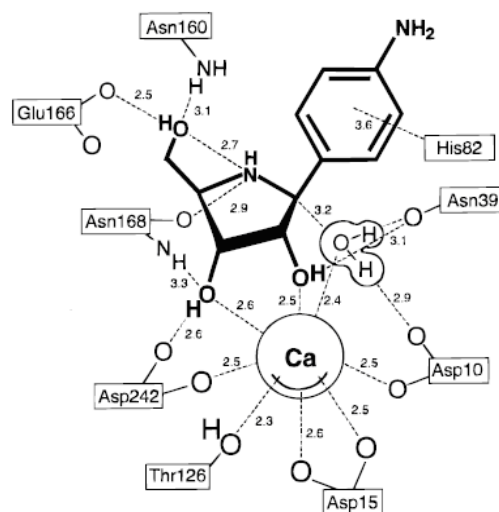


Figura 1 Esquema das interações no sítio ativo da enzima IU-*Cf*NH complexada com o *p*APIR (PDB-2MAS).

Fonte Miles et al. (1999)

### 2.4.1 Recuperação de purinas

Uma característica que distingue um parasita do seu hospedeiro humano é a sua incapacidade de sintetizar purinas, que são necessárias para o seu crescimento, pela via “*de novo*” (GARIN et al., 2001). Sendo assim, o parasita depende da via de recuperação de purinas para sobreviver. Esta recuperação é feita através da NH, que é responsável pela hidrólise de ligações N-ribosídicas de nucleosídeos purina (adenosina, guanosina, inosina, xantosina) e/ou pirimidina (citidina, uridina, timidina), com posterior liberação de bases púricas e/ou pirimídicas (Figura 2) (MILES et al., 1999). Logo, a inibição desta enzima interromperá a rota de recuperação (“*salvage*”) das purinas no parasita causando, conseqüentemente, a sua morte. É por esse motivo que as NHs têm sido extensivamente estudadas como potenciais alvos para intervenção quimioterápica (CUI; RAJASEKARIAH; MARTIN, 2001; GOPAUL, 1996; PARKIN; SCHRAMM, 1995; SANTANA et al., 2002; SHI et al., 1999; VERSÉES; STEYAERT, 2003). Especificamente neste trabalho, esta enzima foi proposta como um potencial alvo para o planejamento de novos candidatos a fármacos contra a brucelose.

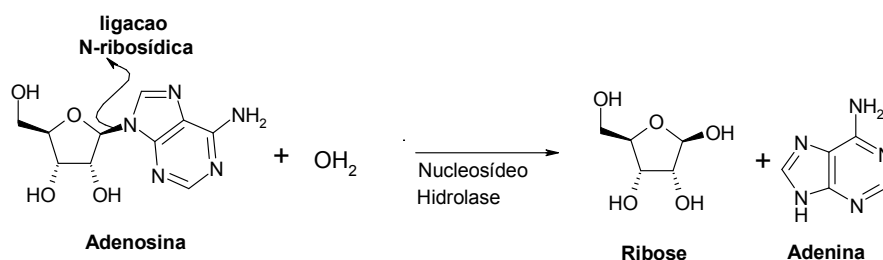


Figura 2 Esquema da reação catalisada pela enzima Nucleosídeo Hidrolase (como exemplo foi apresentado a adenosina como nucleosídeo purina).  
Fonte Miles et al. (1999)

## 2.5 Métodos computacionais

O desenho racional de fármacos é usualmente baseado na exploração estrutural de diferenças fisiológicas entre o patógeno e o hospedeiro. A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Essas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (CARVALHO et al., 2003). Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos; os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura, fornecendo uma molécula sob nova perspectiva (CARVALHO et al., 2003). O ponto de partida para esse tipo de estudo é a estrutura tridimensional do alvo molecular escolhido que nem sempre é conhecida. Nestes casos, há a possibilidade de se construir um modelo através de métodos computacionais como a modelagem por homologia.

### 2.5.1 Modelagem por homologia

Atualmente, a ferramenta mais utilizada para a predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa (SANTOS FILHO, 2000; SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003; THORNTON; SWINDELLS, 1993). A construção de modelos por modelagem por homologia se baseia no fato que o mecanismo de duplicação de genes, associado às mutações, leva a divergências moleculares e assim formam-se as famílias de proteínas estruturalmente relacionadas (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003). Proteínas derivadas de um ancestral



comum são ditas homólogas (HÖLTJE; FOLKERS, 1997; SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

A modelagem de uma proteína (proteína-problema) pelo método da homologia baseia-se no conceito de evolução molecular. Isto é, parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteínas-molde) implica em similaridade estrutural entre elas. Por exemplo, homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- $\alpha$  e fitas- $\beta$ ); as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“*loops*”), que ligam os elementos de estruturas secundárias (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

A modelagem molecular comparativa tem o potencial para gerar modelos confiáveis. A condição necessária é que a semelhança entre a sequência da proteína alvo e da proteína molde seja maior que 25% e que o alinhamento correto entre elas possa ser construído (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

O protocolo para construção de modelos por modelagem por homologia, hoje em dia, envolve as seguintes etapas: (1) identificação do molde e alinhamento de sequências de aminoácidos, (2) geração das coordenadas do modelo (PEITSCH, 1995, 1996; SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003), (3) otimização (JENSEN, 1999; LEACH, 2001) e (4) validação do modelo (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968).

A identificação do molde é a busca em bancos de dados pelas sequências mais similares à sequência a ser modelada que possuam estrutura tridimensional conhecida (molde). Esta busca pelo(s) molde(s) é feita no principal banco de dados de estruturas terciárias de proteínas, conhecido como PDB (BERMAN et

al., 2000). Após a identificação do(s) molde(s), é realizado o alinhamento. O alinhamento é uma etapa muito importante, pois, a partir dele é possível se identificar a equivalência dos resíduos existentes entre as sequência alvo e molde(s), tendo por objetivo medir a similaridade entre elas (SOUZA, 2008).

Feito o alinhamento, constrói-se o modelo do esqueleto protéico baseado na(s) disposição(es) tridimensional(is) dos esqueletos dos moldes; complementa-se as regiões que possuam gaps, substituindo-as por segmentos de tamanho apropriado; adiciona-se as cadeias laterais com a otimização de suas posições e, por fim, otimiza-se o modelo inteiro. As interações desfavoráveis entre átomos não-ligados, bem como as energias de ângulos torcionais e de ligação são minimizadas por meio de cálculos da mecânica molecular (LEACH, 1996; SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

A última etapa do processo de modelagem comparativa de proteínas consiste na análise da confiabilidade da estrutura gerada. Ou seja, é necessário validar o sistema obtido, a fim de checar a sua qualidade estereoquímica.

Um importante indicador da qualidade estereoquímica de uma proteína é a distribuição dos ângulos torcionais  $\Phi$  e  $\Psi$  da cadeia principal. A distribuição de todos os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  pode ser examinada através do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968). A partir da análise de dados cristalográficos de um conjunto enorme de proteínas (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968), mapearam regiões para os valores dos ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  para resíduos de aminoácidos que seriam aceitáveis para a composição tridimensional da proteína, além de poder identificar regiões correspondentes referentes a estruturas secundárias.

Se a proteína apresentar resíduos de aminoácidos com problemas estereoquímicos, eles estarão em regiões não-permitidas do gráfico de Ramachandran. A porcentagem de resíduos que ocupam regiões favoráveis do gráfico de Ramachandran é uma das melhores maneiras de avaliar a qualidade

estereoquímica de um modelo de proteína (HÖLTJE; FOLKERS, 1997). Um modelo ideal deve apresentar mais de 90% de resíduos nessas regiões (JOHNSON et al., 1994).

Uma vez conhecida a estrutura tridimensional do alvo molecular, pode-se realizar os estudos das interações desse alvo molecular com potenciais ligantes de forma a subsidiar o planejamento de fármacos. Estes estudos podem ser realizados pelos métodos da mecânica molecular através de técnicas de ancoramento e dinâmica molecular.

### **2.5.2 Mecânica molecular**

Os métodos baseados na Mecânica Molecular (MM) utilizam as leis da física clássica para prever propriedades estruturais e moleculares. Este tipo de cálculo ignora os movimentos dos elétrons e calcula a energia de um sistema como uma função apenas das posições nucleares. Isso torna a MM um método adequado para lidar com sistemas contendo um número grande de átomos, como por exemplo, proteínas (FRANÇA, 2004; HIGGINS; TAYLOR, 2001).

O conjunto de equações empíricas e parâmetros usados em cada esquema da MM é chamado de campo de forças. Cada campo de forças é parametrizado para um tipo específico de sistema. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de forças mais utilizados são CHARMM (BROOKS et al., 1983; MACKERELL et al., 1998; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), GROMOS (GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987; GUNSTEREN et al., 1996; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), AMBER (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; WEINER et al., 1984, 1986), OPLS (JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008) e CVFF (HAGLER et al., 1974; HAGLER; HULER; LIFSON, 1979; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

A maioria dos campos de forças é composta por um simples conjunto de quatro componentes que correspondem às forças intra e intermoleculares do sistema (FRANÇA, 2004), ou seja, os campos de forças são descritos como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de Van der Waals e de Coulomb) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Um típico campo de forças pode ser descrito pela equação 1.

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

**Equação 1**

Em que:

$U(\mathbf{r}^N)$  é a energia potencial total, que é uma função das posições ( $\mathbf{r}$ ) de  $N$  partículas (normalmente átomos). O primeiro termo modela as interações entre pares de átomos ligados, modelados aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento  $r_i$  desvia do valor de referência  $r_{i,0}$ . O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A-B-C) na molécula, novamente modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo não ligado. Este é calculado entre todos os pares de átomos ( $i$  e  $j$ ) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas separados por no mínimo 03 ligações.

Em um campo de forças simples o termo não ligado é usualmente modelado usando um termo de potencial de Coulomb para interações eletrostáticas e um termo de potencial de Lennard-Jones para as interações de *van der Waals*, como representado na equação 1.

### 2.5.2.1 Ancoramento molecular (docking)

O processo de ancoramento molecular envolve a predição da conformação do ligante e sua orientação dentro do sítio de interação da proteína.

Para entender o mecanismo de interação de um fármaco, é essencial saber o posicionamento tridimensional para a sua interação molecular com a proteína alvo. A predição da geometria e da energia de interação é de grande interesse para o planejamento de novos medicamentos (IWATA et al., 2000). Uma das conformações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios-X de cristais do complexo ou RMN, mas não é fácil obter dados experimentais de todos os inibidores de interesse. A simulação computacional do ancoramento molecular (“*docking*”) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e o ligante nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (GUIMARÃES, 2010; SILVEIRA, 2003). Esse tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula essa estabilidade relativa.

Os valores da função utilizada no ancoramento (*Docking Scoring Function*),  $E_{score}$ , são definidos pela Eq. 2

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra}$$

**Equação 2**

Em que, o termo  $E_{inter}$ , que corresponde a energia de interação ligante-proteína, é definido de acordo com a Eq. 3.

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[ E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$

**Equação 3**

O primeiro termo  $E_{PLP}$  representado na Eq.3 é um termo de energia potencial inibidor por partes que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos, e outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ( $D(r) = 4r$ ). O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática para  $\text{kcal mol}^{-1}$  (RAMALHO et al., 2009; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O termo  $E_{intra}$  que corresponde a energia interna do ligante é definido de acordo com a Eq. 4.

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{penalizada}$$

#### Equação 4

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à energia de torção, em que  $\theta$  é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se diversas torções são determinadas. O último termo,  $E_{penalizada}$  (termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Em resumo, essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína).

A técnica de ancoramento molecular encontra uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade

conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados, eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é muito grande (MIZUTANI et al., 1994).

### 2.5.2.2 Dinâmica molecular

Os cálculos de dinâmica molecular (DM) são fundamentados nos princípios da Mecânica Clássica e fornecem informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKERT; ALLINGER, 1982; HÖLTJE et al., 2003; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

A DM pode ser empregada tanto para sistemas com elétrons, átomos, quanto para sistemas macromoleculares (GONÇALVES, 2009; TUCKERMAN; MARTYNA, 2000). Quando se trata de sistemas biomoleculares, utilizam-se cálculos da mecânica clássica, porém, quando o sistema envolve problemas como reações químicas, são empregados termos quânticos (FRANÇA, 2004; KARPLUS; PETSKO, 1990).

Os cálculos de DM consistem da solução numérica, passo a passo, da equação de movimento de Newton, que pode ser descrita para um sistema atômico simples pelas Equações 5 e 6.

$$F_i(t) = m_i a_i \quad \text{Equação 5}$$

$$F_i(t) = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad \text{Equação 6}$$

Onde  $F_i$  representa a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo  $t$ , e  $a_i$  é a aceleração do átomo  $i$  de massa  $m_i$  (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Quando já se define o campo de forças, é possível determinar a força que atua sobre cada átomo, calculando-se a primeira derivada da energia potencial obtida do campo de forças escolhido com relação à posição dos núcleos (Equação 6) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Essas equações são resolvidas simultaneamente em um pequeno espaço de tempo, com isso se tem a trajetória de cada átomo do sistema com relação ao tempo.

Existem algumas condições iniciais que são essenciais para simulações de DM. Por exemplo, para se realizar um cálculo de DM é importante especificar as posições iniciais das partículas que compõem o sistema, geralmente elas são situadas na posição de uma rede cristalina, para evitar sobreposições indesejáveis entre elas (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). O sistema é montado dentro de uma caixa que pode adotar diferentes geometrias, mas, geralmente, se utiliza uma caixa cúbica. No caso de sistemas biomoleculares são adicionadas moléculas de águas dentro do sistema, e na caixa é aplicado o modelo de condição periódica de contorno, evitando que as moléculas de água escapem do meio (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Antes de se iniciar as simulações de DM, o sistema deve ser minimizado a fim de se evitar maus contatos entre os átomos (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). A minimização ou otimização do sistema é feita a fim de se obter uma energia próxima do mínimo local. Os algoritmos de minimização mais utilizados são: o método do máximo declive (*steepest descent*), o método dos gradientes conjugados e o método quasi Newton Raphson.



#### **2.5.2.2.1 Método do máximo declive**

O método do máximo declive (FRANÇA, 2004; WIBERG, 1965) é um método de primeira derivada que converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. De um modo geral, com este algoritmo é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de RMN ou por modelagem comparativa (FRANÇA, 2004).

#### **2.5.2.2.2 Método dos gradientes conjugados**

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método, denominado “gradientes conjugados” permite em geral uma convergência mais rápida que o método do máximo declive que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. O método dos gradientes conjugados utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior (FRANÇA, 2004).

#### **2.5.2.2.3 Método quasi Newton-Raphson**

O método Newton-Raphson utiliza tanto as derivadas primeiras quanto as derivadas segunda da função. Assim, além de usar as informações do gradiente, utiliza a curvatura para prever onde a função mudará a direção ao longo do gradiente (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo principal propôr e estudar um novo alvo molecular contra o agente de guerra biológica *B. suis*. Os objetivos secundários foram divididos em quatro etapas:

1- Construir o modelo da estrutura tridimensional da enzima NH de *Brucella suis* (*BsNH*) usando a modelagem molecular por homologia;

2- Estudar o modo de interação entre a *BsNH* e alguns potenciais inibidores de NHs, através da técnica de ancoramento molecular (*docking*);

3- Estudar o comportamento destes inibidores no sítio ativo da *BsNH*, através de cálculos de dinâmica molecular, comparando os resultados com o estudo de *docking* de forma a estabelecer quais dentre esses inibidores poderiam eventualmente ser inibidores da *BsNH*, bem como também estabelecer as características estruturais essenciais de um bom inibidor de *BsNH*;

4- Analisar o modo de interação entre a *CjNH* e estes inibidores, através da técnica de ancoramento molecular e estudos de dinâmica molecular, a fim de validar o protocolo utilizado.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Modelagem por homologia da nucleosídeo hidrolase de *Brucella suis*

A modelagem por homologia da *BsNH* foi realizada de acordo com os itens que se seguem.

#### 4.1.1 Construção do modelo

A modelagem iniciou-se com a procura sistemática de moldes adequados em um banco de dados, Expasy (<http://au.expasy.org/>), de estruturas primárias de proteínas utilizando o servidor BLAST (ALTSCHUL et al., 1990; BERMAN et al., 2000) como ferramenta de busca. A sequência molde selecionada foi a NH específica de *Escherichia coli* (*EcNH*), cuja estrutura tridimensional correspondente foi obtida do Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) (código: 1YOE), com resolução de 1,78 Å e fator R = 0,193. A escolha desta enzima como molde se baseou no fato dela possuir uma maior porcentagem de identidade sequencial (45,1%) com a *BsNH*, ou seja, é a enzima sequencialmente mais similar a *BsNH* em comparação com as outras NHs disponíveis no PDB.

Uma vez definido o molde, realizou-se o alinhamento da sequência monomérica alvo (*BsNH*), obtida previamente em formato FASTA (Figura 3) a partir do site Expasy (<http://au.expasy.org/>), com a sequência monomérica da enzima molde (*EcNH*).

Finalmente, a modelagem do monômero da *BsNH*, foi feita utilizando o servidor *SWISS-MODEL* e o programa *Swiss-PdbViewer* (GUEX, 1997) conforme procedimento descrito no Apêndice A. Fez-se, então, a sobreposição

das estruturas alvo (*BsNH*) e molde (1YOE) no *Swiss-PdbViewer* e calculou-se o desvio da raiz média quadrática (DRMQ).

```
>tr|Q8FMQ9 (EC 3.2.2.1) nucleoside hydrolase Brucella suis
MLSKHAVSCAIPSQRTHQETTMARKI I IDTDPGQDDAVAILLALASPELDIILGITAVAGN
GPLARTEVNA RTVCEVAKKPDTKVFAGSIRPLVRPLVTAENVHGKTGLDGYDL PAPT MPL
QAQHGVDFI IETLMKEE PGTVTLCPIGPLINIASALIREPKIAGRVKEIVLMGGGYFEGG
NITPSAEFNIYVDPHAASVVFSSGIKIMLPLDVT HKVLTTEKRIAAIRNIGSHVGEVVA
AWLEFFERYDEAKYGTDCAPLHDPNVIA YLIKPELYSGRACNVEIEINSELTIGETVVDW
WEVTD RPKNAFFIKDVDADGFFSLTERLATL
```

Figura 3 Sequência monomérica da *BsNH* no formato FASTA.  
Fonte (<http://au.expasy.org/>)

#### 4.1.2 Validação do modelo

A validação do modelo gerado (*BsNH*) foi realizada no site PDB, onde foram feitos todos os teste previstos no programa. Dentre todos estes testes (Apêndice A.1), neste trabalho, nós utilizamos como exemplo o gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAM; SASISEKHARAN, 1968), onde foi possível se avaliar a distribuição dos ângulos torcionais da cadeia principal  $\Phi$  e  $\psi$ , responsáveis pela qualidade estereoquímica da proteína.

#### 4.1.3 Construção do complexo (enzima-ribose-cofator)

A montagem do complexo (enzima-ribose-cofator), após a construção do modelo, foi realizada através da sobreposição, utilizando o programa *Swiss-PdbViewer* (GUEX, 1997) do modelo ao cristal de *EcNH* complexado com a ribose e o cofator cálcio (Figura 5). Neste procedimento, as coordenadas da ribose e do cofator da estrutura cristalina no formato .pdb são copiadas para o arquivo .pdb do modelo, formando o complexo (modelo-ribose-cofator).

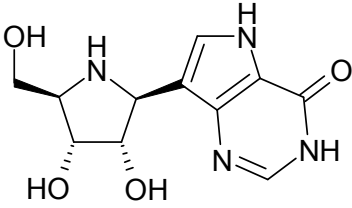
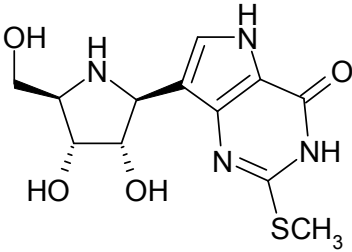
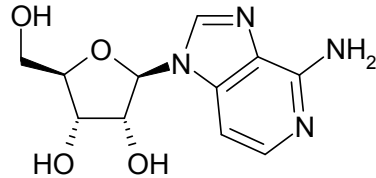
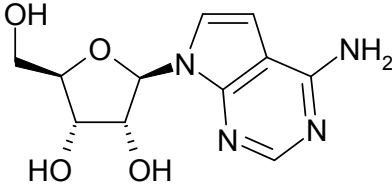
#### 4.2 Comparação do sítio da enzima modelo (*BsNH*) com o sítio ativo da enzima nucleosídeo hidrolase de *C. fasciculata*

Foi realizada a sobreposição da enzima *BsNH* com a *CfNH* (código no PDB 2MAS), utilizando o programa *Swiss-PdbViewer* (GUEX, 1997), tendo como objetivo a comparação entre os resíduos dos sítios ativos de ambas as enzimas e a determinação do grau de identidade entre os mesmos. As coordenadas das enzimas sobrepostas foram copiadas para um único arquivo .pdb para avaliação, por meio do programa *Molegro Virtual Docker* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), dos resíduos dentro de uma distância de 11Å dos ligantes ativos em ambas as enzimas. Em seguida, foi feita uma análise se os resíduos do sítio ativo da *CfNH* conhecidos da literatura (MILES et al., 1999) correspondiam aos mesmos resíduos do sítio ativo da *BsNH*. Determinando assim, o grau de identidade entre os resíduos de aminoácidos dos sítios ativos.

#### 4.3 Dados biológicos

Na Tabela 1 estão relacionados os quatro potenciais inibidores de NH escolhidos para serem estudados neste trabalho e seus respectivos valores de constantes de inibição ( $K_i$ ). Estes inibidores foram testados e avaliados por Miles et al. (1999). É importante ressaltar que os valores de constante de inibição ( $K_i$ ) foram determinados para a *CfNH*.

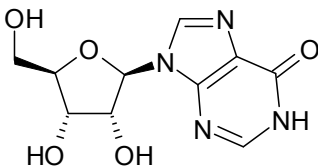
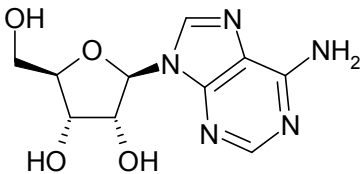
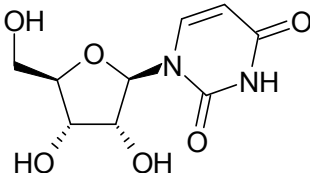
Tabela 1 Inibidores de NH e seus respectivos valores de constante de inibição para CjNH

Inibidores	Estrutura	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
1		0,042
2		0,23
3		8,6
4		2300

Fonte Mille et al. (1999)

Além dos inibidores descritos na Tabela 1, também foram estudadas a inosina, a uridina e a adenosina, que são substratos naturais das NHs, como referência para a avaliação dos resultados obtidos com os inibidores da Tabela 1. As estruturas dessas moléculas, bem como os seus respectivos valores de constantes de afinidade com a  $CfNH$  ( $K_M$ , constante de Michaelis-Menten) obtidos por Horenstein et al. (1991) e Versées et al. (2001), são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Substratos das NHs que foram estudados no presente trabalho e seus respectivos valores de  $K_M$  para  $CfNH$

Substratos	$K_M(\mu M)$
 <p style="text-align: center;"><b>Inosina</b></p>	380
 <p style="text-align: center;"><b>Adenosina</b></p>	460
 <p style="text-align: center;"><b>Uridina</b></p>	1220

Fonte Horenstein et al. (1991); Versées et al., (2001)

#### 4.4 Estudo por ancoramento molecular (*docking*)

O programa utilizado para o ancoramento molecular foi o *Molegro Virtual Docker (MVD)* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), um programa que permite determinar a conformação mais provável do ligante na enzima. A identificação da conformação do ligante é feita através da avaliação de diversos candidatos (conformações dos ligantes) estimando as energias de suas interações com a enzima (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

As estruturas tridimensionais dos inibidores e dos substratos naturais foram construídas por meio do programa *PC Spartan Pro* e suas cargas parciais atômicas foram calculadas utilizando o método semi-empírico AM1. Esse procedimento é necessário para obter a conformação inicial dos inibidores, importante para o estudo de ancoramento molecular.

Após a construção das estruturas 3D dos inibidores e dos substratos naturais, eles foram transferidos para o programa *MVD*, onde cada ligante foi ancorado nos sítios ativos da *BsNH* e da *CfNH*. Nesta etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativa avaliando um número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estimando a energia de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional (CAETANO, 2007).

Para melhores resultados consideramos como flexíveis os resíduos a 11Å do ligante, durante o ancoramento, para as enzimas nativas. A conformação de cada inibidor foi selecionada usando seu maior grau de similaridade espacial com a ribose e o *pAPIR* complexados com a *BsNH* e *CfNH*, respectivamente obtidas do PDB, que foi representada pela energia de interação entre a posição do ligante e as respectivas proteínas (SIPPL; ROGNAN; FOLKERS, 2003).



#### 4.5 Dinâmica molecular

Para a realização dos estudos por dinâmica molecular, primeiramente foi necessária a parametrização dos arquivos.pdb dos ligantes, para que estes pudessem ser reconhecidos pelo campo de forças GROMOS 96 do programa GROMACS 4.0 (SPOEL et al., 2001), que foi utilizado para a otimização e a dinâmica molecular. A parametrização foi feita no site <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/prodrgr.html> (AALTEN et al., 1996), segundo o procedimento descrito no Apêndice B. As moléculas parametrizadas tiveram as distribuições de cargas de seus átomos calculadas pelo método chelpg por meio do programa Gaussian 98 (FRISCH et al., 2001), aplicando o algoritmo Hartree-Fock na base 6-31G (d, p). Após parametrização e correção das cargas dos inibidores, os complexos enzima/ $\text{Ca}^{2+}$ /ligantes estavam prontos para as etapas de otimização e dinâmica molecular.

Para os dois complexos *BsNH*/ $\text{Ca}^{2+}$ /ligantes e *CjNH*/ $\text{Ca}^{2+}$ /ligantes, foram simuladas, utilizando-se o pacote GROMACS 4.0, caixas cúbicas de, aproximadamente,  $364,885 \text{ nm}^3$ , contendo em torno de 10.600 moléculas de água. Esses sistemas foram minimizados utilizando-se o campo de força GROMOS 96, implementado no pacote computacional GROMACS 4.0 (SPOEL et al., 2001).

Os algoritmos de minimização empregados foram: 1) máximo declive com restrição de posição dos ligantes com critério de convergência de 100 kcal/mol Å; 2) steepest descent sem restrição de posição (st) até 5 kcal/mol Å; 3) gradientes conjugados até 2 kcal/mol Å e, por fim, quasi Newton rapsom (l-bgps) até 1 kcal/mol Å. Os complexos minimizados foram, então, submetidos à DM em duas etapas. Inicialmente, 500 ps de dinâmica a 300 K com restrição de posições para todo o sistema, exceto as moléculas de água, com o objetivo de garantir o equilíbrio das moléculas do solvente em torno dos resíduos da

proteína. Posteriormente, 10000 ps a 300 K sem qualquer restrição, aplicando 2 fs de tempo de integração e um raio de corte de 10 Å para interações de longa distância. No total, 500 conformações foram obtidas durante essa simulação. Nesta etapa, as listas de pares (pairlists) foram atualizadas a cada 500 passos, a todos os resíduos Lis e Arg foram atribuídas cargas positivas e aos resíduos Glu e Asp foram atribuídas cargas negativas.

Os procedimentos para a geração dos arquivos de entrada e a execução da otimização e dinâmica de proteínas utilizando o pacote GROMACS 4.0 (SPOEL et al., 2001) estão descritos em detalhes no Apêndice C.

Após a dinâmica molecular, foram gerados e analisados, para cada sistema, os gráficos de energia total, de desvio padrão temporal e espacial e ligações hidrogênio formadas e mantidas ao longo das dinâmicas. Também foram extraídos quadros a intervalos definidos ao longo das dinâmicas, para analisar e comparar o comportamento dinâmico de cada ligante em cada sítio ativo.

#### **4.6 Análise de estruturas e obtenção de figuras e gráficos**

Para analisar as estruturas geradas após os cálculos de otimização e dinâmica molecular, foram utilizados os programas VMD (CADDIGAN et al., 2004) e Swiss-PDBviewer (GUEX et al., 1997). Os gráficos de variação de energia total, da variação do DRMQ e das ligações hidrogênio formadas ao longo da dinâmica foram gerados com o programa origin (EDWARDS, 2002). Os gráficos em tubos que ilustram o comportamento das enzimas após dinâmica, foram gerados no programa Molmol (KORADI; BILLETER; WÜTHRICH, 1996) e as figuras com os quadros da dinâmica molecular foram gerados no programa PYMOL (WARREN, 2004).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Modelagem por homologia

Na primeira etapa deste trabalho, a sequência monomérica primária da *BsNH* foi alinhada à sequência primária monomérica da *EcNH* (*E. coli* – Código: 1YOE), utilizando o servidor BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Com o resultado do alinhamento (Figura 4), foi possível observar que a *BsNH* apresenta 45,1% de identidade sequencial com a enzima mencionada acima. Este é um bom resultado, já que de acordo com a literatura uma identidade sequencial acima de 25% entre a enzima molde e a enzima alvo é considerada satisfatória para a construção de modelos por homologia (SANTOS FILHO; ALENCASTRO, 2003).

```

      10      20      30      40      50      60
EcNH  ALPILLDCPPGHDDAIAIVLALASPELDVKAITSSAGHQTPKTLRNVLRMLTLLNRTDI
      :  :... :...:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:
BsNH  ARKIIIDTDPGQDDAVAILLALASPELDILGITAVAGNGPLARTEVNMARTVCEVAKKPD
      30      40      50      60      70      80
      70      80      90      100     110     120
EcNH  PVAGGAVKPLMRELIADNVHGESGLDGPALPEPTFAPONCTAVELMAKTL-RESAEPVT
      :  :...:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:
BsNH  KVFAGSIRPLVRPLVTAENVHGKGLDGYDLPAPTNPLQAQHGVDIIEITLHKEEPTVT
      90      100     110     120     130     140
      130     140     150     160     170     180
EcNH  IVSTGPQTHVALLLNSHPHELHAKIARIVINGGANGLG-NWTPAAEFNIYVDPFAAEIVFQ
      :  :...:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:
BsNH  LCPIGPLTHIASALIREPKIAGRVKEIVLNGGGYFEGGNIIPSAEFNIYVDPFAASVVF
      150     160     170     180     190     200
      190     200     210     220     230     240
EcNH  SGIPVVMAGLDVTHKAQIHVEDTERFRAIGNPVSTIVAELLDFFLEYHKDEKNGFVVGAPL
      :: :.. :...:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:
BsNH  SGIKITMLPLDVTHKVLTTTEKRIAAIRNIGSHVGEVVAANLEFF-ERYDEAKYGTDGAPL
      210     220     230     240     250     260
      250     260     270     280     290     300
EcNH  HDPCTIANLLKPELFTSVERWVGVETQGGKYTQGMIVVDYVYLTGNKPNATVIVDQVDRQGF
      :: :...:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:
BsNH  HDPNVIAVLIKPELYSGRACNVEEINSELTIGETVVDWHEVTDPRKNNAFFIKDWDADGF
      270     280     290     300     310     320
      310
EcNH  VDLLADRL
      :...:..:
BsNH  FSLTERL

```

Figura 4 Alinhamento simples entre a *BsNH* e a *EcNH*. Os resíduos de aminoácidos em vermelho são idênticos, os resíduos em verde são semelhantes e os resíduos em preto não apresentam identidade significativa

Na Figura 5 está representada a estrutura tridimensional do monômero da *BsNH*, onde pode ser observado que a cadeia principal da enzima é composta por 9  $\alpha$ -hélices (representadas em vermelho) e 6 folhas- $\beta$  (representadas em azul) e nas extremidades estão os *loops* (representados em branco). A ribose (em amarelo) e o  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera cinza) foram adicionados ao sítio ativo da enzima para auxiliar nos cálculos de ancoramento molecular.

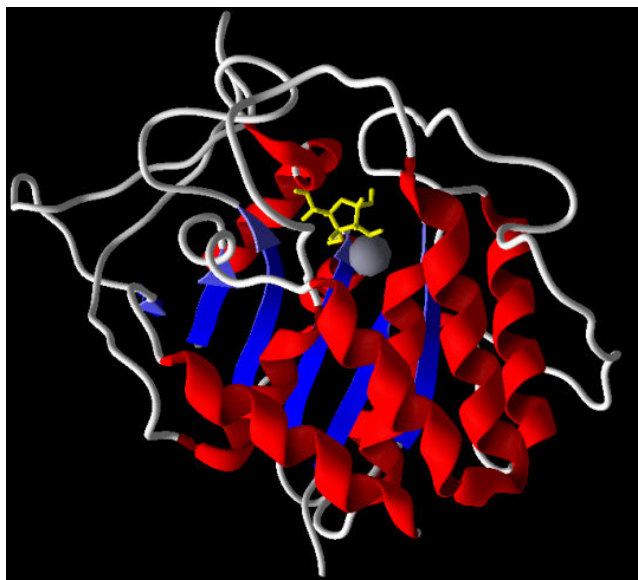
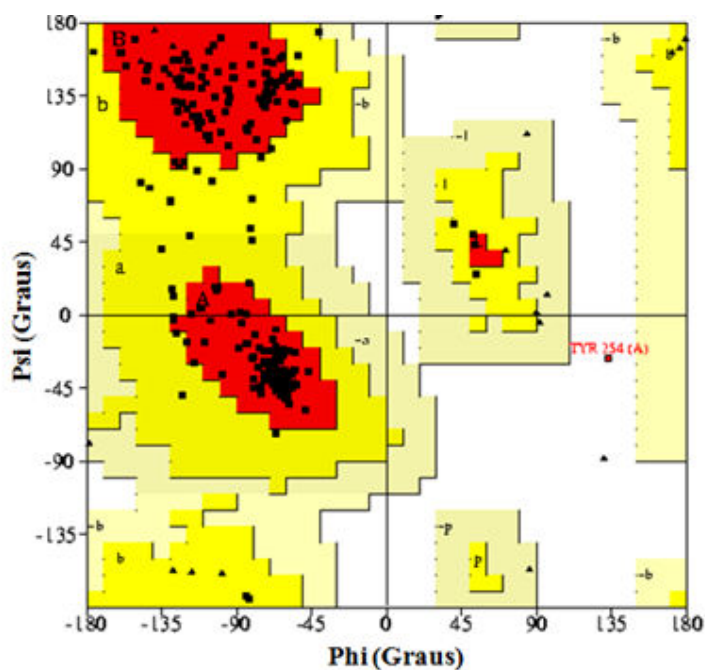


Figura 5 Modelo tridimensional da *BsNH*

### 5.1.1 Validação do modelo

O gráfico de Ramachandram (RAMACHANDRAM; SASISEKHARAN, 1968) obtido no site do PDB (Gráfico 1) para o modelo gerado para *BsNH*, apresentou 99,6% dos resíduos nas regiões favoráveis, o que é considerado muito bom para modelos gerados por homologia (LASKOWSKI et al., 1993). Em relação às propriedades da cadeia principal da enzima modelada, não foram encontrados contatos ruins nem distorções de carbonos alfa ou problemas envolvendo as energias de ligações de hidrogênio. Também não foram encontradas distorções dos ângulos de torção das cadeias laterais. Os resultados de todos os demais testes feitos no link para validação de estruturas

disponível no PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) foram compatíveis com os valores esperados para um bom modelo por homologia.



### Estadística

Resíduos nas regiões mais favorecidas (A,B,L)	225	90,4%
Resíduos nas regiões adicionalmente permitidas (a,b,l,p)	23	9,2%
Resíduos nas regiões generosamente permitidas (-a,-b,-l,-p)	0	0,0%
Resíduos nas regiões proibidas	1	0,4%
		100%

Gráfico 1 Gráfico de Ramachandran. As regiões mais favoráveis são mostradas em vermelho, as permitidas em amarelo, as generosamente permitidas em amarelo claro e as não permitidas em branco

É importante observar no gráfico (Gráfico 1), que apenas o resíduo de aminoácido Tyr254 se encontra em uma região não permitida, porém, de acordo com o alinhamento (Figura 4), verificou-se que este aminoácido não faz parte do sítio ativo da enzima, não interferindo assim, em sua atividade.

Com a sobreposição da enzima alvo com e enzima molde (Figura 6) foi possível observar um valor de DRMQ (desvio da raiz média quadrática) igual a 0,37Å, evidenciando a grande similaridade sequencial entre alvo e enzima molde.

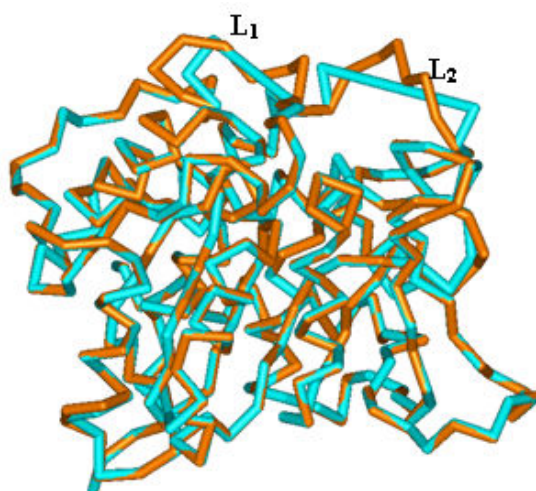


Figura 6 Sobreposição dos esqueletos da enzima alvo (*BsNH*- azul) e da enzima molde (*EcNH*- laranja)

De acordo com a literatura, as principais diferenças estruturais em proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por *loops*. Isto pode ser observado na Figura 6, onde as principais diferenças estruturais entre as enzimas alvo (*BsNH*) e molde estão exatamente nos *loops*

externos  $L_1$  e  $L_2$ , que estão localizados nas entradas dos sítios ativos das enzimas.

## 5.2 Estudo dos sítios ativos da enzima alvo (*BsNH*) e da *CfNH*

Os inibidores utilizados neste trabalho são inibidores de IU-*CfNH*, eles foram avaliados como protótipos de inibidores para a *BsNH*. Para isso, é importante que os resíduos dos sítios ativos de ambas as enzimas se conservem.

De acordo com a Tabela 3 é possível observar que, de um total de 9 resíduos de aminoácido do sítio ativo da *CfNH* (MILES et al., 1999), 7 são idênticos aos do sítio ativo da *BsNH*, ou seja, os sítios ativos se conservam em aproximadamente 78%. Desta forma, levando-se em conta a grande similaridade entre os resíduos dos sítios ativos, é possível utilizar os inibidores de *CfNH* como ponto de partida em estudos de modelagem molecular para a proposição de inibidores seletivos de *BsNH*, uma vez que não se tem conhecimento de inibidores de *BsNH* reportados na literatura até o momento.



Tabela 3 Resíduos de aminoácidos pertencentes aos sítios ativos da *BsNH* e da *CfNH*. Os resíduos de aminoácidos que se conservam estão representados em negrito

<i>BsNH</i>	<i>CfNH</i>
<b>Glu187</b>	<b>Glu166</b>
<b>Asn181</b>	<b>Asn160</b>
<b>Asn189</b>	<b>Asn168</b>
<b>Asp263</b>	<b>Asp242</b>
<b>Asp36</b>	<b>Asp15</b>
<b>Asp31</b>	<b>Asp10</b>
<b>Asn60</b>	<b>Asn39</b>
Ile146	Thr126
-	His82

### 5.3 Estudo por ancoramento molecular da *BsNH* com os substratos naturais e os inibidores de *CfNH*

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para gerar o sítio de ligação da *BsNH* através do programa *MVD*. O volume da cavidade foi de 283,14 Å<sup>3</sup> e está representado na Figura 7 juntamente com a ribose.

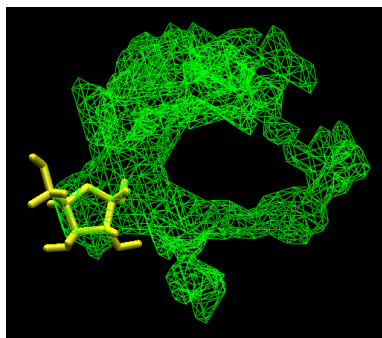


Figura 7 Volume da cavidade (verde) da *BsNH* com a ribose (amarelo) ancorada. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

Os resultados teóricos obtidos do ancoramento molecular foram avaliados e comparados com base nos resultados experimentais descritos por Miles et al. (1999).

Os inibidores foram ancorados no sítio ativo da *BsNH* e comparados com a ribose (que foi introduzida no sítio ativo da enzima conforme descrito no item 3.1.3). As energias de interação intermolecular e de ligação de hidrogênio ligante-proteína foram calculadas para melhor se entender quais são as variações entre os modos de interação dos inibidores no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores que são responsáveis pela atividade dos inibidores (Tabela 4).

Como pode ser visto na Tabela 4 e na Gráfico 2, o maior valor de  $pK_i$  corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular, assim como o menor valor de  $pK_i$  corresponde a um maior valor de energia de interação intermolecular, ou seja, os dados teóricos obtidos do ancoramento da enzima nucleosídeo hidrolase de *B. suis* estão de acordo com os resultados experimentais descritos por Miles et al. (1999).

Tabela 4 Valores de constante de inibição experimental ( $pK_i = -\log K_i$ ) (MILES et al., 1999), energia de interação intermolecular proteína/inibidores e ligação de hidrogênio obtidos do ancoramento para os inibidores 1-4

Inibidores	$pK_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Energia de interação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	Energia de ligação de hidrogênio* ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )
1	7,38	-111,61	-17,74
2	6,64	-102,14	-15,39
3	5,07	-97,67	-13,45
4	2,64	-91,47	-11,13

\* Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína.

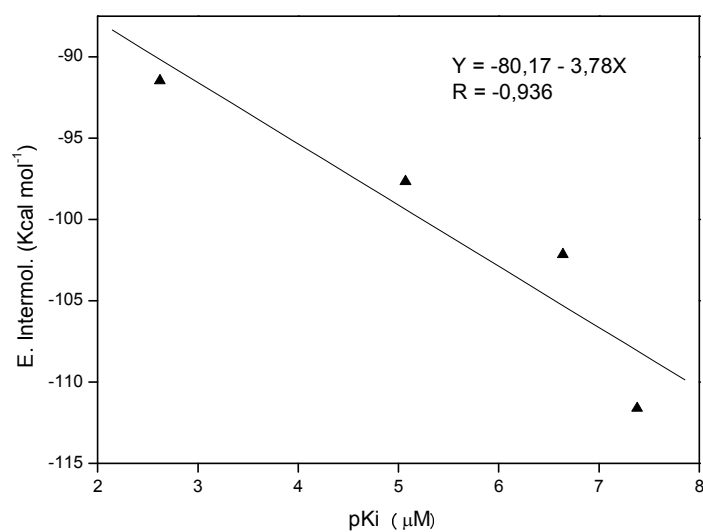


Gráfico 2 Correlação entre os valores de constante de inibição experimental ( $pK_i$ ) e energia intermolecular (E.) obtida no ancoramento molecular para os inibidores 1-4

O inibidor **1** apresenta um menor valor de energia de interação intermolecular, ou seja, possui uma maior interação com o sítio ativo da *BsNH*, com isso, sugere-se que este inibidor apresenta um maior potencial inibitório (Tabela 4). Já o inibidor **4** apresenta um maior valor de energia de interação intermolecular quando comparado aos outros inibidores, ou seja, possui uma menor interação com o sítio ativo, sugerindo desta forma, que ele apresenta um menor potencial inibitório (Tabela 4).

Com o ancoramento molecular foi possível observar como cada um dos inibidores se posicionou, levando em consideração a sobreposição e orientação dos anéis, no interior do sítio ativo, com relação a ribose. Como pode ser visto na Figura 8, o inibidor **1** foi o que melhor se posicionou no interior do sítio ativo, apresentando um menor valor de energia de ligação de hidrogênio quando comparado aos outros inibidores (Tabela 4), sugerindo que ele apresenta um maior poder de inibição.

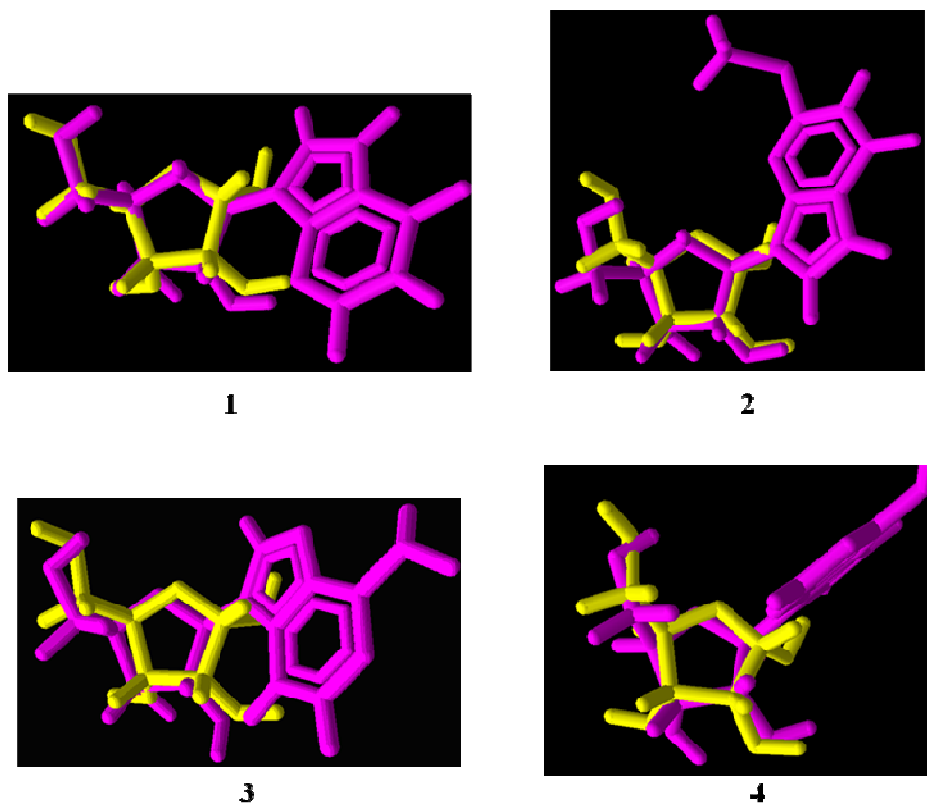


Figura 8 Sobreposição dos inibidores depois do ancoramento. A ribose está representada em amarelo e os inibidores em rosa. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

Outro aspecto importante de se analisar são as ligações de hidrogênio que cada inibidor realiza com a enzima, assim, torna-se mais fácil de visualizar quais são os resíduos de aminoácidos que estão interagindo mais fortemente com os inibidores estudados no presente trabalho (Tabela 5).

Tabela 5 Valores do comprimento das ligações de hidrogênio, das energias das ligações de hidrogênio, e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores e a enzima

Inibidores	Comprimento de ligação (Å)	Energia de ligação de Hidrogênio (kcal mol <sup>-1</sup> )	Resíduos de aminoácidos
1	3,48	-0,59	Asn60
	3,49	-0,54	
	2,64	<b>-2,50</b>	Asn101
	3,39	-1,04	Asn181
	3,28	-1,21	
	2,28	-0,21	Asn189
	3,07	<b>-2,50</b>	Asp36
	2,86	<b>-2,50</b>	Asp263
	3,19	-2,06	
	3,04	<b>-2,50</b>	Ile146
2,85	<b>-2,50</b>	Glu187	
2	3,12	-2,41	Asn60
	2,62	<b>-2,50</b>	Asn189
	3,45	-0,77	Asp36
	3,04	<b>-2,50</b>	Asp263
	3,16	-2,22	
	2,92	<b>-2,50</b>	Ile146
	2,72	<b>-2,50</b>	Glu187
3	3,20	-1,98	Asn60
	2,22	-0,67	Asn189
	3,17	-2,14	Asp36
	2,92	<b>-2,50</b>	Asp263
	2,93	<b>-2,50</b>	
	2,68	<b>-2,50</b>	Ile146
2,71	<b>-2,50</b>	Glu187	
4	2,58	-2,33	Asn60
	2,87	<b>-2,50</b>	Asn189
	3,57	-0,15	Asp36
	3,15	2,25	Asp263
	2,81	<b>-2,50</b>	Ile146
	2,47	-1,42	Glu187

Observa-se que o inibidor **1** realiza onze ligações de hidrogênio com cerca de 8 resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *BsNH*. Os inibidores **2** e **3** realizam sete ligações de hidrogênio com cerca de 6 resíduos de aminoácidos. Já o inibidor **4**, realiza seis ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo (Tabela 5).

Observa-se na Tabela 5, que as ligações mais significativas que o inibidor **1** realiza são com os resíduos de aminoácidos Asn101; Asp36; Asp263; Ile146 e Glu187. Já o inibidor **2** apresenta suas ligações mais significativas com os resíduos Asn189; Asp263; Ile146 e Glu187; o inibidor **3** com Asp263; Asp263; Ile146 e Glu187 e o inibidor **4** com os resíduos Asn189 e Ile146.

Como pode ser visto na Figura 9, as ligações mais significativas do inibidor **1** são feitas a partir do oxigênio 2' da ribose e o resíduo de aminoácido Asp36, entre o oxigênio 3' e os resíduos Ile146 e Glu187 e entre o resíduo Asn101 e o oxigênio 6' da nucleobase. O inibidor **1** também realiza duas ligações de hidrogênio com o resíduo Asp263, em que a mais forte é feita a partir do oxigênio 2' da ribose.

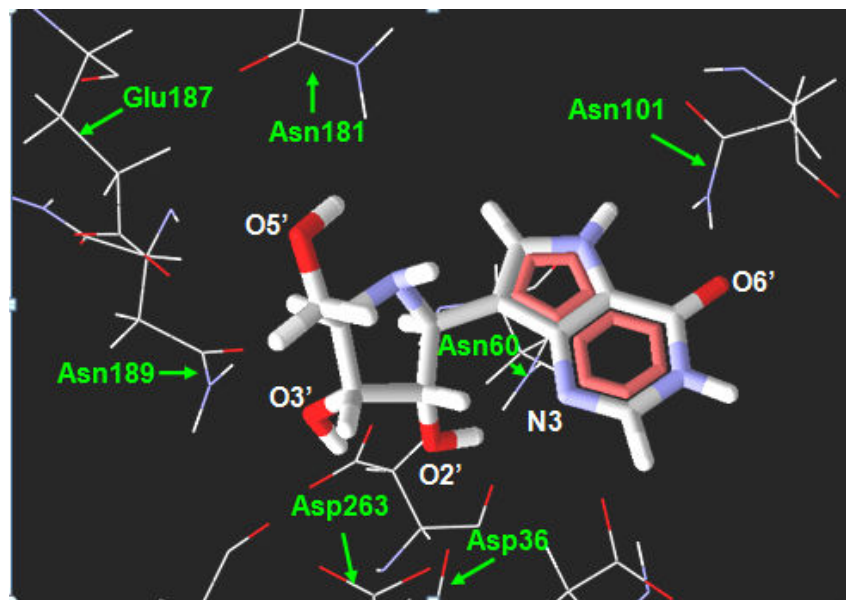


Figura 9 Inibidor **1** ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

O inibidor **2** realiza duas ligações de hidrogênio com o resíduo Asp263 (Figura 10), sendo que a mais significativa é feita a partir do oxigênio 2' da ribose. Outras ligações significativas são observadas entre os resíduos Ile146 e Asn189 e o oxigênio 3', e entre o resíduo Glu187 e o oxigênio 5' da ribose (Figura 10).



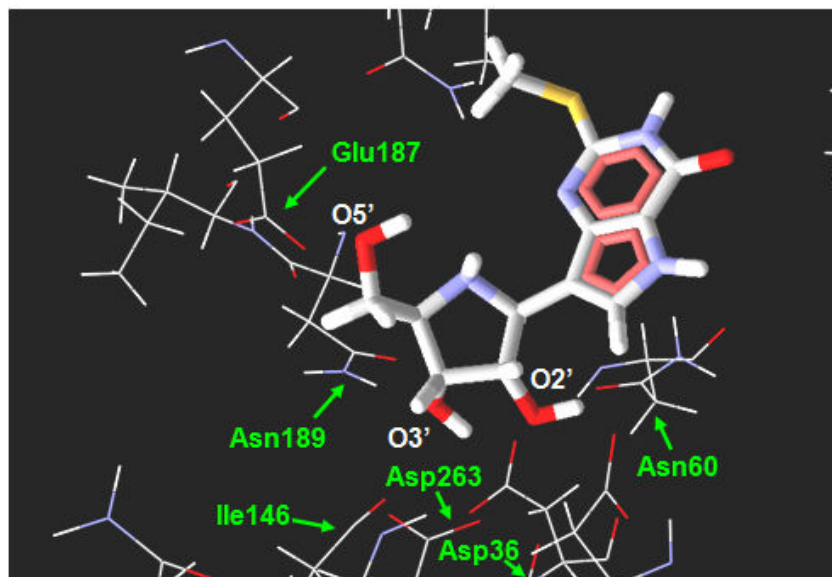


Figura 10 Inibidor **2** ancorado na *BsNH*. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

Como pode ser visto na Figura 11, as ligações mais significativas **3** são feitas a partir do resíduo de aminoácido Asp263 e os oxigênio 2' e 3' da ribose, entre o resíduo Glu187 e o oxigênio 5' e entre o resíduo de aminoácido Ile146 e o oxigênio 3' da ribose. Já o inibidor **4** realiza ligações de hidrogênio significativas entre os resíduos de aminoácidos Ile146 e Asn189 e o oxigênio 3' da ribose (Figura 12).

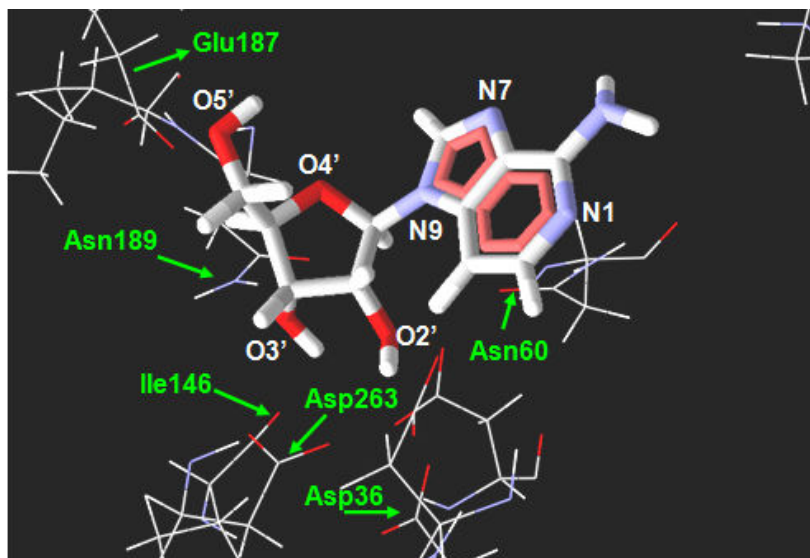


Figura 11 Inibidor 3 ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

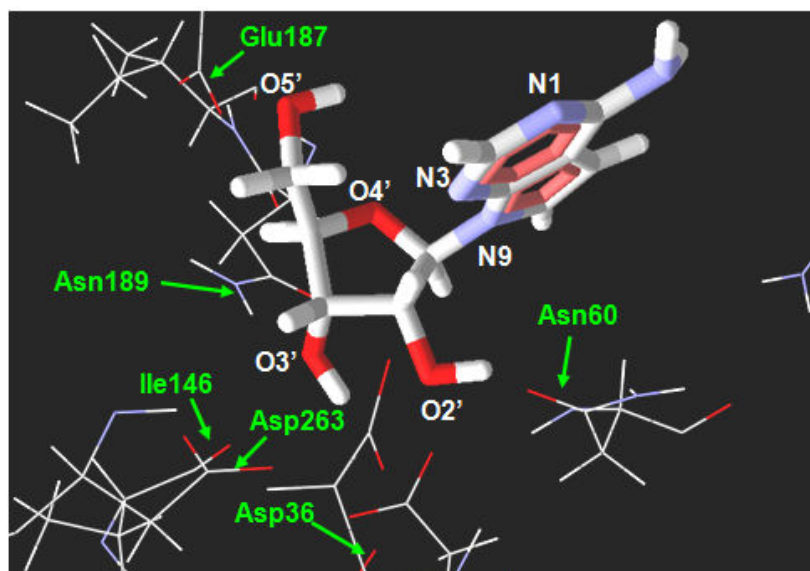


Figura 12 Inibidor 4 ancorado na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

Observou-se que o inibidor **1** apresenta um maior número de ligações de hidrogênio no sítio ativo da enzima, (Tabela 5, Figura 9), provando mais uma vez sua maior atividade com relação aos outros inibidores.

Todas essas ligações mais significativas mencionadas acima correspondem aos valores de  $-2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$  que estão em negrito na Tabela 5.

Também foram realizados estudos por ancoramento molecular entre a *BsNH* e os substratos naturais inosina, adenosina e uridina. O objetivo desses estudos é conhecer as importantes ligações de hidrogênio que ocorrem entre esses substratos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima e compará-las com as interações realizadas pelos inibidores estudados (Tabela 6) elegendo, assim, estruturas de possíveis protótipos de inibidores para a *BsNH*.

Na Tabela 6, estão apresentados os valores de energia de interação intermolecular e de ligação de hidrogênio entre os substratos e a enzima após o ancoramento. Observa-se que o maior valor de  $pK_M$ , referente a inosina, corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular, assim como, o menor valor de  $pK_M$ , referente a uridina, corresponde um maior valor de energia de interação intermolecular. Ou seja, mais uma vez, os dados teóricos obtidos do ancoramento molecular estão de acordo com os resultados experimentais descritos por Horenstein et al. (1991) e Versées et al. (2001).

Tabela 6 Valores da constante de Michaelis-Menten experimental ( $pK_M = -\log K_M$ ) (HORENSTEIN et al., 1991; VERSÉES et al., 2001), energia de interação intermolecular proteína/substratos e ligação de hidrogênio obtidos do ancoramento para os substratos naturais

<b>Substratos</b>	<b><math>pK_M</math></b>	<b>Energia de interação (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>)*</b>
<b>inosina</b>	3,42	-98,54	-14,07
<b>adenosina</b>	3,34	-95,19	-14,62
<b>uridina</b>	2,91	-90,21	-10,42

\* Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína

Com o ancoramento também foi possível observar como cada um dos substratos naturais se posicionou, no interior do sítio ativo, com relação a ribose. Como pode-se observar na Figura 13, o substrato que melhor se posicionou no interior do sítio ativo foi a inosina, esse resultado está de acordo com os dados experimentais, ou seja, a inosina apresenta um maior valor de  $pK_M$  (Tabela 6) e, conseqüentemente, uma maior afinidade pela enzima quando comparado aos outros substratos.

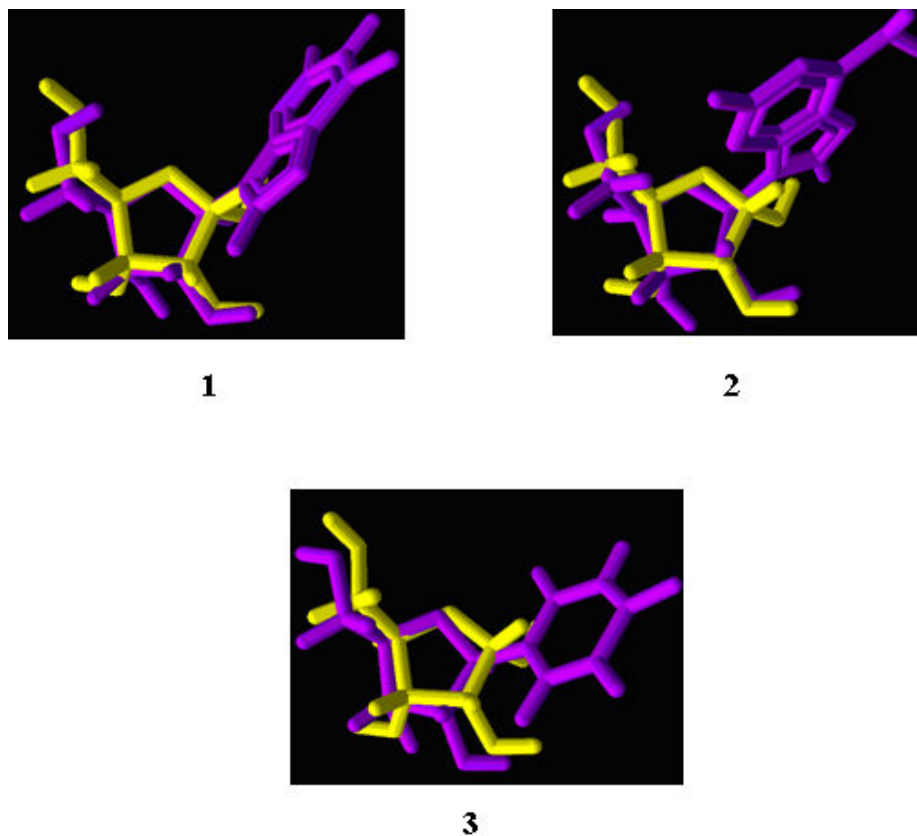


Figura 13 Sobreposição dos substratos naturais depois do ancoramento. A ribose é mostrada em amarelo os substratos (**1** inosina, **2** adenosina e **3** uridina) em roxo. Para melhor visualização omitiu-se a proteína

Na Tabela 7, estão apresentados os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da *BsNH* que realizam interação de hidrogênio com cada um dos substratos naturais.

Tabela 7 Valores de comprimento de ligações de hidrogênio, energia das ligações de hidrogênio, e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os substratos naturais e a enzima

<b>Substratos</b>	<b>Comprimento de ligação (Å)</b>	<b>Energia de ligação de Hidrogênio (kcal mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos de aminoácidos</b>
<b>Inosina</b>	3,11	<b>-2,50</b>	Asn60
	3,37	-0,19	Asn101
	2,65	<b>-2,50</b>	Asn189
	3,42	-0,89	Asp36
	3,02	<b>-2,50</b>	Asp263
	3,49	-0,50	
	2,91	<b>-2,50</b>	Ile146
	2,69	<b>-2,50</b>	Glu187
<b>Adenosina</b>	2,69	<b>-2,50</b>	Asn60
	3,31	-1,46	Asn101
	2,74	<b>-2,50</b>	Asn189
	3,54	-0,31	
	3,52	-0,38	Asp36
	3,05	<b>-2,50</b>	Asp263
	3,44	-0,79	
	2,73	<b>-2,50</b>	Ile146
2,50	-1,67	Glu187	
<b>Uridina</b>	3,40	-0,98	Asn60
	3,24	-1,81	Asn101
	2,00	2,59	Asn189
	3,09	<b>-2,50</b>	Asp36
	2,64	<b>-2,50</b>	Asp263
	3,55	-0,23	
	2,96	<b>-2,50</b>	Ile146
	2,99	<b>-2,50</b>	Glu187

Observa-se que os substratos naturais inosina, adenosina e uridina, interagem com 7 resíduos de aminoácidos no sítio ativo da *BsNH*, porém, a inosina e uridina, apresentam no total, cerca de oito ligações de hidrogênio com estes resíduos. Já a adenosina, apresenta nove ligações com estes resíduos de aminoácido (Tabela 7).

De acordo com a Tabela 7, as ligações mais significativas que a inosina realiza, são com os resíduos de aminoácidos Asn60; Asn189; Asp263; Ile146 e Glu187. Já a adenosina apresenta suas ligações mais significativas com os resíduos Asn60; Asn189; Asp263 e Ile146 e a uridina com os aminoácidos Asp36; Asp263; Ile146 e Glu187. É importante observar que, mesmo a inosina apresentando uma ligação de hidrogênio a menos do que a adenosina, ela apresenta um maior número de ligações mais significativas ( $-2,50 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ), justificando mais uma vez a sua maior afinidade pela enzima com relação aos outros substratos.

Como pode ser visto na Figura 14, estas ligações mais significativas da inosina são feitas a partir do oxigênio 2' da ribose e o resíduo de aminoácido Asn60, entre o oxigênio 3' e os resíduos Ile146 e Asn189 e entre o oxigênio 5' da ribose e o resíduo Glu187. Ela também realiza duas ligações de hidrogênio com o resíduo Asp263, sendo que a mais forte é feita a partir do oxigênio 2' da ribose.

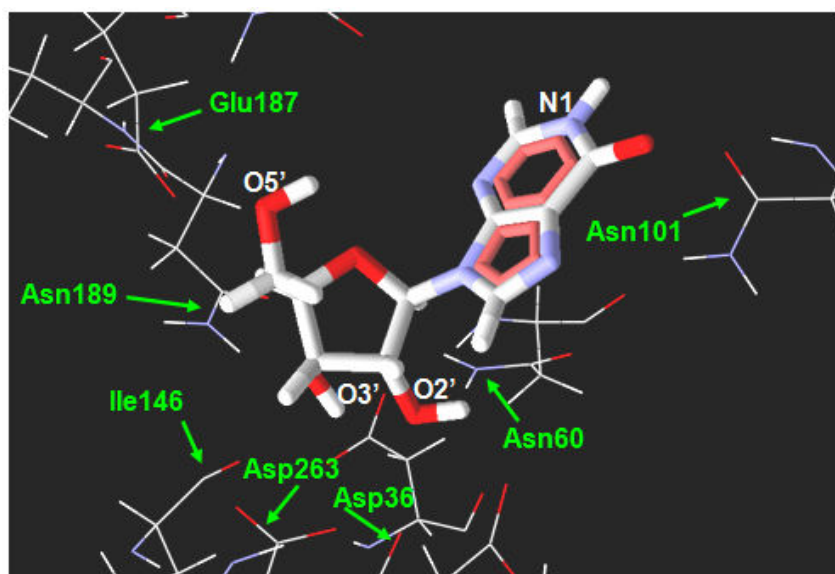


Figura 14 Inosina ancorada na *B5NH*. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

De acordo com a Figura 15, as ligações mais significativas da adenosina são feitas a partir do oxigênio 2' da ribose e o resíduo de aminoácido Asn60, entre o oxigênio 3' e os resíduos Ile146 e Asn189. Ela também realiza duas ligações de hidrogênio com o resíduo Asp263, onde a mais forte é feita a partir do oxigênio 2' da ribose. A diferença entre a inosina e a adenosina é que a adenosina não possui uma ligação forte com o resíduo Glu187.

Já a uridina possui suas ligações mais significativas entre oxigênio 2' da ribose e os resíduos de aminoácidos Asp36 e Asp263, entre o oxigênio 3' e o resíduo Ile146 e entre o oxigênio 5' da ribose e o resíduo Glu187 (Figura 16).



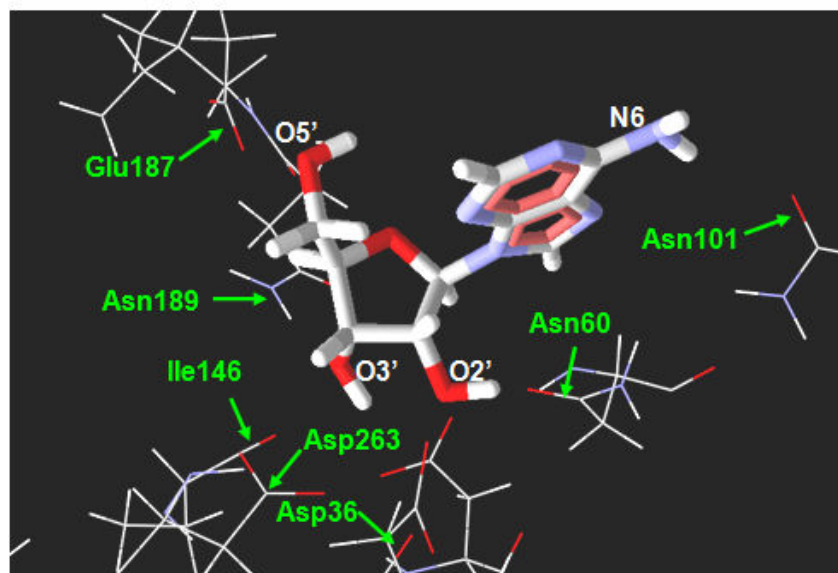


Figura 15 Adenosina ancorada na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

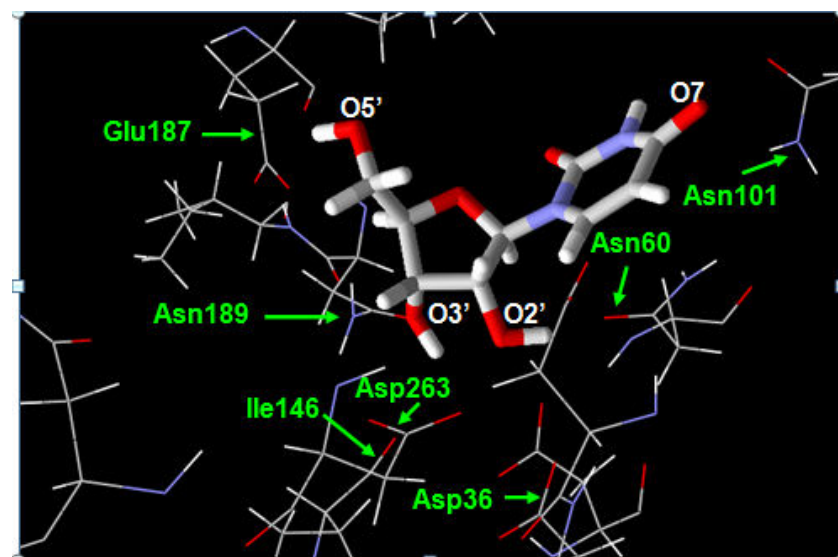


Figura 16 Uridina ancorada na BsNH. Os aminoácidos que realizam ligações de hidrogênio estão destacados

É importante observar que todos os inibidores estudados neste trabalho (Tabela 1) são estruturalmente semelhantes aos substratos naturais (inosina e adenosina) (Tabela 2), sugerindo assim, que possa ocorrer uma inibição competitiva, ou seja, estes inibidores podem competir com os substratos pelo o sítio ativo da enzima.

Como foi observado no estudo por ancoramento molecular, o inibidor **1**, que foi apontado como o melhor inibidor (com base nos estudos teóricos e experimentais), apresenta um menor valor de energia de interação intermolecular e de ligação de hidrogênio (Tabela 4) do que os substratos naturais (Tabela 6). Além disso, apresenta um maior número de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da *BsNH* (Tabela 5, Figura 9) quando comparado a inosina e adenosina (Tabela 7, Figuras 14 e 15), ou seja, este inibidor (inibidor **1**) apresenta uma maior estabilidade no interior do sítio ativo quando comparado aos próprios substratos naturais, sugerindo que ele seja um promissor inibidor de *BsNH*.

Como já foi mencionado anteriormente, todos os quatro inibidores, são estruturalmente bem parecidos, porém, qualquer mudança na posição de átomos ou substituição de grupos mais ou menos volumosos na nucleobase, já influencia na conformação que cada um deles adota no interior do sítio ativo da *BsNH*.

Como se pode observar nas Figuras 11 e 12, os inibidores 3 e 4 possuem o oxigênio 4' no anel ribose e a única diferença estrutural entre eles é na posição dos nitrogênios na nucleobase. O inibidor **3** apresenta os nitrogênios N1, N7 e N9 (Figura 11); já o inibidor **4** apresenta os nitrogênios N1, N3 e N9. Essa mudança na posição dos nitrogênios na nucleobase, fez com que o inibidor **3** adotasse uma conformação mais satisfatória no interior do sítio ativo da *BsNH*, realizando um maior número de ligações de hidrogênio com a enzima (Tabela 5, Figura 11), quando comparado ao inibidor **4** (Tabela 5, Figura 12). Justificando assim, os seus melhores valores de energia de interação intermolecular (-99,58

Kcal mol<sup>-1</sup>) e de energia de ligação de hidrogênio (-11,13 Kcal mol<sup>-1</sup>) com a enzima em relação ao inibidor **4** (Tabela 4).

Os inibidores **1** e **2** possuem um nitrogênio no lugar do oxigênio 4' da ribose e não apresentam o nitrogênio 9 na nucleobase (Figuras 9 e 10), como observado nos inibidores **3** e **4** (Figuras 11 e 12). Essas mudanças nas estruturas dos inibidores **1** e **2** favorecem a adoção de uma conformação mais estável no interior do sítio ativo da *BsNH*, ou seja, eles apresentaram uma menor energia de interação intermolecular e de ligação de hidrogênio do que os inibidores **3** e **4** (Tabela 4).

Porém, entre os inibidores **1** e **2**, aquele que possui melhores valores de energia de interação intermolecular e de ligação de hidrogênio, como mencionado anteriormente, é o inibidor **1** (Tabela 4). Isso pode ser explicado pelo fato do inibidor **1** apresentar somente uma substituição na nucleobase (Figura 9), causando assim, um menor impedimento estérico com a enzima e levando a um maior número de ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo da *BsNH* (Tabela 5, Figura 9). O inibidor **2** apresenta duas substituições na nucleobase (Figura 10), ou seja, possui um maior impedimento estérico com a enzima, diminuindo a sua estabilidade no interior do sítio ativo, realizando um menor número de ligações de hidrogênio com a enzima (Tabela 5, Figura 10) quando comparado ao inibidor **1** (Tabela 5, Figura 9).

Finalmente, com base nestes resultados prévios, pode-se propôr a síntese de inibidores semelhantes aos inibidores **1** e **2** e que esses, preferencialmente, apresentem no máximo uma substituição na nucleobase.

#### **5.4 Estudo por ancoramento molecular entre a *CfNH*, os substratos naturais e os inibidores 1- 4**

Neste trabalho também se avaliou o modo de interação entre os substratos naturais e os inibidores **1**, **2**, **3** e **4** no sítio ativo da *CfNH*, a fim de

validar a metodologia utilizada. Os inibidores foram ancorados no sítio ativo da *Cf*NH e comparados com o *p*APIR (inibidor cristalizado no sítio ativo da enzima).

Como pode-se observar na Tabela 8 e Gráfico 3, o maior valor de  $pK_i$  corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular, assim como o menor valor de  $pK_i$  corresponde a um maior valor de energia de interação intermolecular, ou seja, os dados teóricos obtidos do ancoramento com a *Cf*NH também estão de acordo com os resultados experimentais descritos por Miles et al. (1999).

É importante observar que o inibidor **1** apresenta um menor valor de energia de interação intermolecular (Tabela 8), ou seja, possui uma maior estabilidade no sítio ativo da *Cf*NH, sugerindo assim, que ele apresenta um maior potencial inibitório. Já o inibidor **4** apresenta um maior valor de energia de interação intermolecular quando comparado aos outros inibidores (Tabela 8), ou seja, possui uma menor estabilidade no interior do sítio ativo e com isso, sugere-se que ele apresenta um menor potencial inibitório. Esse mesmo resultado foi observado nos estudos de *docking* com a *Bs*NH.

Tabela 8 Valores de constante de inibição experimental ( $pK_i = -\log K_i$ ) (MILES et al., 1999), energia de interação intermolecular proteína/inibidores e *p*APIR, comprimento das ligações de hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os inibidores/enzima e *p*APIR/enzima

Inibidores	$pK_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Energia de interação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	Comprimento de ligação (Å)	Resíduos de aminoácidos
1	7,38	-122,37	3,39	Asp14
			3,27	Asp242
			3,55	
			2,79	Asn39
			3,15	
			2,90	Glu166
			3,43	
			3,31	Thr126
2	6,64	-115,79	2,96	His82
			2,79	Asp14
			3,70	Asp242
			2,48	
			3,29	Asn160
			2,59	Asn168
			2,93	Glu166
3	5,07	-114,79	3,35	Thr126
			3,14	Asp14
			3,13	Asp242
			2,95	
			3,53	
			2,95	Asn39
			3,35	
			3,10	
			3,15	Asn160
			3,52	Asn168
2,98				
2,47	Glu166			
3,05	Thr126			

Tabela 8, Continuação

Inibidores	pKi ( $\mu$ M)	Energia de interação (kcal mol <sup>-1</sup> )	Comprimento de ligação (Å)	Resíduos de aminoácidos
4	2,64	-108,77	3,04	Asp14
			3,51	Asp242
			3,19	
			2,89	Asn39
			3,35	
			2,58	
			2,43	Glu166
			3,24	Thr126
			3,01	His82
<i>p</i> APIR	-	-103,57	3,23	Asp14
			3,33	
			3,53	Asp15
			2,84	Asp242
			2,98	
			3,20	Asn39
			3,41	Asn160
			2,72	Asn168
			2,97	Thr126
2,14	Glu166			

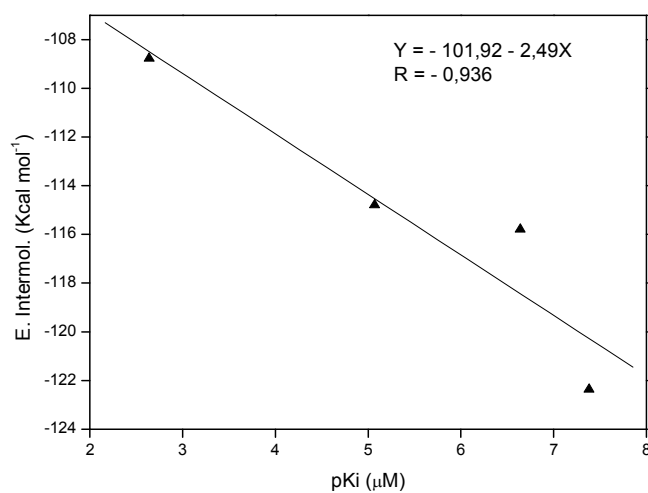


Grafico 3 Correlação entre os valores de constante de inibição experimental (pKi) e energia intermolecular (E.) obtida no ancoramento molecular para os inibidores **1-4**

Em relação aos substratos naturais, como pode-se observar na Tabela 9, o maior valor de  $pK_M$ , referente a inosina, corresponde a um menor valor de energia de interação intermolecular. Assim como, o menor valor de  $pK_M$ , referente a uridina, corresponde um maior valor de energia de interação intermolecular, ou seja, mais uma vez, os dados obtidos do ancoramento molecular para *CfNH* estão de acordo com os resultados obtidos para a *BsNH*.

Tabela 9 Valores da constante de Michaelis-Menten experimental ( $pK_M = -\log K_M$ ) (HORENSTEIN et al., 1991; VERSÉES et al., 2001), energia de interação intermolecular proteína/substratos, comprimento das ligações de hidrogênio e resíduos de aminoácidos com os quais as ligações são formadas entre os substratos e a enzima

Substratos	$pK_M$ ( $\mu M$ )	Energia de interação ( $kcal\ mol^{-1}$ )	Comprimento de ligação ( $\text{Å}$ )	Resíduos de aminoácidos
<b>Inosina</b>	3,44	-119,58	3,15	Asp14
			3,21	Asp242
			3,53	
			2,57	Asn39
			3,21	
			3,57	
			3,59	Asn168
			2,35	Glu166
			3,21	Thr126
			2,97	His82
<b>Adenosina</b>	3,34	-117,32	3,14	Asp14
			3,28	Asp242
			3,23	
			2,52	Asn39
			3,43	
			3,48	
			3,22	Asn168
			2,49	Glu166
			2,90	Thr126
			3,42	His82
3,51	His241			



Tabela 9, continuação

Substratos	$pK_M$ ( $\mu\text{M}$ )	Energia de interação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	Comprimento de ligação ( $\text{\AA}$ )	Resíduos de aminoácidos
Uridina	2,91	-111,67	3,18	Asp14
			2,69	Asn39
			3,25	
			2,51	
			3,43	Asn168
			3,47	
			2,61	Glu166
			3,35	Thr126
			3,00	His82

Com os cálculos de ancoramento molecular também foi possível observar que tanto os inibidores quanto os substratos naturais possuem ligações de hidrogênio com o aminoácido Asp14 (Tabela 8 e 9), além disso, com o *redocking* (Figura 17) foi possível observar que o inibidor *pAPIR* também realiza duas ligações de hidrogênio com este aminoácido (Tabela 8), ou seja, além dos 9 aminoácidos mostrados na Figura 1 e Tabela 3, o Asp14 também faz parte do sítio ativo da *CfNH*. Observou-se que este aminoácido também está presente no sítio ativo da enzima *BsNH*, ou seja, os sítios ativos de ambas as enzimas se conservam em 80%, reforçando a idéia de que é possível utilizar inibidores de *CfNH* como ponto de partida em estudos de modelagem molecular para a proposição de inibidores seletivos de *BsNH*.

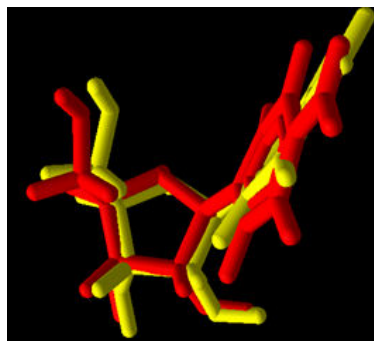


Figura 17 Sobreposição do *p*APIR depois do ancoramento (*Redocking*). Para melhor visualização omitiu-se a proteína

### 5.5 Estudos por dinâmica molecular

Após o estudo por ancoramento molecular, os inibidores e os substratos foram submetidos a simulações por dinâmica molecular utilizando o campo de forças GROMOS 96 (SPOEL et al., 2001). Com essas simulações foi possível observar o comportamento dinâmico dessas moléculas no sítio ativo da *Bs*NH, comparando com os resultados para *Cj*NH, com o objetivo de buscar informações adicionais úteis para direcionar proposições de estruturas de potenciais inibidores para a *Bs*NH.

Após a realização das etapas de otimização dos sistemas e dinâmica molecular de 10 ns, conforme descrito na seção de metodologia, foram gerados e analisados para cada sistema, os gráficos de energia total, desvio padrão temporal e espacial e ligações de hidrogênio formadas e mantidas ao longo das dinâmicas. Também foram extraídos quadros a intervalos definidos ao longo das dinâmicas, para analisar e comparar o comportamento dinâmico de cada ligante em cada sítio ativo com os principais resíduos que realizam interações relevantes, ajudando na estabilização dessas moléculas no interior do sítio ativo.

O resultado do desvio padrão temporal e espacial para cada sistema está descrito no item 5.5.1. Já os resultados de energia total para os 4 sistemas enzima/inibidor e os 3 sistemas enzima/substrato para ambas as enzimas, *BsNH* e *CfNH* estão apresentados no Apêndice D.

### 5.5.1 Análise dos gráficos de desvio padrão

Os cálculos de DRMQ (desvio da raiz média quadrática) foram realizados com o objetivo de fazer a comparação entre as diversas conformações espaciais assumidas pelo sistema ao longo do tempo em relação à estrutura média deste conjunto, e para o DRMQ temporal, em relação à estrutura inicial do conjunto, excluindo-se o solvente. Esse parâmetro pode dar uma idéia do quanto a estrutura tridimensional flutuou ao longo do tempo, bem como permitir a observação de flutuações locais, como, por exemplo, quais os resíduos com maior mobilidade durante uma dinâmica, para o caso de proteínas (GUIMARÃES, 2010).

Foram feitos cálculos de DRMQ temporal sobre todos os átomos dos complexos para 500 quadros, sendo sempre o posterior em relação ao anterior, um a cada 20 ps, perfazendo, assim, um total de 10 ns. Considerando-se que os complexos poderiam flutuar na caixa, cada quadro foi ajustado pelo método dos mínimos quadrados ao seu quadro precedente para efeito de cálculo de desvio padrão. Os resultados podem ser observados nos Gráficos 4 e 5.

Como se pode observar para as duas simulações (*BsNH/Inibidor 1* e *CfNH/Inibidor 1*), o DRMQ temporal tende a estabilizar logo nos primeiros picossegundos, não passando de 1,5 Å para a proteína e, de 1,0 Å para o inibidor **1**. Esse resultado sugere que há uma boa interação entre a enzima e o inibidor, ou seja, o inibidor **1** se acomoda bem nas cavidades do sítio ativo, para o tempo simulado, mostrando estabilização do sistema e corroborando com os resultados

sugeridos através do cálculo da energia total, descrito no Apêndice D. Esse comportamento foi semelhante a todas as outras simulações para os sistemas *BsNH*/inibidores e os 3 sistemas *BsNH*/substrato e também para os sistemas *CfNH*/inibidores e os 3 sistemas *CfNH*/substrato.

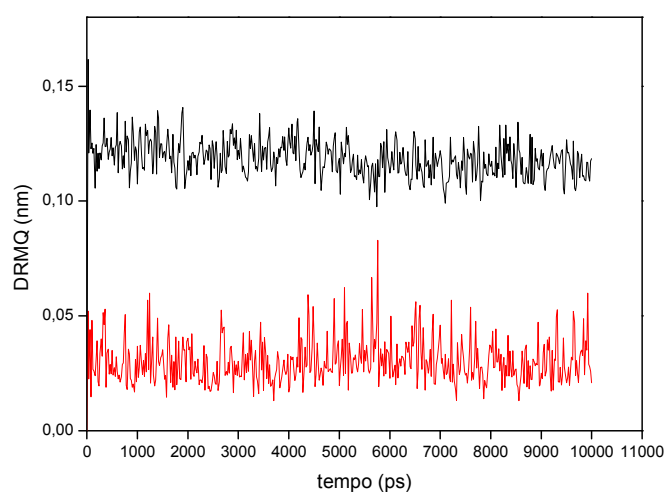


Gráfico 4 Variação do DRMQ temporal para a simulação *BsNH*/Inibidor 1. A curva da enzima está representada em preto e a do inibidor, em vermelho

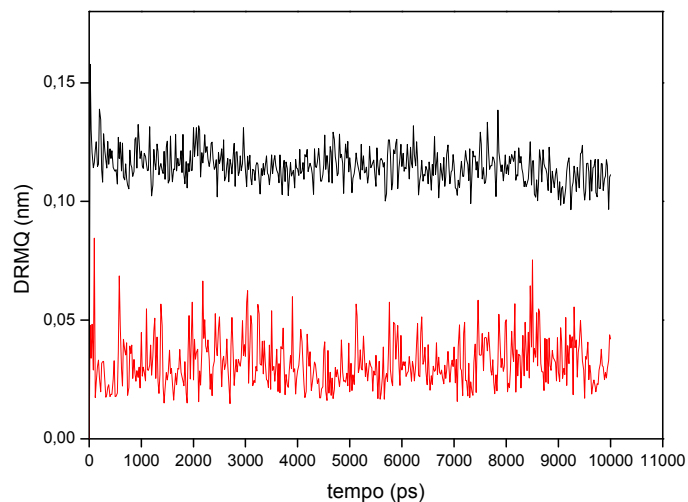


Gráfico 5 Variação DRMQ temporal para a simulação *CjNH*/Inibidor **1**. A curva da enzima está representada em preto e a do inibidor, em vermelho

Nas Tabelas 10 e 11, são exibidos os resultados gerais para as médias e desvios padrões dos DRMQ temporais, bem como os desvios máximos. Nela estão avaliados os desvios para a *BsNH* (Tabela 10), *CjNH* (Tabela 11) e para os ligantes e substratos de forma independente. Para cada sistema, as médias dos DRMQ temporais para os ligantes e substratos ficaram sempre abaixo de 1,0 Å e para as proteínas ficaram sempre abaixo de 1,5 Å, indicando, assim, a estabilidade dinâmica das simulações.

Tabela 10 Médias dos DRMQ temporais e desvios médios tomados ao longo de cada sistema simulado com a *B<sub>s</sub>NH*

Sistema		Média (nm/Å)	Desvio padrão	Máximo (nm/Å)
<b>Sistema</b>	Proteína	0,112 (1,12)	0,0074	0,160 (1,60)
<b>inosina</b>	inosina	0,028 (0,28)	0,010	0,087 (0,87)
<b>Sistema</b>	Proteína	0,115 (1,15)	0,0074	0,173 (1,73)
<b>adenosina</b>	adenosina	0,034 (0,34)	0,013	0,093 (0,93)
<b>Sistema</b>	Proteína	0,118 (1,18)	0,0075	0,169 (1,69)
<b>uridina</b>	uridina	0,036 (0,36)	0,014	0,120 (1,20)
<b>Sistema 1</b>	Proteína	0,119 (1,19)	0,0079	0,162 (1,62)
	inibidor 1	0,030 (0,30)	0,0097	0,083 (0,83)
<b>Sistema 2</b>	Proteína	0,114 (1,14)	0,0075	0,155 (1,55)
	inibidor 2	0,044 (0,44)	0,017	0,080 (0,80)
<b>Sistema 3</b>	Proteína	0,116 (1,16)	0,0083	0,176 (1,76)
	inibidor 3	0,033 (0,33)	0,013	0,112 (1,12)
<b>Sistema 4</b>	Proteína	0,117 (1,17)	0,0079	0,167 (1,67)
	inibidor 4	0,036 (0,36)	0,014	0,106 (1,06)

Tabela 11 Médias dos DRMQ temporais e desvios médios tomados ao longo de cada sistema simulado com a *C<sub>f</sub>NH*

Sistema		Média (nm/Å)	Desvio padrão	Máximo (nm/Å)
<b>Sistema</b>	Proteína	0,112 (1,12)	0,0068	0,147 (1,47)
<b>inosina</b>	Inosina	0,032 (0,32)	0,011	0,081 (0,81)
<b>Sistema</b>	Proteína	0,114 (1,14)	0,0071	0,155 (1,55)
<b>adenosina</b>	Adenosina	0,031 (0,31)	0,011	0,078 (0,78)
<b>Sistema</b>	Proteína	0,115 (1,15)	0,0074	0,163 (1,63)
<b>uridina</b>	Uridina	0,029 (0,29)	0,0090	0,068 (0,68)
<b>Sistema 1</b>	Proteína	0,115 (1,15)	0,0071	0,158 (1,58)
	Inibidor 1	0,032 (0,32)	0,010	0,085 (0,85)
<b>Sistema 2</b>	Proteína	0,115 (1,15)	0,0070	0,147 (1,47)
	Inibidor 2	0,044 (0,44)	0,017	0,135 (1,35)
<b>Sistema 3</b>	Proteína	0,116 (1,16)	0,0071	0,165 (1,65)
	Inibidor 3	0,034 (0,34)	0,013	0,080 (0,80)
<b>Sistema 4</b>	Proteína	0,114 (1,14)	0,0070	0,165 (1,65)
	Inibidor 4	0,027 (0,27)	0,0086	0,075 (0,75)

Para confirmar a estabilização estrutural no ambiente da simulação, foram calculadas os DRMQ bidimensional (2D) e tridimensional (3D), em relação à posição média, sobre cada resíduo de aminoácido da *BsNH* e *CfNH*.

Para cada DRMQ 2D (Gráficos 6 e 7), em conjunto tem-se um DRMQ 3D (Figuras 18 e 19), a fim de ter-se uma visão qualitativa e quantitativa de todas as regiões ao longo das dinâmicas. Maiores valores do DRMQ (Figuras 20 e Gráfico 8) e maiores espessamentos dos tubos nas Figuras 18 e 19 indicam os resíduos que sofreram maiores variações e correspondem as regiões de *loops* (GUIMARÃES, 2010).

Já os resíduos da região do sítio ativo e das alfa hélices e folhas beta, apresentam um menor valor de DRMQ (Gráficos 6 e 7), revelando assim, a maior estabilidade destas regiões.

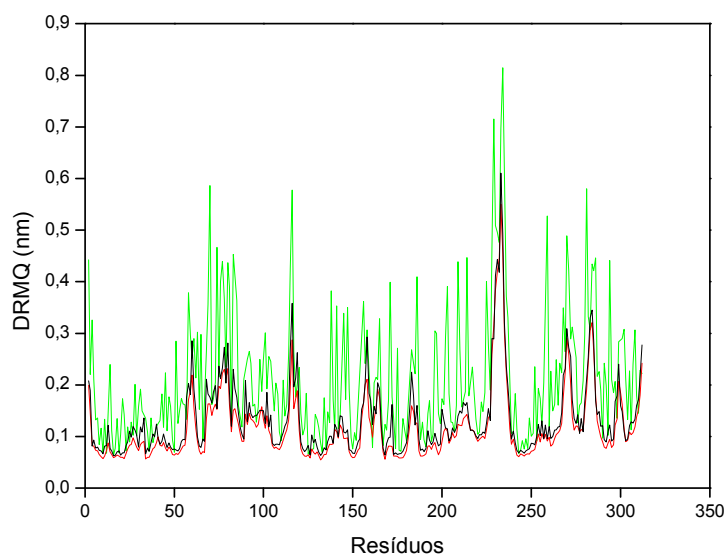


Gráfico 6 Variação do DRMQ espacial para a simulação *BsNH*/Inibidor 1. Em preto, a variação da *BsNH* (cadeia principal + cadeia lateral); em vermelho a cadeia principal e, em verde, a cadeia lateral

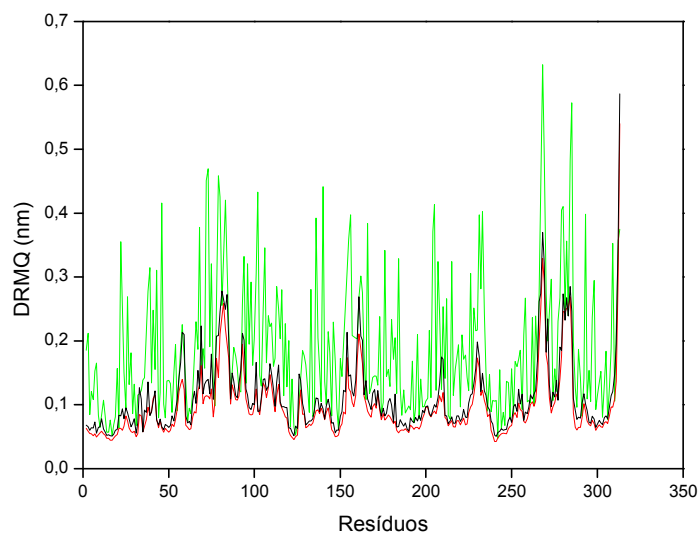


Gráfico 7 Variação DRMQ espacial para a simulação *C/NH/Inibidor 1*. Em preto, a variação da *C/NH* (cadeia principal + cadeia lateral); em vermelho a cadeia principal e, em verde, a cadeia lateral

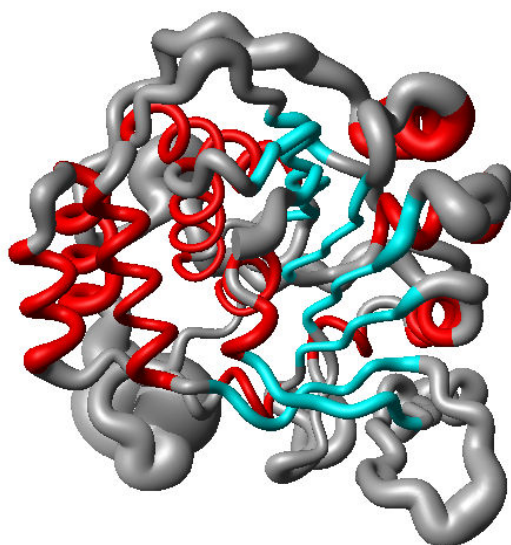


Figura 18 Ilustração qualitativa do DRMQ espacial para o sistema *B/NH/Inibidor 1*. Quanto maior a espessura do tubo, maior o DRMQ. O ligante foi omitido na figura



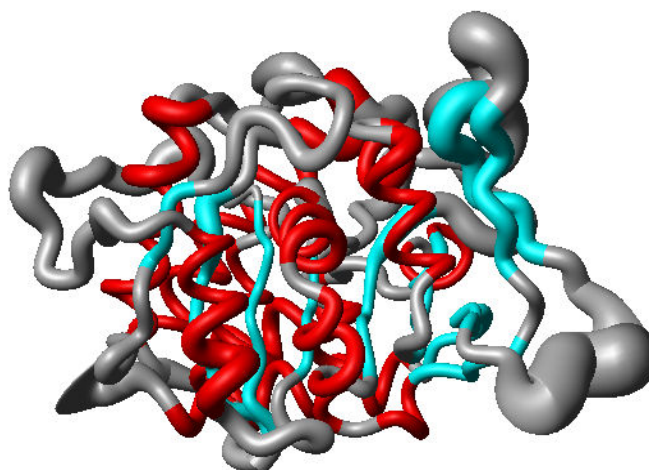


Figura 19 Ilustração qualitativa do DRMQ espacial para o sistema C/NH/Inibidor 1. Quanto maior a espessura do tubo, maior o DRMQ. O ligante foi omitido na figura

### 5.5.2 Análise do comportamento dinâmico dos inibidores no sítio ativo da *BsNH*

Para visualização do comportamento dinâmico de cada inibidor dentro do sítio ativo, foram selecionados, para cada sistema, os resíduos diretamente envolvidos com as principais interações com cada inibidor. Ou seja, aqueles resíduos responsáveis pela estabilização destes inibidores no interior do sítio ativo da *BsNH*. Esta seleção foi realizada levando em consideração os resultados obtidos nos estudos por ancoramento molecular discutidos na sessão 5.3, bem como também alguns importantes resíduos que não foram observados naqueles estudos.

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o inibidor 1, no sítio ativo da *BsNH* (Figura 20), foi possível observar que este inibidor

permaneceu preso dentro do sítio ativo durante toda a simulação. Este fato confirma a boa interação deste inibidor com a enzima, ou seja, ele apresenta um maior poder inibitório quando comparado aos outros inibidores, corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

Durante toda a dinâmica foi possível observar que o inibidor **1** permaneceu entre os resíduos Phe188, His262, Asn60, Asn101 e Asn181 (Figura 20). Dentre os resíduos citados anteriormente, somente a Phe188 e a His262, de acordo com o estudo por ancoramento molecular, não realizam ligação de hidrogênio com o inibidor **1**. Porém, durante o estudo de dinâmica molecular, foi possível observar que estes resíduos podem ter contribuído para a permanência deste inibidor no interior do sítio ativo.

De acordo com os gráficos de distância, observou-se que o resíduo Phe188 começou em uma distância de 7,0 Å. Ao longo da dinâmica ele se aproximou e se estabilizou em uma distância entre 5,7 e 6,1 Å do inibidor **1** (Gráfico 8). Já a His262 se estabilizou em uma distância entre 5,0 e 6,0 Å (Gráfico 9) (considerando que as distâncias são medidas entre os pontos médios de cada molécula). Os gráficos de distância dos outros resíduos se encontram no Apêndice E.

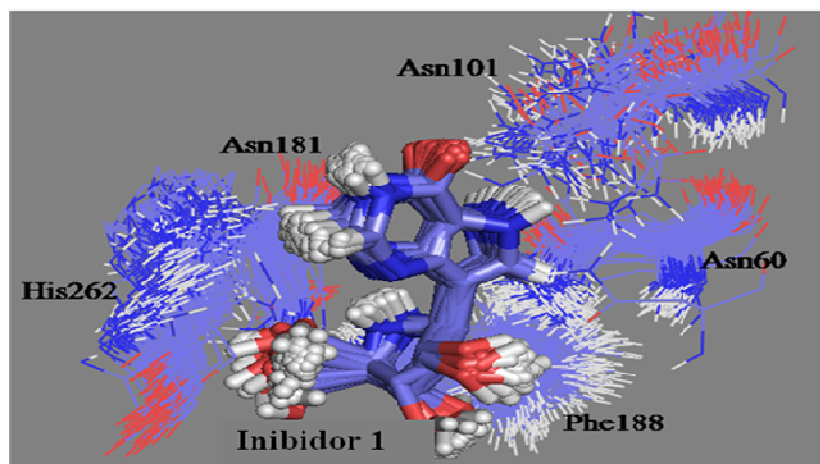


Figura 20 Quadros da dinâmica molecular do inibidor 1 no sítio ativo da *BsNH*

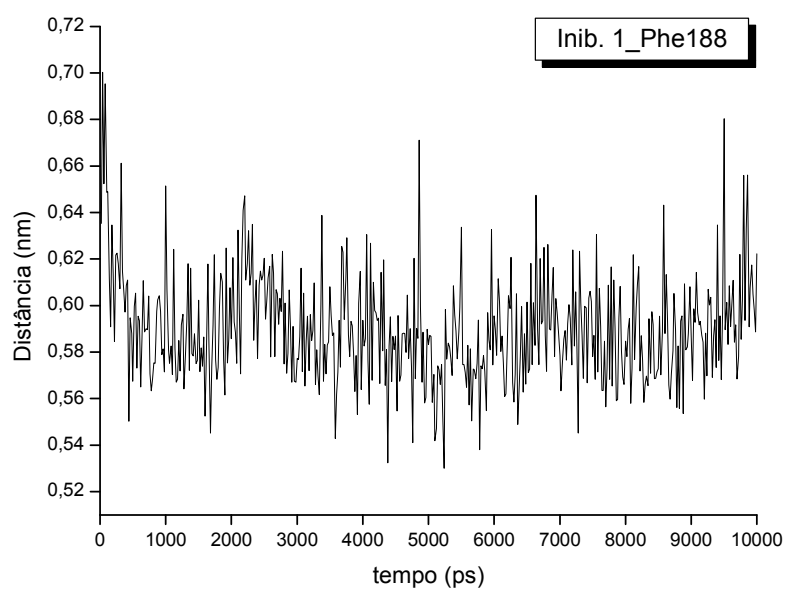


Grafico 8 Variação da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 1, durante a simulação de DM

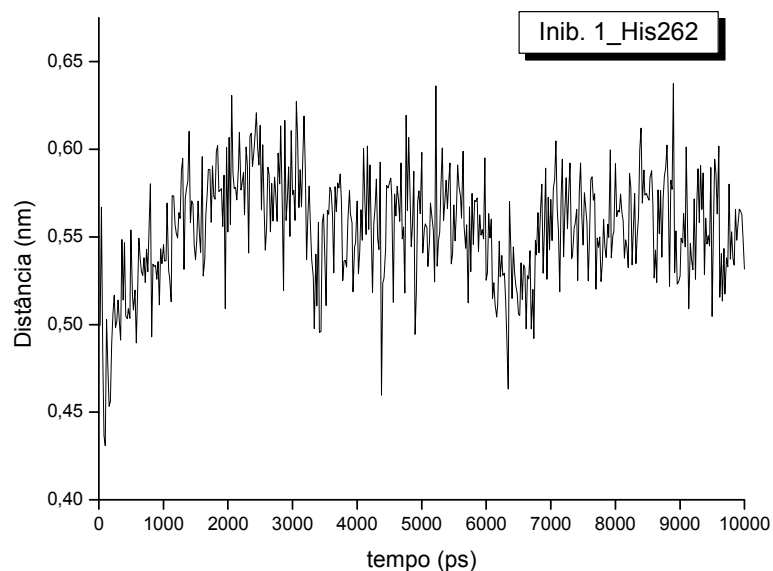


Gráfico 9 Variação da distância entre o resíduo His262 e o inibidor **1**, durante a simulação de DM

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que o inibidor **1** realiza ligação de hidrogênio com 8 resíduos de aminoácidos. Como observado na dinâmica molecular, este inibidor chegou a formar 6 ligações de hidrogênio com a *Bs*NH nos primeiros picossegundos de simulação (Gráfico 10), duas interações a menos do que observado no estudo de *docking*. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de alguns aminoácidos possuírem ligações fracas, que são fáceis de romper no decorrer da dinâmica.

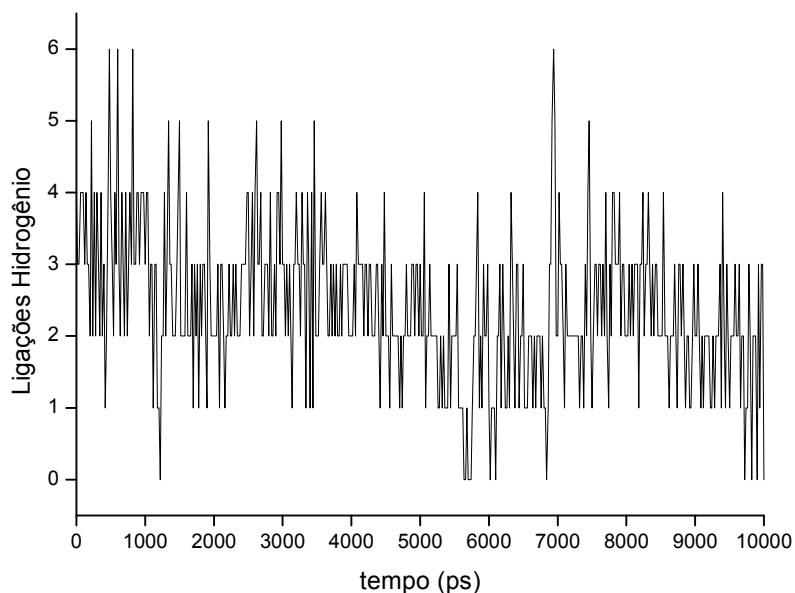


Gráfico 10 Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor **1** e a *BsNH*

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o inibidor **2**, no sítio ativo da *BsNH* (Figura 21), mostrou que este inibidor permaneceu durante toda a dinâmica entre os resíduos Phe188, His262, Asn101 e Glu100. É importante observar que todos os resíduos de aminoácidos citados anteriormente, de acordo com o estudo por ancoramento molecular, não realizam ligação de hidrogênio com o inibidor **2**, porém, durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos se acomodam próximos da nucleobase do inibidor **2** (Figura 21) e provavelmente realizam algum tipo de interação, contribuindo assim, para a permanência deste inibidor no interior do sítio ativo.

Também é importante observar na Figura 21, que o inibidor **2** apresenta um menor número de resíduos próximos da nucleobase quando comparado ao inibidor **1** (Figura 20). Este fato provavelmente pode ser responsável pela menor

estabilidade do inibidor **2** com relação ao inibidor **1** no interior do sítio ativo, resultado também sugerido no estudo por ancoramento molecular.

De acordo com os gráficos de distância (Gráfico 11), foi possível observar que o resíduo Phe188 estabilizou-se em uma distância entre 5,0 e 6,0 Å do inibidor **2**, já a His262 estabilizou-se em uma distância entre 4,5 e 5,5 Å (Gráfico 12). A Asn101 começou em uma distância de 11 Å, se aproximou do inibidor **2** e estabilizou-se após os 5000 ps de dinâmica entre aproximadamente 8,0 e 9,5 Å (Gráfico 13). Por último, observou-se que o resíduo Glu100 começou em 12 Å e se aproximou do inibidor **2** a partir dos 3000 ps de dinâmica, estabilizando-se entre as distâncias de aproximadamente 6,5 e 7,5 Å (Gráfico 14).

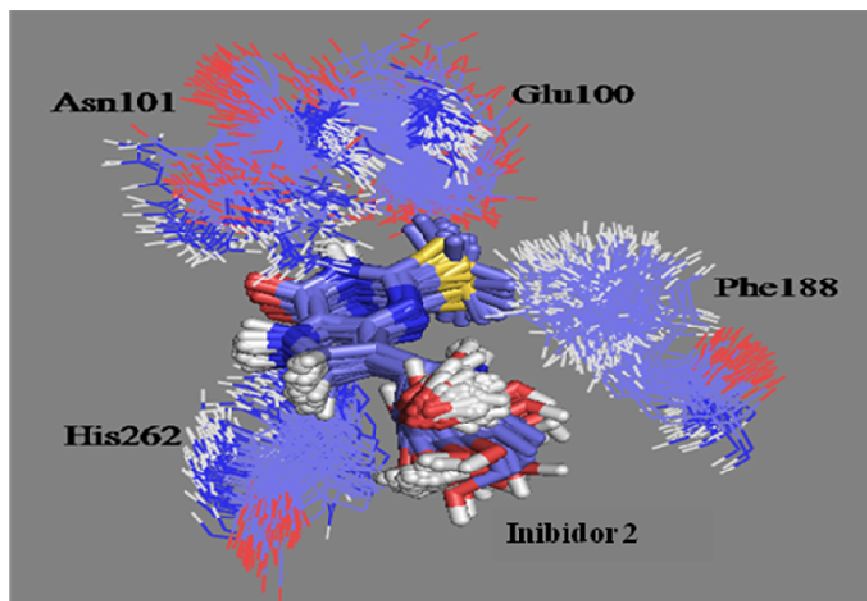


Figura 21 Quadros da dinâmica molecular do inibidor **2** no sítio ativo da BsNH

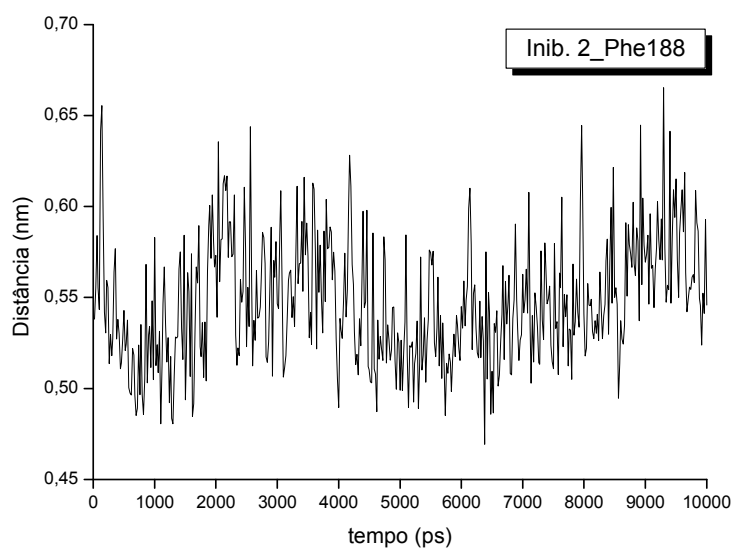


Gráfico 11 Variação da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 2, durante a simulação de DM

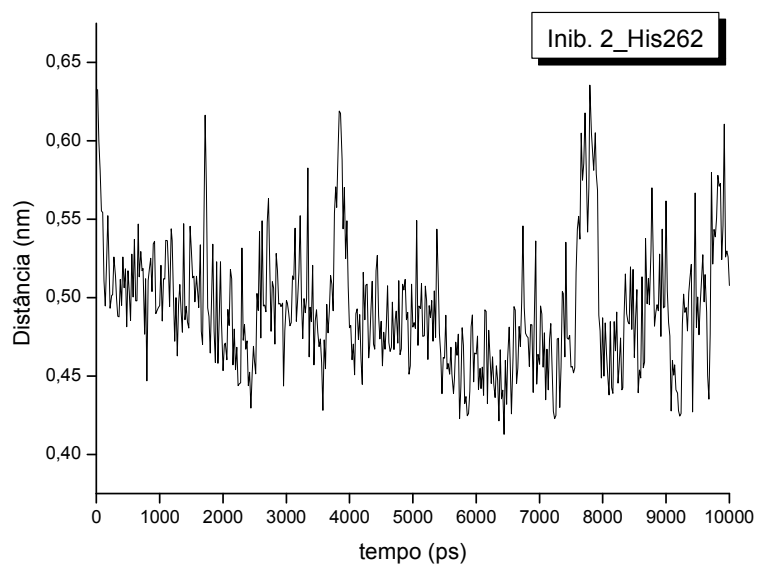


Gráfico 12 Variação da distância entre o resíduo His262 e o inibidor 2, durante a simulação de DM

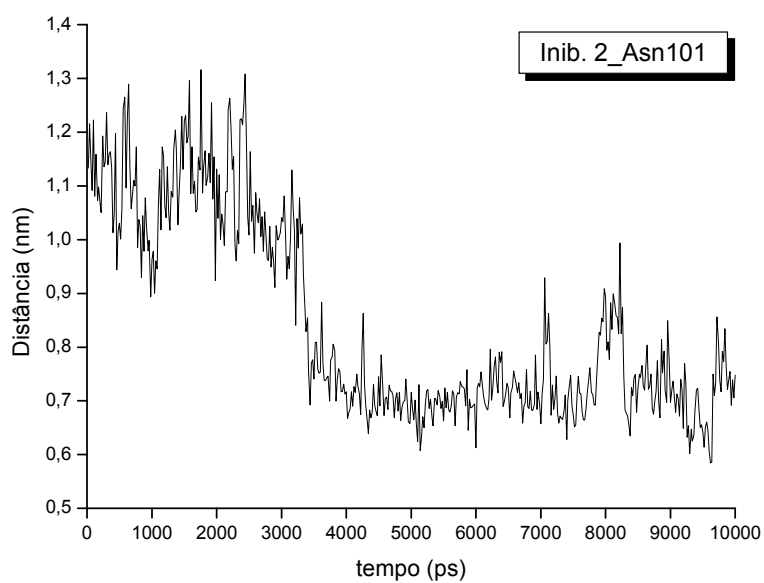


Gráfico 13 Variação da distância entre o resíduo Asn101 e o inibidor 2, durante a simulação de DM

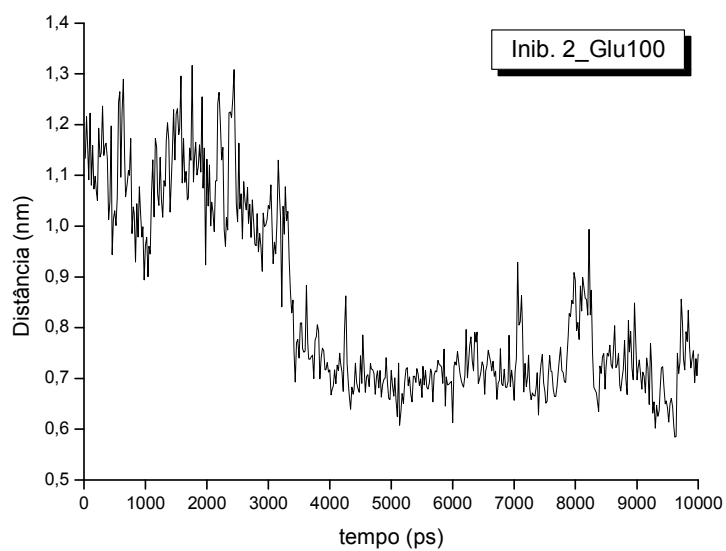


Gráfico 14 Variação da distância entre o resíduo Glu100 e o inibidor 2, durante a simulação de DM



De acordo com a dinâmica molecular, observou-se que o inibidor **2** chegou a formar até 7 ligações de hidrogênio com a *BsNH*, a partir dos 4000 ps de simulação e se estabilizou entre 3 e 5 ligações de hidrogênio (Gráfico 15) corroborando com os estudos de ancoramento molecular, onde foi observado que este inibidor realiza 6 ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no interior do sítio ativo.

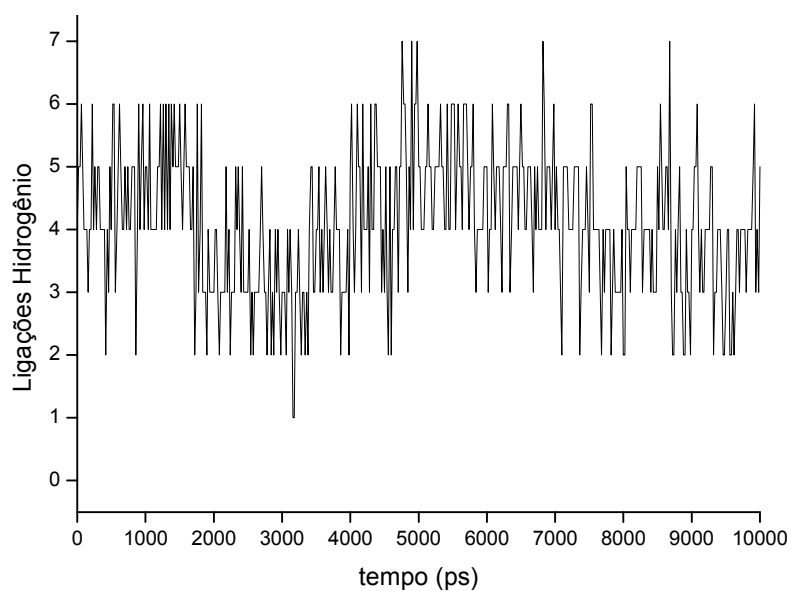


Gráfico 15 Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor **2** e a *BsNH*

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o inibidor **3** no sítio ativo (Figura 22), foi possível observar que este inibidor permaneceu entre os resíduos Phe188 e Asn181 durante toda a dinâmica. Entretanto, como pode-se observar na Figura 22, este inibidor mudou bastante de posição, quando

comparado aos inibidores **1** e **2**, ou seja, este inibidor não está fortemente ligado ao sítio ativo, corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

De acordo com os estudos por ancoramento molecular, os resíduos Phe188 e Asn181 não realizam ligação de hidrogênio com o inibidor **3**. Porém, durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos podem ter contribuído para a permanência deste inibidor no interior do sítio ativo, já que eles permanecem próximos do inibidor durante toda a simulação.

De acordo com os gráficos de distância, observou-se que o resíduo Phe188 permaneceu a maior parte da dinâmica entre as distâncias de aproximadamente 5,0 e 6,0 Å do inibidor **3** (Gráfico 16). Já a Asn181 começou em uma distância de aproximadamente 8,0 Å. Ao longo da dinâmica ela se aproximou e se estabilizou em uma distância entre aproximadamente 6,0 Å e 7,5 Å do inibidor **3** após 3000 ps de simulação (Gráfico 17).

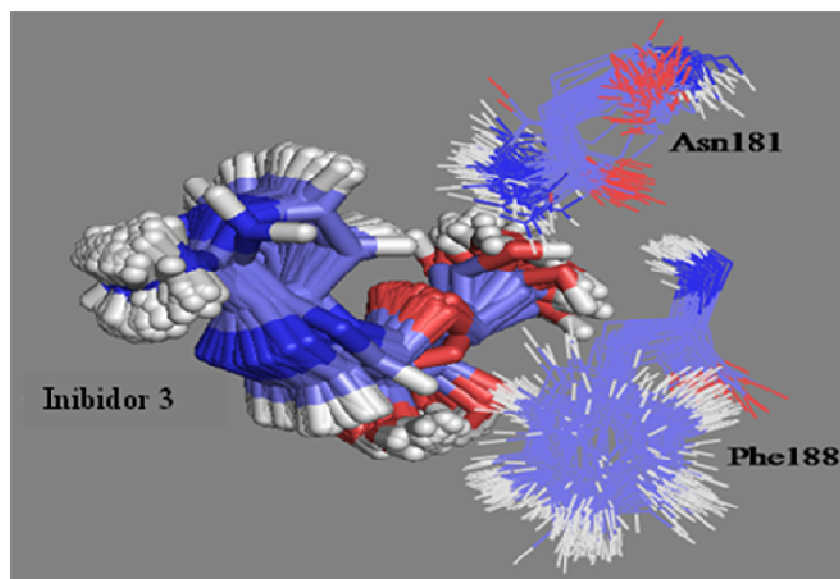


Figura 22 Quadros da dinâmica molecular do inibidor **3** no sítio ativo da *BsNH*

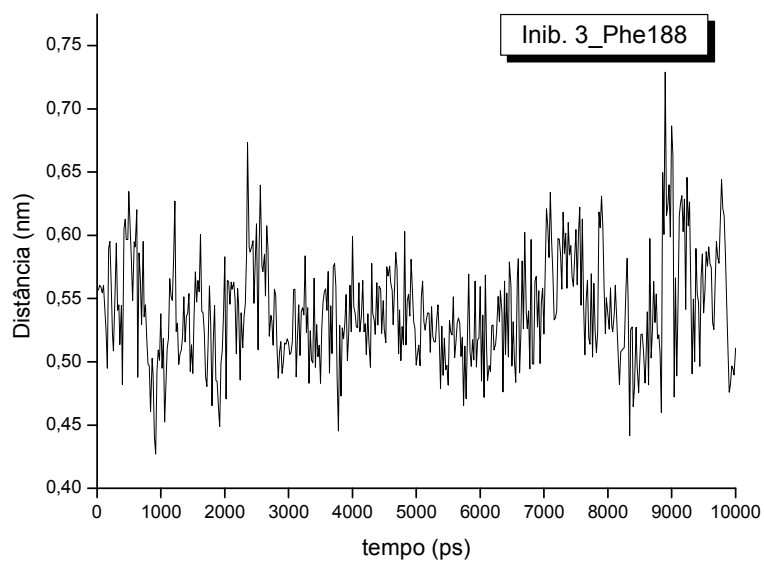


Gráfico 16 Variação da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 3 durante a simulação de DM

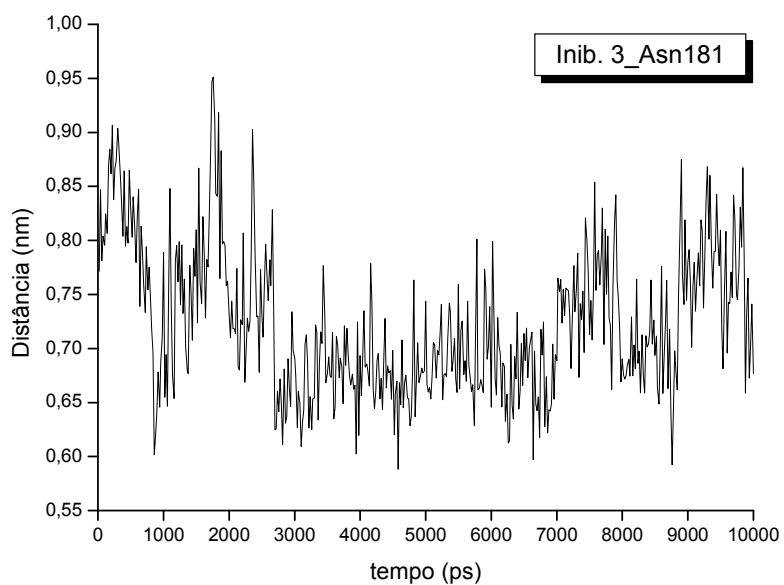


Gráfico 17 Variação da distância entre o resíduo Asn181 e o inibidor 3, durante a simulação de DM

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que o inibidor **3** realiza ligação de hidrogênio com 6 resíduos de aminoácidos, resultado semelhante ao sugerido pela dinâmica molecular por meio da análise do número de ligações de hidrogênio formadas. Como é mostrado no Gráfico 18, houve a formação de até 7 ligações de hidrogênio entre o inibidor **3** e a *BsNH*, com a permanência de 3 a 4 ligações desde os primeiros picossegundos até final da simulação.

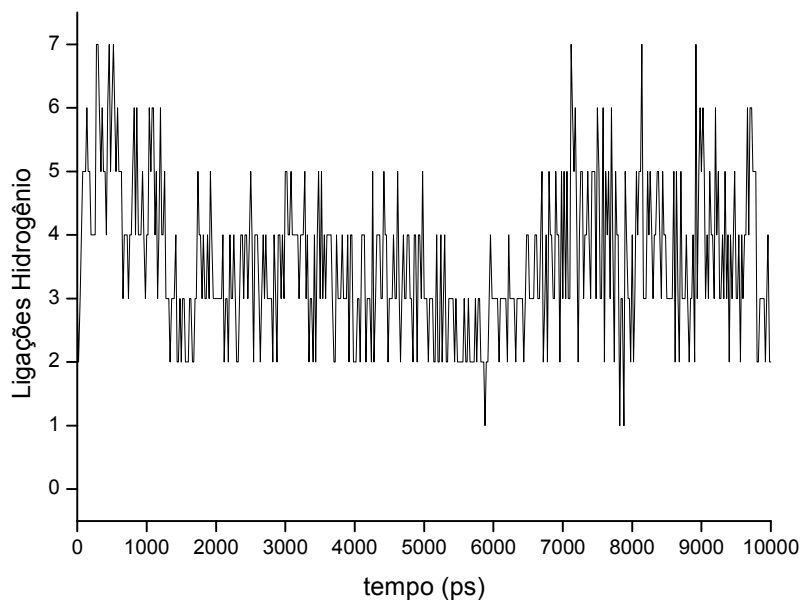


Gráfico 18 Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor **3** e a *BsNH*

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o inibidor **4** no sítio ativo (Figura 24), foi possível observar que este inibidor oscilou bastante em torno da sua posição inicial. Resultado também sugerido pelo estudo por ancoramento molecular, onde foi possível observar que este inibidor possui uma menor estabilidade no interior do sítio ativo quando comparado aos outros inibidores.

De acordo com a Figura 23, foi possível observar que o inibidor **4** permanece durante toda a dinâmica entre os resíduos Phe188, Asn60 e Gly59. Dentre estes resíduos, a Phe188 e a Gly59, de acordo com o estudo por ancoramento molecular, não realizam ligação de hidrogênio com o inibidor **4**, porém durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos permanecem próximos da nucleobase do inibidor e podem ter contribuído para sua permanência no interior do sítio ativo.

De acordo com os gráficos de distância, observou-se que o resíduo Phe188, durante os primeiros picossegundos de dinâmica até aproximadamente os 5000 ps, permaneceu entre 5,0 e 6,0 Å de distância do inibidor **4**. A partir dos 6000 ps até o final da simulação a Phe188 permaneceu entre aproximadamente 6,0 e 7,0 Å de distância do inibidor (Gráfico 19). Já a Gly59 começou em uma distância de 8,5 Å do inibidor **4** e somente a partir dos 5000 ps de dinâmica se estabilizou em uma distância entre aproximadamente 6,0 e 7,0 Å do inibidor (Gráfico 20). A grande variação de distância destes resíduos com relação ao inibidor **4**, observada durante a simulação, também contribui para a instabilidade deste inibidor no interior do sítio ativo. O gráfico de distância para o resíduo Asn60 se encontra no Apêndice E.

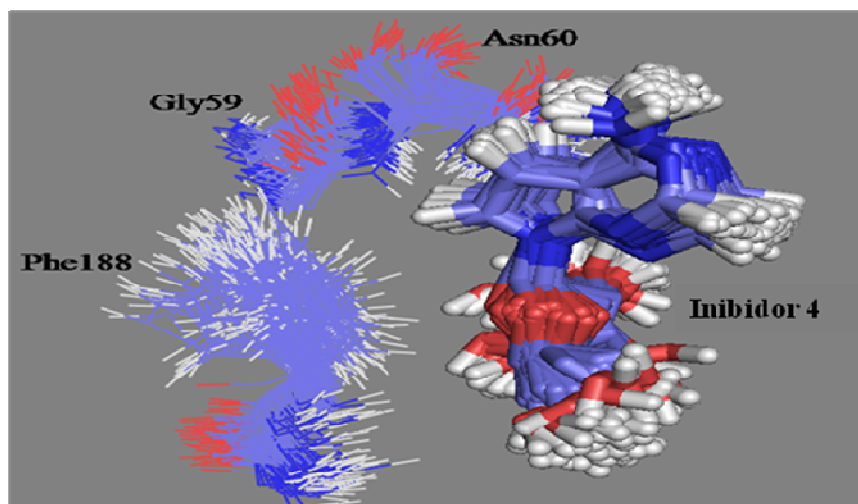


Figura 23 Quadros da dinâmica molecular do inibidor 4 no sítio ativo da *BsNH*

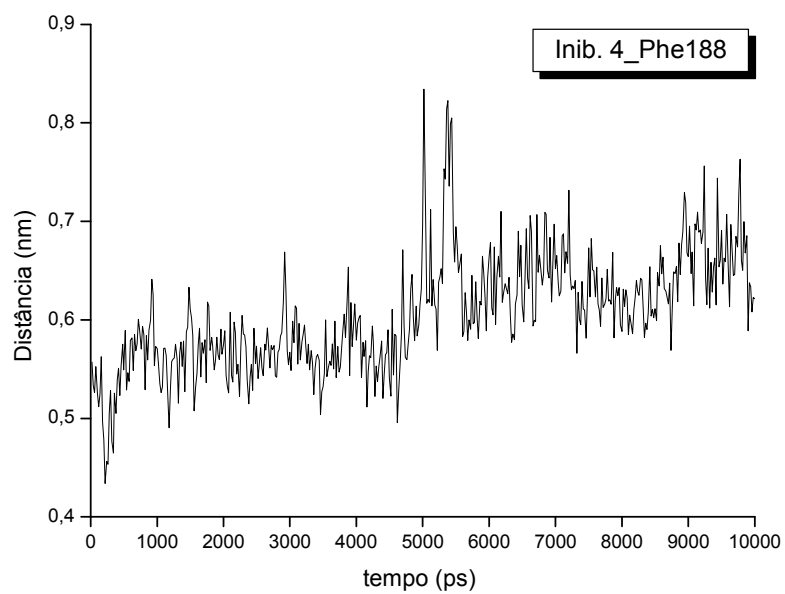


Gráfico 19 Variação da distância entre o resíduo Phe188 e o inibidor 4 durante a simulação de DM

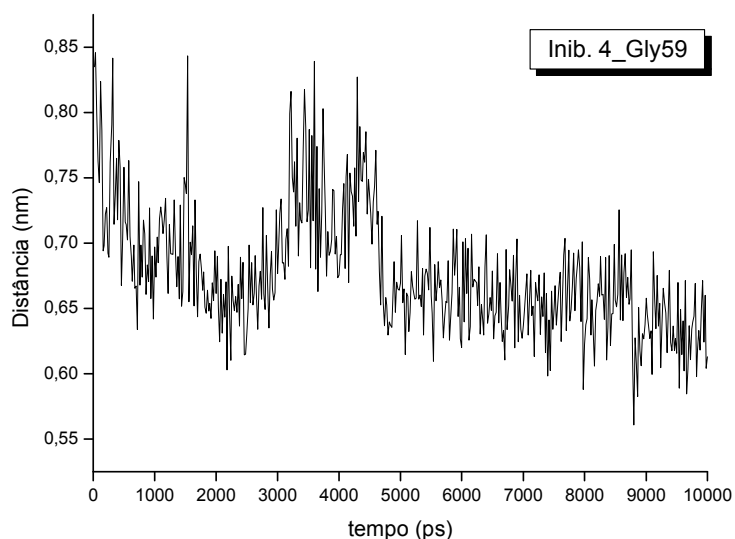


Gráfico 20 Variação da distância entre o resíduo Gly59 e o inibidor 4 durante a simulação de DM

De acordo com a dinâmica molecular, observou-se que o inibidor 4 chegou a formar até 9 ligações de hidrogênio com a *BsNH*, porém estas ligações são instáveis, permanecendo de 2 a 4 ligações durante um maior tempo de simulação (Gráfico 21). De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que o inibidor 4 realiza ligação de hidrogênio com 6 resíduos de aminoácidos. Essa diferença pode ser explicada pela provável instabilidade de alguns aminoácidos, que possuem interações fracas e são fáceis de romper no decorrer da dinâmica, o que pode ser explicado pelo fato de alguns aminoácidos possuírem ligações fracas, que são fáceis de romper no decorrer da dinâmica.

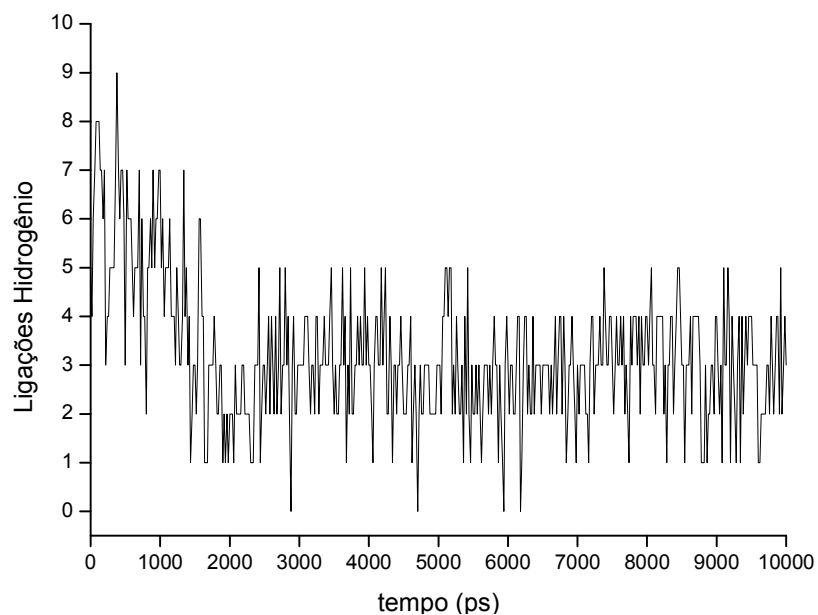


Gráfico 21 Número de ligações de hidrogênio formadas entre o inibidor **4** e a *BsNH*

### 5.5.3 Análise do comportamento dinâmico dos substratos no sítio ativo da *BsNH*

Também foram realizados estudos por dinâmica molecular entre a *BsNH* e os substratos naturais inosina, adenosina e uridina, com o objetivo de se avaliar o comportamento destes compostos no sítio ativo da *BsNH* e comparar com os resultados obtidos no estudo por ancoramento molecular discutidos na sessão 5.3.

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a inosina no sítio ativo da *BsNH* (Figura 24), foi possível observar que este substrato permaneceu preso dentro do sítio ativo durante toda a simulação. Este fato confirma a boa interação deste substrato no sítio ativo. Ou seja, ela apresenta



uma maior afinidade pela enzima, quando comparado aos substratos adenosina e uridina, corroborando com os resultados de ancoramento molecular e com os resultados experimentais descritos por Horenstein et al. (1991) e Versées et al. (2001).

Durante toda a dinâmica, foi possível observar que a inosina permaneceu entre os resíduos Phe188, Asn60, Asn101 e Gly59 (Figura 24). Dentre os resíduos citados anteriormente, somente a Phe188 e a Gly59, de acordo com o estudo por ancoramento molecular, não realizam ligação de hidrogênio com a inosina. Porém, durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos podem ter contribuído para a permanência deste substrato no interior do sítio ativo.

De acordo com os gráficos de distância, observou-se que o resíduo Phe188 começou em uma distância de 5,5 Å. Ao longo da dinâmica, ele se afastou e permaneceu entre as distâncias de aproximadamente 6,0 e 8,5 Å da inosina (Gráfico 22). Já a Gly59 permaneceu em uma distância entre 7,0 e 8,5 Å (Gráfico 23). Os gráficos de distância dos outros resíduos se encontram no Apêndice E.

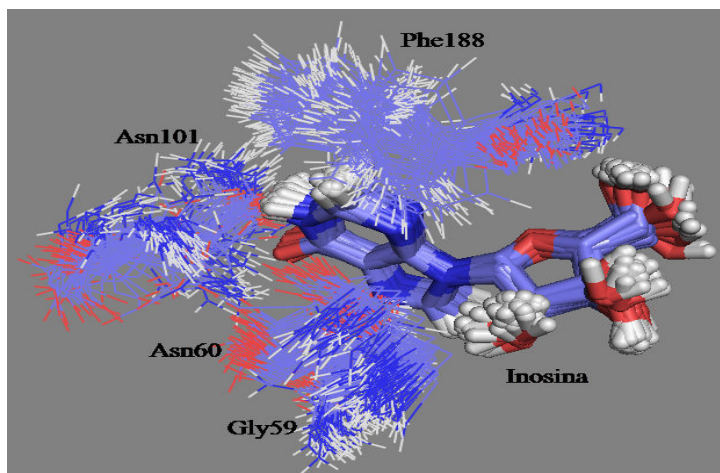


Figura 24 Quadros da dinâmica molecular da Inosina no sítio ativo da *BsNH*

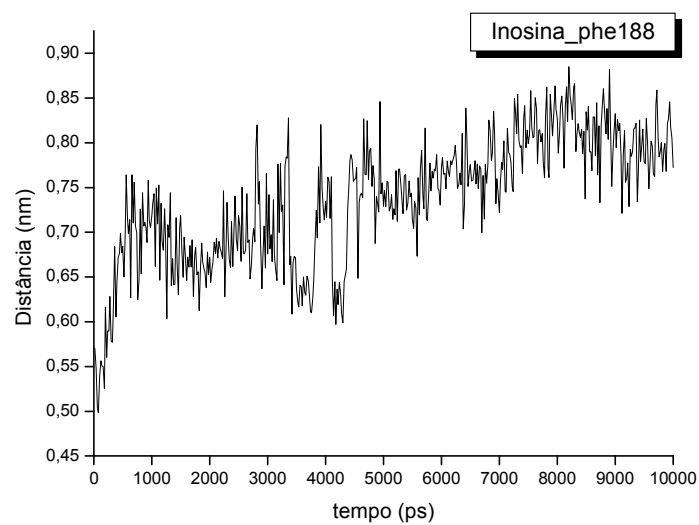


Gráfico 22 Variação da distância entre o resíduo Phe188 e a Inosina, durante a simulação de DM

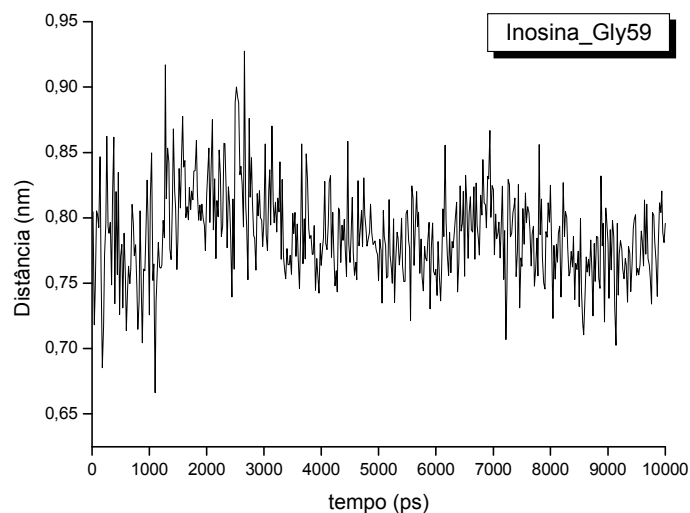


Gráfico 23 Variação da distância entre o resíduo Gly59 e a Inosina, durante a simulação de DM

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que a inosina realiza ligação de hidrogênio com 7 resíduos de aminoácidos, corroborando com os resultados obtidos nos estudos de dinâmica molecular. De acordo com o Gráfico 24, a inosina chegou a formar até 7 ligações de hidrogênio durante a simulação e manteve em torno de 5.

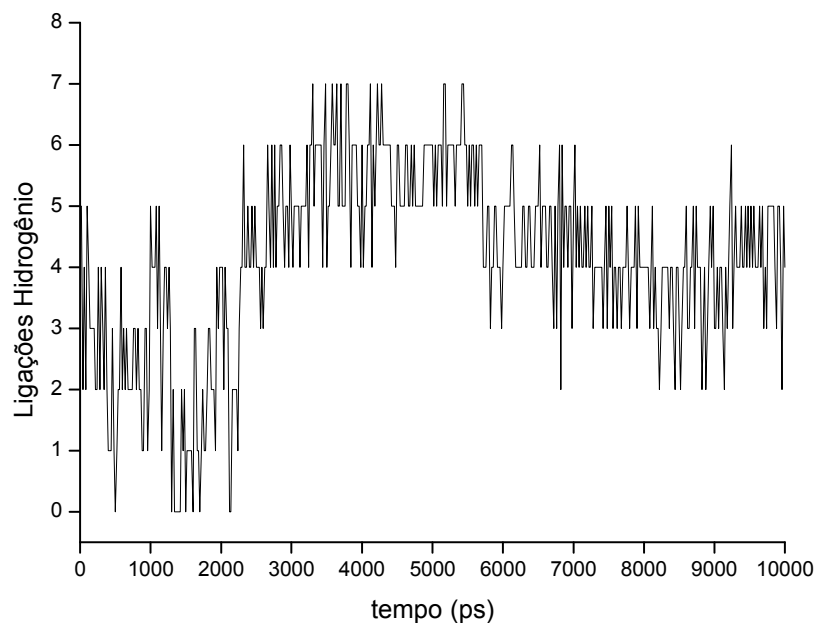


Gráfico 24 Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Inosina e a *B5NH*

A sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a adenosina no sítio ativo (Figura 25) mostrou que ela se comporta de forma semelhante à inosina, permanecendo durante toda a dinâmica entre os resíduos Phe188, Asn60, Asn101 e Gly59. Porém, de acordo com a Figura 25, a adenosina mostrou uma maior oscilação com relação a sua posição inicial quando comparada a inosina (Figura 24).

Dentre os resíduos de aminoácidos citados anteriormente, de acordo com o estudo por ancoramento molecular, somente a Phe188 e a Gly59, como também foi observado para inosina, não realizam ligação de hidrogênio com a adenosina. Porém, durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos se acomodam próximos da nucleobase do substrato (Figura

25) e, provavelmente, podem ter contribuído para a permanência da adenosina no interior do sítio ativo.

De acordo com os gráficos de distância, foi possível observar que o resíduo Phe188 começou em uma distância de 5,0 Å, aproximou-se da adenosina a partir dos 2000 ps e permaneceu até o final da simulação entre as distâncias de aproximadamente 4,5 e 6,0 Å (Gráfico 25). Já a Gly59 permaneceu a maior parte da simulação entre as distâncias de aproximadamente 6,0 e 7,5 Å da adenosina (Gráfico 26). Os gráficos de distância dos outros resíduos se encontram no Apêndice E.

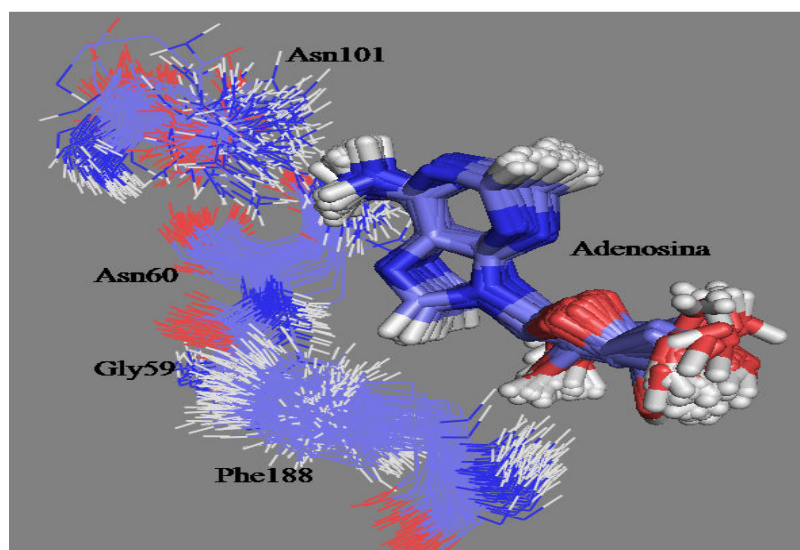


Figura 25 Quadros da dinâmica molecular da Adenosina no sítio ativo da *BsNH*

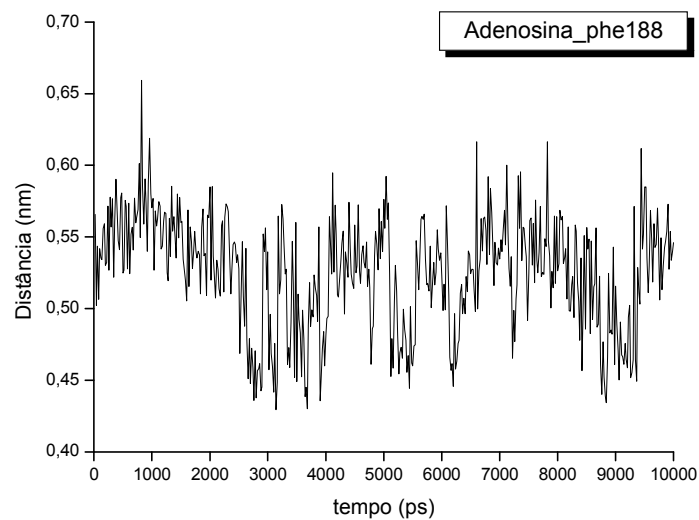


Gráfico 25 Variação da distância entre o resíduo Phe188 e a Adenosina, durante a simulação de DM

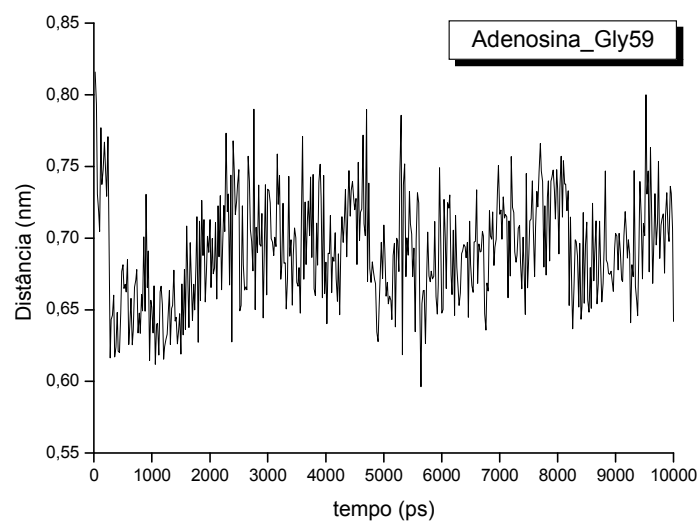


Gráfico 26 Variação da distância entre o resíduo Gly59 e a Adenosina, durante a simulação de DM

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que a adenosina realiza ligação de hidrogênio com 7 resíduos de aminoácidos. Como observado na dinâmica molecular, este substrato chegou a formar até 9 ligações de hidrogênio com a *BsNH* nos primeiros picossegundos e se estabiliza entre 4 e 6 ligações de hidrogênio durante toda a dinâmica (Gráfico 27), corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

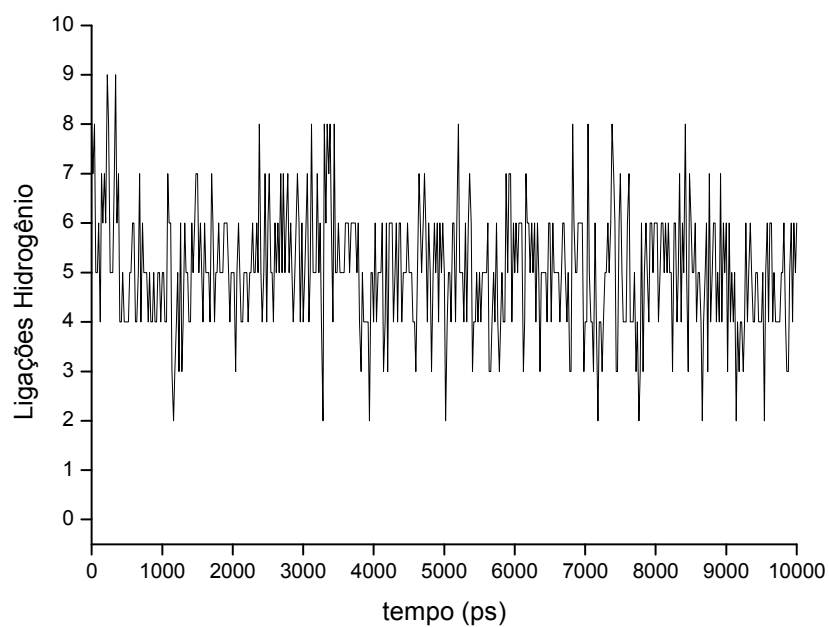


Gráfico 27 Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Adenosina e a *BsNH*

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a uridina no sítio ativo (Figura 26), foi possível observar que ela permaneceu durante toda dinâmica, apenas entre os resíduos Asn101 e Asp35. Este fato confirma que a uridina não possui uma boa interação no sítio ativo. Ou seja, ela apresenta uma menor afinidade pela enzima quando comparado aos substratos inosina e adenosina, corroborando com os resultados de ancoramento molecular e com os resultados experimentais descritos por Horenstein et al. (1991) e Versées et al. (2001).

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que o resíduo Asp35 não realiza ligação de hidrogênio com a uridina. Porém, com o estudo de dinâmica molecular, observou-se que este aminoácido provavelmente é importante para a permanência deste substrato no sítio ativo, já que ele permanece próximo da uridina durante toda simulação (Figura 26).

De acordo com os gráficos de distância, observou-se que o resíduo Asp35 começou em uma distância de aproximadamente 6,7 Å, em seguida se afastou e permaneceu entre as distâncias de aproximadamente 7,0 e 8,0 Å da uridina, a partir dos 4000 ps de dinâmica (Gráfico 28). O gráfico de distância para o resíduo Asn101 se encontra no Apêndice E.



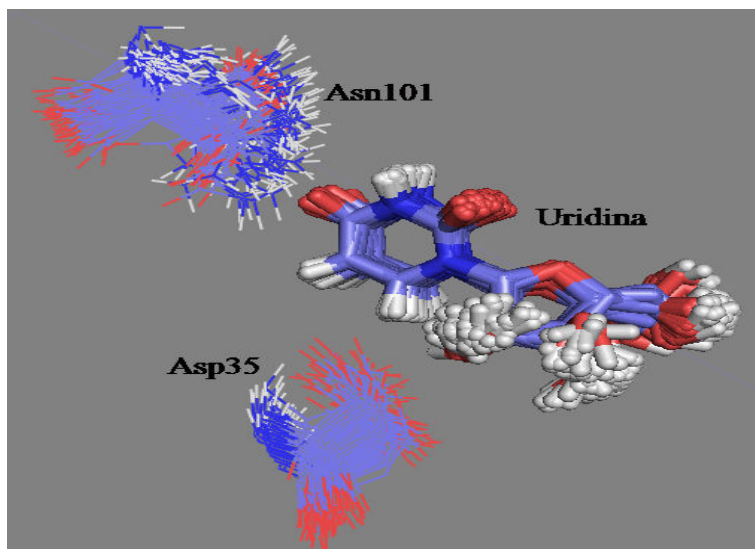


Figura 26 Quadros da dinâmica molecular da Uridina no sítio ativo da *BsNH*

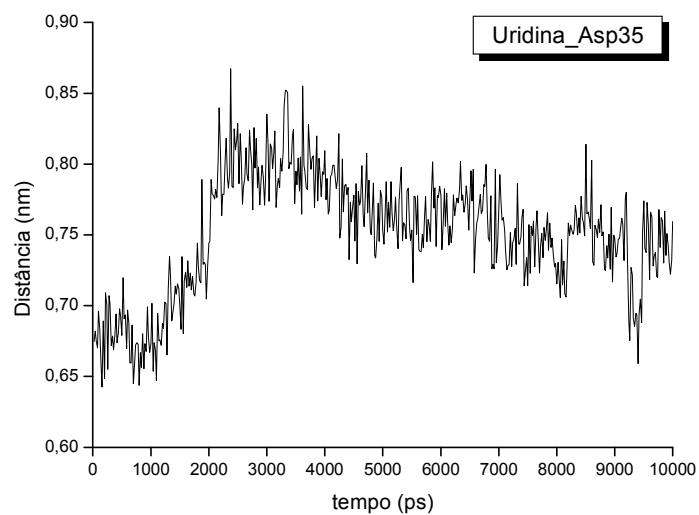


Gráfico 28 Variação da distância entre o resíduo Asp35 e a Uridina, durante a simulação de DM

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que a uridina realiza ligação de hidrogênio com 7 resíduos de aminoácidos. Como observado na dinâmica molecular, este substrato chegou a formar até 6 ligações de hidrogênio com a *BsNH* (Gráfico 29), uma ligação a menos do que observado no estudo por ancoramento molecular. Esta diferença pode ser explicada pela provável instabilidade de alguns aminoácidos, que possuem interações fracas e são fáceis de romper no decorrer da dinâmica.

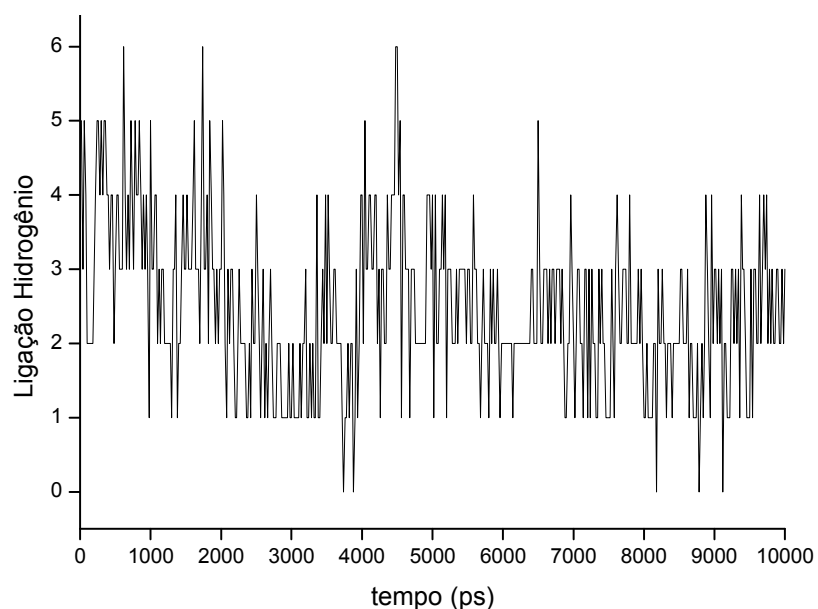


Gráfico 29 Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Uridina e a *BsNH*

É importante observar, que tanto para o estudo de dinâmica molecular entre os quatro inibidores e a *BsNH*, quanto entre os substratos e a *BsNH*, o resíduo de aminoácido Phe188 se encontra próximo destes ligantes em todos os

quadros da simulação. De acordo com os estudos de dinâmica molecular, observou-se que este resíduo também faz parte do sítio ativo da *BsNH*, sendo bastante importante para a estabilidade de todos estes ligantes no interior do sítio ativo. Este resultado não foi observado no estudo por ancoramento molecular.

Já o resíduo Asn101, se encontra próximo de todos os substratos naturais e dos inibidores **1** e **2** em todos os quadros da simulação. Ou seja, foi observado que este resíduo também pertence ao sítio ativo da *BsNH* e também é muito importante para a estabilidade destes ligantes. Resultado também observado nos estudos por ancoramento molecular.

#### **5.5.4 Análise do comportamento dinâmico do inibidor 1 e do substrato natural inosina no sítio ativo da *CfNH***

De acordo com os estudos anteriores, o inibidor **1** foi considerado o melhor inibidor e a inosina o melhor substrato, dentre os compostos estudados, para *BsNH*. Com isso, também foi avaliado o comportamento destes dois ligantes no sítio ativo da *CfNH*, a fim de validar a metodologia utilizada.

Para visualização do comportamento dinâmico do inibidor **1** e da inosina dentro do sítio ativo da *CfNH*, foram selecionados, para cada sistema, os resíduos diretamente envolvidos com as principais interações com cada ligante. Ou seja, aqueles resíduos responsáveis pela estabilização dos mesmos no interior do sítio ativo. Esta seleção foi realizada levando em consideração os resultados obtidos nos estudos por ancoramento molecular discutidos na sessão 5.4, bem como também alguns importantes resíduos que não foram observados naqueles estudos.

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para o inibidor **1** no sítio ativo da *CfNH* (Figura 27), foi possível observar que este inibidor permaneceu preso dentro do sítio ativo durante toda a simulação. Este fato

confirma a boa interação deste inibidor com a enzima, corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

Durante toda a dinâmica, observou-se que o inibidor **1** permaneceu entre os resíduos Phe167, Asn160, Tyr225 e Tyr229 (Figura 27). De acordo com o estudo por ancoramento molecular, nenhum dos resíduos citados anteriormente realiza ligação de hidrogênio com o inibidor **1**, porém, durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos podem ter contribuído para a permanência deste inibidor no interior do sítio ativo. Como pode-se observar na Figura 28, o resíduo Phe167 realiza interação hidrofóbica ( $\pi$ -stacking) com o inibidor **1** durante a simulação, sendo considerado um resíduo importante para a estabilização deste inibidor no sítio ativo da C<sub>N</sub>H.

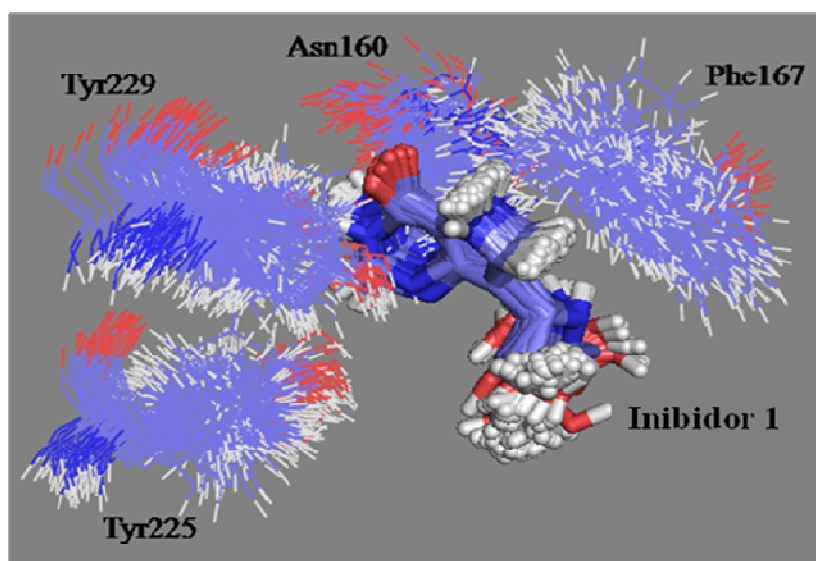


Figura 27 Quadros da dinâmica molecular do inibidor **1** no sítio ativo da C<sub>N</sub>H

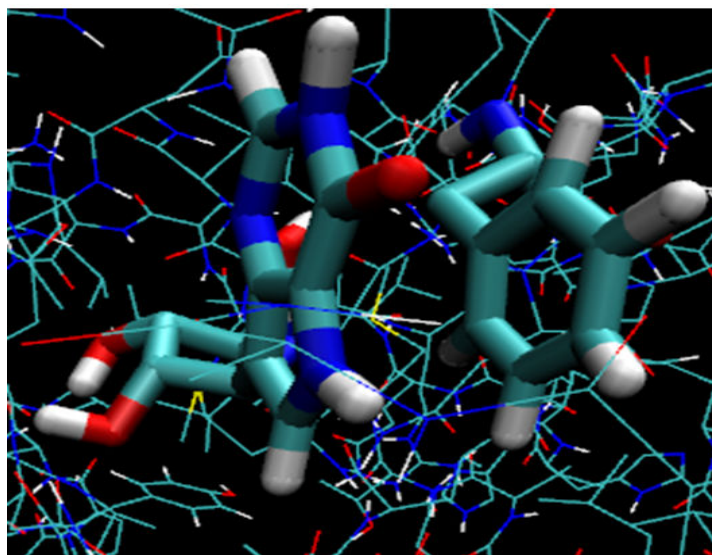


Figura 28 Interação hidrofóbica entre o resíduo Phe167 e o inibidor **1** observada durante a DM

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, foi possível observar que o inibidor **1** realiza ligação de hidrogênio com 6 resíduos de aminoácidos. Como observado na dinâmica molecular, este inibidor chegou a formar até 10 ligações de hidrogênio nos primeiros picossegundos e se estabilizou entre 3 e 5 ligações de hidrogênio durante a maior parte da dinâmica (Gráfico 30), corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

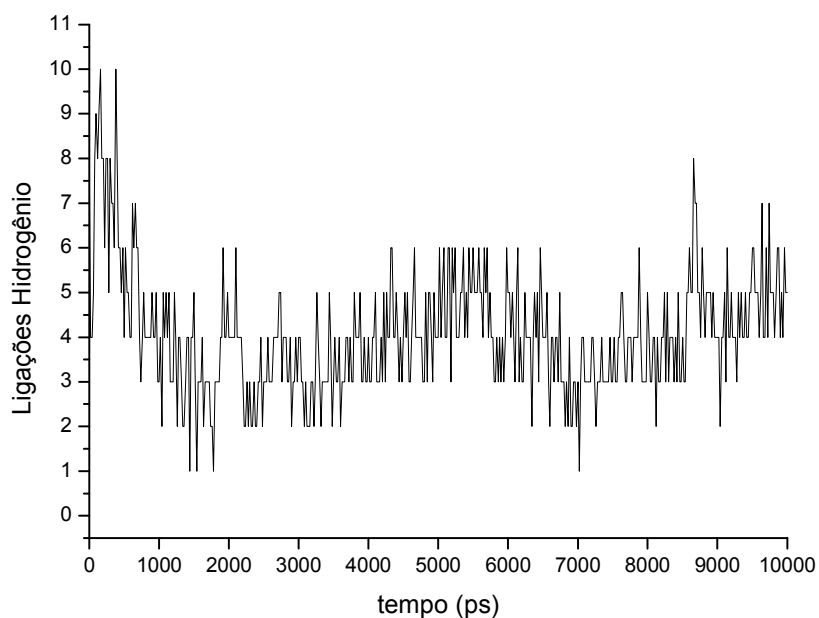


Gráfico 30 Número de ligações de hidrogênio formadas entre o Inibidor 1 e a  $C7NH$

Com a sucessão dos quadros da dinâmica molecular para a inosina no sítio ativo da  $C7NH$  (Figura 29), observou-se que ela permaneceu presa dentro do sítio ativo durante toda a simulação. Este fato confirma a boa interação da inosina com a enzima, corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

Durante toda a dinâmica foi possível observar que a inosina permaneceu entre os resíduos His82, Arg233, Asn39, Tyr225 e Tyr229 (Figura 29). Dentre os resíduos citados anteriormente, de acordo com os estudos por ancoramento molecular, somente a Tyr225, Tyr229 e a Arg233 não realizam ligação de hidrogênio com a inosina. Porém, durante o estudo de dinâmica molecular foi possível observar que estes resíduos permanecem muito próximos da nucleobase

durante toda simulação e provavelmente interagem com a inosina, ou seja, eles podem ter contribuído para a permanência deste substrato no interior do sítio ativo da *CfNH*.

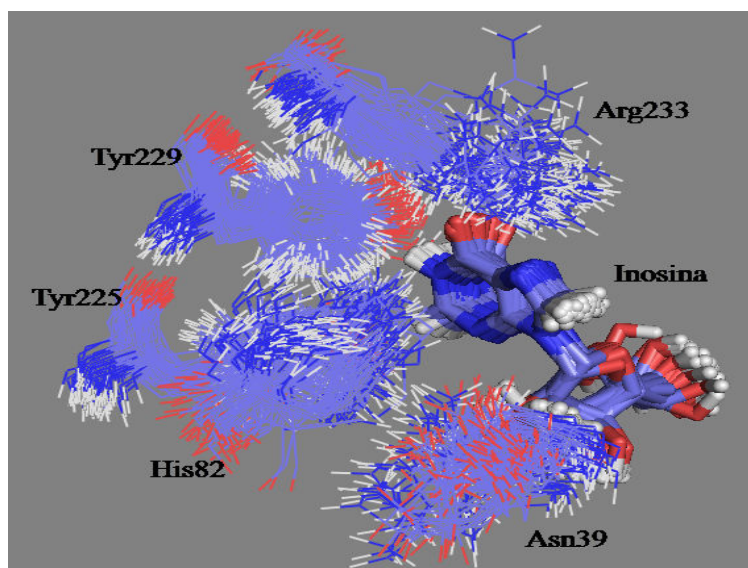


Figura 29 Quadros da dinâmica molecular da Inosina no sítio ativo da *CfNH*

De acordo com o estudo por ancoramento molecular, observou-se que a inosina realiza ligação de hidrogênio com 7 resíduos de aminoácidos. Como observado na dinâmica molecular, este substrato chegou a formar até 9 ligações de hidrogênio e se estabilizou entre 4 e 6 ligações de hidrogênio durante a maior parte da dinâmica (Gráfico 31), corroborando com os resultados de ancoramento molecular.

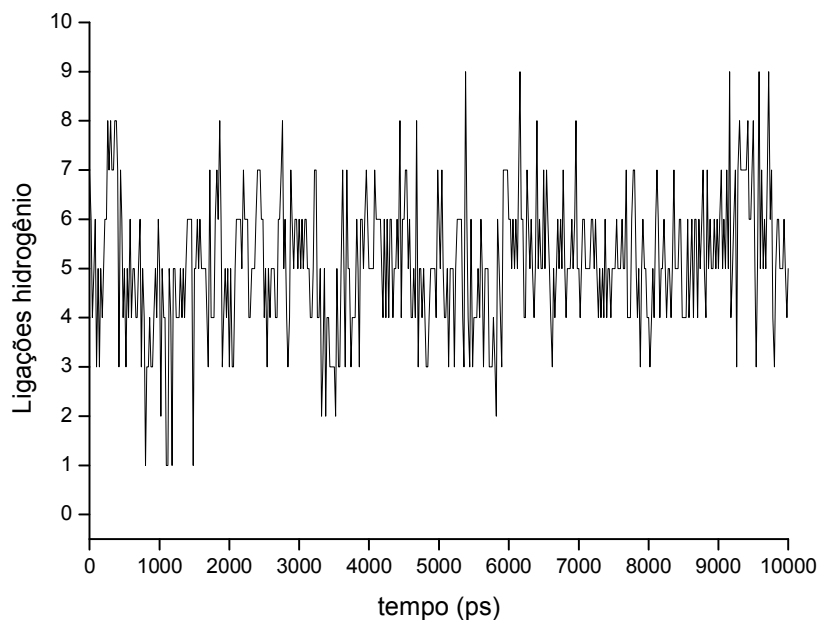


Gráfico 31 Número de ligações de hidrogênio formadas entre a Inosina e a  $C7NH$

De acordo com os estudos de dinâmica molecular, foi possível observar que os resíduos Tyr225, Tyr229 e Phe167 também fazem parte do sítio ativo da  $C7NH$ , sendo bastante importantes para a estabilidade de todos estes ligantes no interior do sítio ativo. Este resultado não foi observado no estudo por ancoramento molecular.

Outro aspecto importante, observado no estudo de dinâmica molecular, foi que o inibidor **1** se comporta de forma semelhante no sítio ativo da  $BsNH$  e  $C7NH$ , interagindo com praticamente os mesmos aminoácidos. Este resultado certamente sugere mais uma vez que é possível se utilizar inibidores de  $C7NH$  como ponto de partida em estudos de modelagem molecular para a proposição de inibidores seletivos de  $BsNH$ .



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a grande identidade sequencial (45,1%) entre a enzima molde e a enzima alvo, foi possível construir um modelo consistente para a estrutura tridimensional da *BsNH* com uma excelente qualidade estereoquímica. Esta enzima modelada permitiu a realização dos estudos de *docking* e dinâmica do presente trabalho.

Os resultados obtidos mostraram que a *BsNH* pode ser um alvo no combate a brucelose e que os inibidores de *CfNH* estudados neste trabalho são promissores inibidores desta enzima. A análise dos resultados dos cálculos de energia por ancoramento molecular mostraram que há uma correlação linear entre os resultados teóricos e experimentais para os inibidores em ambas as enzimas, *BsNH* e *CfNH*. Resultado este que valida o ancoramento molecular como uma técnica capaz de prever qualitativamente a afinidade de um ligante por determinado alvo molecular.

Dentre os inibidores estudados, o inibidor **1** foi eleito como o mais promissor a protótipo inibidor para a *BsNH*, uma vez que apresenta um menor valor de energia de interação intermolecular quando comparado aos outros inibidores e com os substratos naturais. Além disso, apresenta uma maior estabilidade no sítio ativo, bem como menores valores de energia de ligação de hidrogênio total e de constante de inibição, quando comparado aos demais inibidores estudados.

Os resultados obtidos pelas simulações por dinâmica molecular dos inibidores e substratos nos sítios ativos da *BsNH* e *CfNH* confirmam os resultados obtidos com o ancoramento molecular, mostrando que estes inibidores permanecem bem ancorados dentro do sítio ativo durante o tempo simulado, em todos os sistemas.

Foi possível observar a proximidade e a permanência dos resíduos que realizaram ligações de hidrogênio com cada inibidor, assim como o número médio dessas ligações. Corroborando com os resultados sugeridos pelo ancoramento molecular.

Os cálculos de energia de ancoramento molecular, aliados às simulações por dinâmica molecular, sugerem que o inibidor **1**, como mencionado anteriormente, é o mais promissor para o planejamento de potenciais inibidores para a *BsNH* e a presença de alguns aminoácidos como Phe188, His262, Asn60, Asn101 e Asn181 são importantes para a estabilidade deste inibidor no sítio ativo da *BsNH*. Ou seja, sugere-se de acordo com estes estudos, que os resíduos de aminoácidos Asn101, His262 e Phe188 também fazem parte do sítio ativo da *BsNH*, interagindo na maioria dos casos, com os inibidores e substratos naturais estudados.

Observou-se também que, tanto os resultados de energia intermolecular obtidos no ancoramento molecular quanto os resultados de dinâmica molecular, foram melhores para os inibidores **1-4** e a enzima *CjNH*. Isso já era esperado, tendo em vista que os inibidores estudados neste trabalho são de *CjNH*.

**REFERÊNCIAS**

AALTEN, D. M. F. et al. PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, Dordrecht, v. 10, n. 3, p. 255-262, June 1996.

ABDO, M. R. et al. Brucella suis histidinol dehydrogenase: synthesis and inhibition studies of a series of substituted benzylic ketones derived from histidine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 15, n. 13, p. 4427-4433, July 2007.

AL-TAWFIQ, J. A. Brucella epididymo-orchitis: a consideration in endemic area. **Brazilian Journal of Urology**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 313-315, May/June 2006.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.

AYGEN, B. et al. Clinical manifestations, complications and treatment of brucellosis: a retrospective evaluation of 480 patients. **Medecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 32, n. 9, p. 485-493, Sept. 2002.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 235-242, Jan. 2000.

BROOKS, B. R. et al. Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, Malden, v. 4, n. 2, p. 187-217, Sept. 1983.

BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. Molecular mechanics. In: \_\_\_\_\_. **American chemical society**. Washington: ACS, 1982. p. 64-72. (ACS Monograph, 177).

CADDIGAN, E. J. et al. **VMD user's guide**. Urbana: University of Illinois; Beckman Institute, 2004. Disponível em:  
<<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

CAETANO, M. S. **Estudos computacionais entre análogos do glifosato e a enzimas EPSP sintase nativa e mutante Gly96Ala**. 2007. 53 p. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CARDOSO, T. A. O. et al. Biosseguridade e biosseguranssa: aplicabilidade da segurança biológica. **Interciencia**, Catanduva, v. 33, n. 8, p. 561-568, ago. 2008.

CARRERA, I. A. et al. Probable transmission of brucellosis by breast milk. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 52, n. 5, p. 380-381, Oct. 2006.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, maio/jun. 2003.

COLMENERO, J. D. et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. **Medicine**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 195-211, July 1996.

CUI, L.; RAJASEKARIAH, G. R.; MARTIN, S. K. A. Nonspecific *Nucleoside Hydrolase* from *Leishmania donovani*: implications for purine salvage by the parasite. **Gene**, Amsterdam, v. 280, n. 1, p. 153-162, Dec. 2001.

CUTLER, S. J.; WHATMORE, A. M.; COMMANDER, N. J. Brucellosis: new aspects of an old disease. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 6, p. 1270-1281, June 2005.

DEGANO, M. et al. Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside N-Ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. **Biochemistry**, New York, v. 35, n. 19, p. 5971-5981, May 1996.

\_\_\_\_\_. Trypanosomal nucleoside hydrolase: a novel mechanism from the structure with a transition-state inhibitor. **Biochemistry**, New York, v. 37, n. 18, p. 6277-6285, Apr. 1998.

DIOMEDI, A. P. La guerra biológica en la conquista del nuevo mundo: una revisión histórica y sistemática de la literatura. **Revista Chilena Infectologia**, Santiago, v. 20, n. 1, p. 19-25, 2003.

EDWARDS, P. M. Origin 7.0: scientific graphing and data analysis software. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, v. 42, n. 5, p. 1270-1271, Sept./Oct. 2002.

EL-KOUNI, M. H. et al. Metabolism and selective toxicity of 6-Nitrobenzylinosine in *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 43, n. 10, p. 2437-2443, Oct. 1999.

ESTUPIÑÁN, B.; SCHRAMM, V. L. Guanosine-inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 37, p. 23068-23073, Sept. 1994.

FERNANDES, A. C.; OLIVEIRA, W. A arma bacteriológica como ameaça à ordem mundial: histórico, riscos e efeitos. **Revista Eletrônica de Relações Internacionais do Centro Universitário Unieuro**, Brasília, n. 4, p. 1809-1861, 2009.

FRANÇA, T. C. C. **Modelagem molecular da serina hidroximetiltransferase de *Plasmodium Falciparum*: modelos tridimensionais e proposta de potenciais inibidores seletivos**. 2004. 232 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.

FRANÇA, T. C. C. et al. Design of inhibitors for nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* using molecular dynamics studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 64-73, Jan. 2008a.

\_\_\_\_\_. Questão da defesa contra agentes de guerra biológica nas Forças Armadas e no Brasil. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 56-67, 2008b.

FRANCO, M. P. et al. Human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 7, n. 12, p. 775-786, Dec. 2007.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 98, revision A.11**. Pittsburg: Gaussian, 2001. Software.

FRISCHKNECHT, F. The history of biological warfare: human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century. **Embo Reports**, Oxford, v. 4, p. S47-S52, June 2003. Supplement.

GARIN, Y. J. F. et al. Assessment of Leishmania promastigote growth in vitro by means of nucleoside hydrolase activity determination. **Parasitology Research**, Berlin, v. 87, n. 2, p. 145-148, Feb. 2001.

GLASGOW, M. M. Brucellosis of spine. **British Journal of Surgery**, Guildford, v. 63, n. 4, p. 283-288, Apr. 1976.

GODFROID, J. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 36, n. 3, p. 313-326, May/June 2005.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 207 p. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GOPAUL, D. N. et al. Inosine-uridine nucleoside hydrolase from crithidia fasciculate: genetic characterization, crytallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue. **Biochemistry**, Easton, v. 35, n. 19, p. 5963-5970, May 1996.

GORVEL, J. P. Brucella: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 9, p. 1010-1013, July 2008.

GUERRA, H. The brucellae and their success as pathogens. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, v. 33, n. 4, p. 325-331, Jan. 2007.

GUEX, N. M. C. Peitsch, swiss-model and Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, Dec. 1997.

GUIMARÃES, A. P. **Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo hidrolase de bacillus anthracis**. 2010. 170 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GUIMARÃES, A. P. et al. Analysis of Bacillus anthracis nucleoside hydrolase via in silico docking with inhibitors and molecular dynamic simulation. **Journal of Molecular Modeling**, New York, 2011a. In press.

GUIMARÃES, A. P. et al. Design of new chemotherapeutics against the deadly anthrax disease: docking and molecular dynamics studies of inhibitors containing pyrrolidine and riboamidrazone rings on nucleoside hydrolase from *Bacillus anthracis*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, New York, v. 28, n. 4, p. 455-469, Feb. 2011b.

GUNSTEREN, W. F. van; BERENDSEN, H. J. C. **Groningen molecular simulation (GROMOS): library manual**, biosmos. Netherlands: Groningen, 1987. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp984217f>>. Acesso em: 10 set. 2010.

GUNSTEREN, W. F. van et al. **Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide**. Zurich: VDF Hochschulverlang, 1996. 31 p.

GUR, A. et al. Complications of brucellosis in different age groups: a study of 283 cases in southeastern Anatolia of Turkey. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 44, n. 1, p. 33-44, Feb. 2003.

HAGLER, A. T. et al. Urey-bradley force field, valence force field, and ab initio study of intramolecular forces in tri-tert-butylmethane and isobutene. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 101, n. 4, p. 813-819, Feb. 1979.

HAGLER, A. T.; HULER, E.; LIFSON, S. Energy functions for peptides and proteins: I., derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystal. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 96, n. 17, p. 5319-5327, Aug. 1974.

HASANJANI ROUSHAN, M. R. et al. Comparison of the efficacy of gentamicin for 5 days plus doxycycline for 8 weeks versus streptomycin for 2 weeks plus doxycycline for 45 days in the treatment of human brucellosis: a randomized clinical trial. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 5, p. 1028-1035, May 2010.

HAWLEY, R. J.; EITZEN JUNIOR, E. M. E. Biological weapons: a primer for microbiologists. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 235-253, Oct. 2001.

HIGGINS, D.; TAYLOR, W. **Bioinformatics sequence, structure and databanks**. Oxford: Oxford University, 2001. 269 p.

HÖLTJE, H. D. et al. **Molecular modeling: basic principles and applications**. Darmstadt: Wiley-VCH, 2003. 310 p.



HÖLTJE, H. D.; FOLKERS, G. **Molecular modeling**: basic principles and applications. Weinheim: VCH, 1997. 194 p.

HORENSTEIN, B. A. et al. Transition-state analysis of nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. **Biochemistry**, New York, v. 30, n. 44, p. 10788-10795, Nov. 1991.

IWATA, Y. et al. Conformational analysis and docking study of potent factor XIII a inhibitors having a cyclopropenone ring. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, New York, v. 18, n. 6, p. 591-599, Dec. 2000.

JENSEN, F. **An introduction to computational chemistry**. Chichester: J. Wiley, 1999. 446 p.

JOHNSON, M. S. et al. Knowledge-based modelling. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 1-68, Jan. 1994.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, Nov. 1996.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, June 1988.

JOSEPH, P. et al. Cloning, characterization, and inhibition studies of  $\beta$ -carbonic anhydrase from *Brucella suis*. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 53, n. 5, p. 2277-2285, Mar. 2010.

KARPLUS, M.; PETSKO, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, London, v. 347, n. 6294, p. 631-639, Oct. 1990.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, Guildford, v. 14, n. 1, p. 51-55, Feb. 1996.

KORTEPETE, M. G.; PARKER, G. W. Potential biological weapons threats. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 4, p. 523-527, July/Aug. 1999.

KURTZ, J. E. et al. The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 41, n. 3, p. 132-141, June 2002.

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

LEACH, A. R. **Molecular modelling: principles and applications**. Essex: Longman, 1996. 740 p.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Essex: Wesley, 2001. 744 p.

LIM, D. et al. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 583-607, Oct. 2005.

LINDLER, L. E.; LEBEDA, F. J.; KORCH, G. W. **Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism**. New Jersey: Human, 2005. 597 p.

LUBANI, M. M. et al. Neonatal brucellosis. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 147, n. 5, p. 520-522, June 1988.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal Physical Chemistry B**, London, v. 102, n. 18, p. 3586-3616, Apr. 1998.

MCCLEAN, D. R.; RUSSEL, N.; KHAN, Y. Neurobrucellosis and therapeutic features. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 15, n. 4, p. 582-590, Oct. 1992.

MELLO, C. C. F. et al. Espondilodiscite por brucelose: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 469-472, jul./ago. 2007.

MESELSON, M. et al. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. **Science**, New York, v. 266, n. 5188, p. 1202-1208, Nov. 1994.

MICHELI, L. J.; IRELAND, M. L. Prevention, management of calcaneal apophysitis in children: an overuse syndrome. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, New York, v. 7, n. 1, p. 34-38, Jan./Feb. 1987.

MILES, R. W. et al. Iminoribitol transition state analogue inhibitors of protozoan nucleoside. **Biochemistry**, Easton, v. 38, n. 40, p. 13147-13154, Oct. 1999.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 243, n. 2, p. 310-326, Oct. 1994.

MOON, J. E. V. C. **Biological and toxin weapons: research, development and use from the middle ages to 1945**. Oxford: Oxford University, 1999. 277 p.

MURZIN, A. G. et al. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 247, n. 4, p. 536-538, Apr. 1995.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, Marília, v. 33, n. 4, p. 13-24, out./dez. 2008.

OGAWA, J. et al. Purification, characterisation, and gene cloning of purine nucleoside from *Ochrobactrum anthropi*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1783-1787, Apr. 2001.

OLUKMAN, O. Pulmonary involvement in childhood brucellosis: a case report. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 8, n. 2, p. 245-248, Apr. 2008.

ORENGO, C. A. et al. CATH: a hierarchi classification of protein domain structures. **Structure**, Philadelphia, v. 5, n. 8, p. 1093-1108, Aug. 1997.

OZGOCMEN, S. et al. Calcaneal apophysitis due to brucellosis. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 49, n. 1, p. 55-58, Feb. 2003.

PAPPAS, G. et al. Brucella as a biological weapon. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 19/20, p. 2229-2236, Oct. 2006a.

PAPPAS, G. et al. The new global map of human brucellosis. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 6, n. 2, p. 91-99, Feb. 2006b.

PARKIN, D. W. Purine-specific nucleoside N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*: purification, specificity, and kinetic mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 36, p. 21713-21719, Sept. 1996.

PARKIN, D. W. et al. Nucleoside hydrolase from *crithidia fasciculata*: metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 31, p. 20658-20665, Nov. 1991.

PARKIN, D. W.; SCHRAMM, V. L. Binding modes for substrate and a proposed transition: state analogue of protozoan nucleoside hydrolase. **Biochemistry**, Easton, v. 34, n. 42, p. 13961-13966, Oct. 1995.

PARKINSON, R.; RAJIC, A.; JENSON, C. Investigation of an anthrax outbreak in Alberta in 1999 using a geographic information system. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 44, n. 4, p. 315-318, Apr. 2003.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford: University of Oxford, 2003. 727 p.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA NETO, J. S. F. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 389-401, jul./set. 2008.

PAYNE, D. J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 6, n. 1, p. 29-40, Jan. 2007.

PEITSCH, M. C. Biochem promod and SWISS-MODEL: internet-based tools for automated comparative protein modeling. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 24, n. 1, p. 274-279, Feb. 1996.

\_\_\_\_\_. Protein modeling by e-mail: from amino acid sequence to protein structure: a free one-hour service. **Nature Biotechnology**, New York, v. 13, n. 305, p. 658-660, July 1995.

PESSEGUEIRO, P.; BARATA, C.; CORREIA, J. Brucelose: uma revisão Sistematizada. **Medicina Interna**, Bucuresti, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2003.

PETERSEN, C.; MOLLER, L. B. The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*: substrate specificity, gene expression, and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 2, p. 884-894, Jan. 2001.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 23, p. 283-437, 1968.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, New York, v. 27, n. 2, p. 195-208, Oct. 2009.

RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 13-22, Jan. 2003.

ROCHA, M. R. M. **Modelagem molecular por homologia e dinâmica molecular da nucleosídeo hidrolase de *Leishmania donovani***. 2005. 123 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2005.

SALATA, R. Brucelose. In: GOOLDMAN, L.; BENETT, J. C. (Ed.). **Tratado de medicina interna**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. p. 1915-1918.

SANTANA, D. M. et al. Nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 315-319, Apr. 2002.

SANTOS FILHO, O. A. **Modelagem molecular da Di-hidrofolato redutase do *plamodium falciparum* e estudo de seus inibidores pelo método QSAR-3D**. 2000. 210 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2000.

SANTOS FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 253-259, mar./abr. 2003.

SHI, W.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*: cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 30, p. 21114-21120, July 1999.

SIDELL, F. R.; TAKAFUJI, E. T.; FRANZ, D. R. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. Washington: Office of the Surgeon General, 1997. 721 p.

SILVA, L. J. Guerra biológica, bioterrorismo e saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 1519-1523, nov./dez. 2001.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em *Eucalyptus*. **Addubare**, Piracicaba, v. 2, n. 9, p. 4-7, out./dez. 2003.

SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. **Molecular modeling**: basic principles and applications. Darmstadt: Wiley-VCH, 2003. 310 p.

SOUZA, M. L. **Modelagem por homologia de estruturas proteicas do veneno de *Apis mellifera***. 2008. 62 p. Monografia (Graduação em Informática Biomédica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

SPINK, W. W. **Clinical aspects of human brucellosis, in brucellosis**. Baltimore: Warverly, 1950. v. 1, 300 p.

SPOEL, D. van der et al. **GROMACS user manual version 3.0**. Groningen: University of Groningen, 2001. Disponível em: <<http://www.gromacs.org>>. Acesso em: 11 jul. 2010.

\_\_\_\_\_. **GROMACS user manual version 3.1.4**. Groningen: University of Groningen, 2002. Disponível em: <<http://www.gromacs.org>>. Acesso em: 11 jul. 2010.

TASCHETO, A. C. **Defesa química**. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2002. 194 p. Apostila.

TAYLOR, C. L.; TAYLOR JUNIOR, L. B. **Chemical and biological warfare**. New York: F. Watts, 1992. 330 p.

THOMAS, R. et al. Sensorineural hearing loss in neurobrucellosis. **Journal of Laryngology e Otology**, Ashford, v. 107, n. 11, p. 1034-1036, Nov. 1993.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. *MolDock*: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, June 2006.

THORNTON, J. M.; SWINDELLS, M. B. **Molecular structures in biology**. Oxford: Oxford University, 1993. 326 p.

TSOLIS, R. M. et al. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 12, p. 883-892, Dec. 2008.

TUCKERMAN, M. E.; MARTYNA, G. J. Understanding modern molecular dynamics: techniques and applications. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 104, n. 2, p. 159-178, Jan. 2000.

TURUNÇ, T. et al. Brucellosis in cases of end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Denver, v. 23, n. 7, p. 2344-2349, July 2008.

VERSÉES, W. et al. Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 307, n. 5, p. 1363-1379, Apr. 2001.



VERSÉES, W.; STEYAERT, J. Catalysis by nucleoside hydrolases. **Current Opinion in Structure Biology**, London, v. 13, n. 6, p. 731-738, Dec. 2003.

VULLO, D. et al. Inhibition studies of a b-carbonic anhydrase from *Brucella suis* with a series of water soluble glycosyl sulfanilamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 20, n. 7, p. 2178-2182, Apr. 2010.

WARREN, D. **The PyMOL molecular graphics system**. San Carlos: Delano Scientific LLC, 2004. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

WEINER, S. J. et al. All atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **Journal of Computational Chemistry**, Malden, v. 7, n. 2, p. 230-252, Apr. 1986.

\_\_\_\_\_. New force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 106, n. 3, p. 765-784, Feb. 1984.

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 1168-1184, Dec. 2009.

WIBERG, K. B. A Scheme for Strain energy minimization: application to the cycloalkanes. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 87, n. 5, p. 1070-1078, Mar. 1965.

WILLIS, E. A. Landscape with dead sheep: what they did to Gruinard Island. **Medicine, Conflict and Survival**, London, v. 18, n. 2, p. 199-211, Apr./June 2002.

YOUNG, E. J. Infectious diseases and their etiologic agents: brucella species. In: MANDELL, G.; BENNETTE, J.; DOLIN, R. (Ed.). **Principles and practice of infectious disease**. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 2053-2060.

\_\_\_\_\_. Overview of human brucellosis. **Clinical Infections Diseases**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 283-290, Aug. 1995a.

\_\_\_\_\_. **Textbook of pediatric infectious diseases**. Philadelphia: Saunders, 2004. 1588 p.

ZILINSKAS, R. A. Iraq's biological weapons: the past as future? **JAMA**, Chicago, v. 278, n. 5, p. 418-424, Aug. 1997.

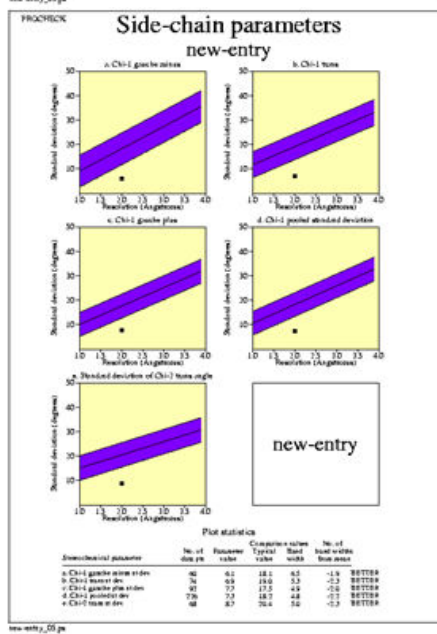
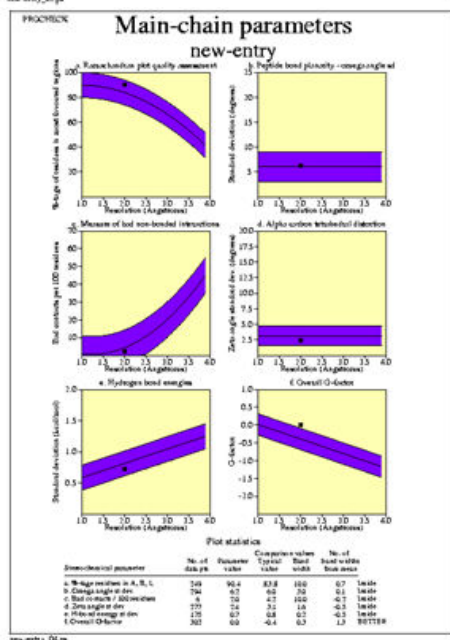
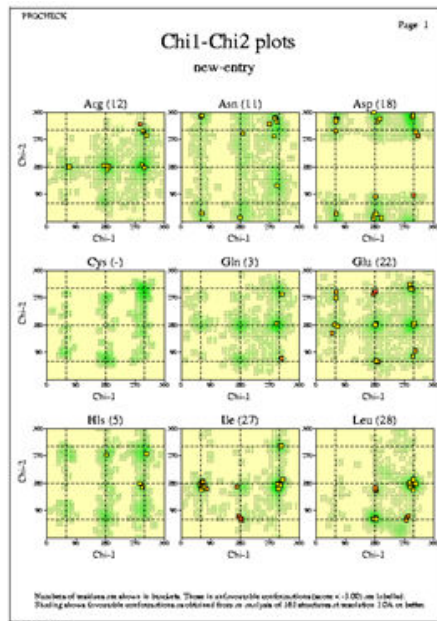
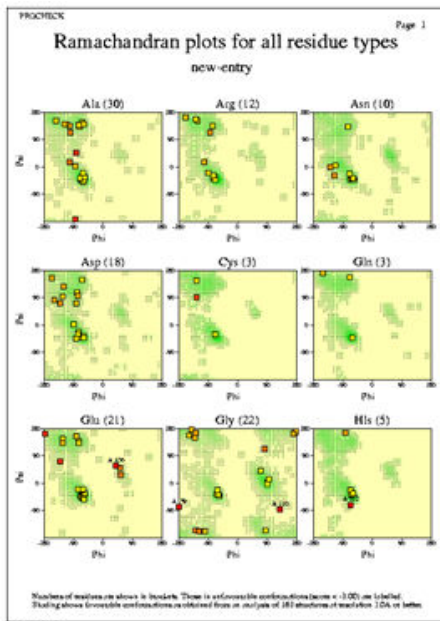
## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Modelagem por homologia

A modelagem por homologia da *BsNH* foi realizada segundo o seguinte procedimento:

- 1- Baixar a sequência fasta da enzima alvo (*BsNH*) no site do Expasy(<http://au.expasy.org/>);
- 2- Baixar as estruturas cristalográfica(s) dos molde(s) noPDB(<http://www.rcsb.org/pdb>), no caso do presente trabalho, utilizou-se como molde a enzima *EcNH* (código-1YOE);
- 3- Abrir ambas as enzimas (alvo e molde) no programa *Swiss-PdbViewer* e fitar as duas enzimas utilizando a opção *fit*;
- 4- Salvar a etapa anterior como *project*;
- 5- Entrar no site do SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) entrar na opção *project mode esubmitt project*;
- 6- Submeter o modelo gerado na etapa anterior aos testes de validação do PDB utilizando a opção *Validation Server*.

A.1 – Testes de validação





## **APÊNDICE B - Parametrização dos inibidores.**

O pacote GROMACS 4.0 não dispõe de bibliotecas com as topologias de moléculas diferentes de proteínas e ácidos nucleicos, portanto, é necessário gerar os arquivos de topologia para essas moléculas antes de incluí-las no sistema. Esse procedimento, chamado de parametrização, foi feito no site <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/> segundo o seguinte procedimento:

- 1 - Acessar o site  
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/prodrgr.html>;
- 2 - Editar o arquivo com as coordenadas .pdb da molécula;
- 3 - Copiar as coordenadas do arquivo e colar na janela do site;
- 4 - Selecionar as opções “full charges” e run PRDRG;
- 5 - Salvar a pasta de arquivos gerados pelo site;
- 6 - Corrigir as cargas no arquivo .itp, substituindo os valores calculados pelo PRDRG pelos valores calculados no programa Gaussian 98;
- 7 - Copiar os arquivos .gro e .itp para a pasta onde serão executados os programas do pacote GROMACS 4.0.

## **APÊNDICE C - Programas do pacote GROMACS 4.0**

A seguir são apresentados os programas executáveis do pacote GROMACS 4.0 utilizados para gerar os arquivos de entrada, executar os cálculos de minimização de energia e de dinâmica molecular e extrair informações dos arquivos de saída para posterior análise.

### C.1 - Construindo os arquivos de entrada:

Para a construção dos arquivos de entrada, é necessário apenas o arquivo bsnh.pdb contendo as coordenadas espaciais da proteína. A sequência de programas utilizados foi a seguinte:

- `pdb2gmx -f bsnh.pdb -p bsnh.top -o bsnh.gro -ignh;`
- `editconf -bt cubic -f bsnh_box.gro -o bsnh.gro -c -d 0.65;`
- `genbox -cp bsnh_box.gro -cs spc216.gro -o bsnh_boxwater.gro -p bsnh.top;`
- `make_ndx -f bsnh_boxwater.gro.`

Obs.: Os mesmos comandos foram utilizados para a enzima cfh.

O programa “`pdb2gmx`” converte o arquivo `.pdb` da proteína no arquivo `bsnh.gro`, contendo as coordenadas da proteína no formato que o pacote GROMACS 4.0 reconhece, e no arquivo `proteína.top` contendo os dados de topologia da proteína.

O programa “`editconf`” gera, em torno da proteína, uma caixa de tamanho adequado ao volume da mesma.

O programa “`genbox`” solvata o sistema, isto é, introduz nesta caixa as moléculas do solvente.

O programa “`make_ndx`” é utilizado para criar arquivos dentro do sistema, separados em grupos, para posterior análise.

#### C.1.1- Inserindo íons para equilibrar a carga do sistema

Como os sistemas estudados não apresentaram carga líquida zero, foi necessário incluir íons para equilibrar as cargas. As enzimas apresentaram cargas negativas em todos os casos; foram adicionados íons  $\text{Na}^+$ . Estes íons foram inseridos no sistema segundo o procedimento descrito abaixo:

1 - Executar o programa genion para gerar os íons:

- grompp -f stpr.mdp -c bsnh\_boxwater.gro -p banh.top -o bsnh\_stpr.tpr -n;
- genion -s bsnh\_stpr.tpr -o bsnh\_ions.gro -pname "Símbolo químico do cátion" -nq "carga do íon negativo" -random;

Obs.: Os mesmos comandos foram utilizados para a enzima cfh

2 - Na opção "Select a group", selecionar sempre o grupo correspondente ao solvente;

3 - Subtrair, no arquivo .top abaixo da linha "[Molecules]", o número de moléculas do íon adicionado do número de moléculas do solvente.

## C.2- Minimização de energia e dinâmica molecular

Uma vez construídos os arquivos de entrada, a próxima etapa será a execução dos programas para a minimização de energia e simulação de dinâmica molecular. A sequência de programas utilizados foi a seguinte:

Para a minimização de energia:

- grompp -f stpr.mdp -c bsnh\_ions.gro -p bsnh.top -o bsnh\_stpr.tpr;
- genpr -f ino.ligx -o ligxposre.itp;
- mdrun -e bsnh\_stpr.edr -v -s bsnh\_stpr.tpr -o bsnh\_stpr.trr -c bsnh\_stpr.gro -g stpr>&stpr.job &.

Para a dinâmica das moléculas de água:

- grompp -f st.mdp -c bsnh\_stpr.gro -p bsnh.top -o bsnh\_st.tpr;
- nohup mdrun -e bsnh\_st.edr -v -s bsnh\_st.tpr -o bsnh\_st.trr -c bsnh\_st.gro -g st>&st.job &.



Para a dinâmica molecular:

- grompp -f cg.mdp -c bsnh\_st.gro -p bsnh.top -o bsnh\_cg.tpr;
- nohup mdrun -e bsnh\_cg.edr -v -s bsnh\_cg.tpr -o bsnh\_cg.trr -c bsnh\_cg.gro -g cg>&cg.job &;
- grompp -f l-bfgs.mdp -c bsnh\_cg.gro -p bsnh.top -o bsnh\_lbfgs.tpr;
- nohup mdrun -e bsnh\_lbfgs.edr -v -s bsnh\_lbfgs.tpr -o bsnh\_lbfgs.trr -c bsnh\_lbfgs.gro -g lbfgs>&lbfgs.job &.

Para a dinâmica molecular com restrição:

- grompp -f pr.mdp -c bsnh\_lbfgs.gro -p bsnh.top -o bsnh\_pr.tpr;
- nohup mdrun -e pr.edr -v -s bsnh\_pr.tpr -o bsnh\_pr.trr -c bsnh\_pr.gro -g pr>&pr.job &.

Para a dinâmica molecular sem restrição:

- grompp -f md.mdp -c bsnh\_pr.gro -p bsnh.top -o bsnh\_md.tpr;
- nohup mdrun -e md.edr -v -s bsnh\_md.tpr -o bsnh\_md.trr -c bsnh\_md.gro -g md>&md.job &.

O programa grompp concatena dados dos arquivos de coordenadas (.gro), de topologia (.top) e de parâmetros (.mdp) do sistema em um só arquivo que servirá de arquivo de entrada para a execução dos cálculos que se seguirão;

O programa mdrun dá início à simulação e gera os arquivos de saída proteína.trr, que contêm todos os resultados do cálculo. O arquivo proteína\_st.gro com as coordenadas do último quadro gerado e o arquivos de log e .job que descrevem o andamento do cálculo.

São os arquivos .mdp que contêm os parâmetros do cálculo a ser realizado e, para cada tipo de cálculo, foi utilizado um arquivo .mdp diferente.

Caso a dinâmica seja interrompida por algum motivo, é possível dar continuidade a partir do ponto de interrupção. Para isso, é utilizado o programa

“tpbconv” para gerar um novo arquivo .tpr que servira de arquivo de entrada para a continuação dos cálculos:

- tpbconv -s banh\_md.tpr -f bsnh\_md.trr -e md.edr -o bsnh\_md1.tpr -time 1378;
- nohup mdrun -v -s bsnh\_md1.tpr -deffnm bsnh\_md1 >& bsnh\_md1.job&

Obs.: Os mesmos comandos foram utilizados para a enzima cfnh.

Após finalizada a dinâmica, é possível concatenar os arquivos gerados antes e, após a interrupção com os programas trjcat, para trajetórias e eneconv para energias:

- trjcat -o bsnh\_mdt.xtc -f traj1.xtc traj.xtc;
- trjcat -o bsnh\_mdt.trr bsnh\_md.trr banh\_md1.trr;
- eneconv -o bsnh\_mdt.edr bsnh\_md.edr banh\_md1.edr;

Como os arquivos de trajetória, .trr são muito grandes, é conveniente comprimi-los para salvar espaço no disco rígido. Para isso, se utiliza o programa “trjconv”: trjconv -f bsnh\_md.trr -o banh\_md.xtc

Obs.: Os mesmos comandos foram utilizados para a enzima cfnh.

### **C.3 - Procedimentos para a análise de resultados das dinâmicas**

Após concluída a dinâmica molecular, foram executados os programas para gerar os gráficos de variação da energia e de DRMQ temporal e espacial, e para extrair quadros ao longo da dinâmica. Estes programas são apresentados abaixo:

Para gerar o gráfico de variação da energia total:

g\_energy -f ener.edr -o energy.xvg.

O arquivo energia.xvg pode ser visualizado e manipulado com o programa xmgrace.

Para extrair quadros do sistema proteína ou INIB da caixa d'água:

- `make_ndx -f bsnh_md.tpr` [usar o `h` (`help`) para criar um o grupo];
- `trjconv -fit progressive -n index.ndx -f bsnh_md.trr(ou traj.xtc) -s bsnh_md.tpr -o "bsnh".pdb -b  $t_0$  -e  $t_f$ ;`
- `trjconv -n index.ndx -f bsnh_md.trr -s bsnh_md.tpr -o bsnh.pdb -b  $t_f$  -e  $t_f$ .`

$t_0$  → tempo 0;  $t_f$  → tempo final

Usando  $t_0 = t_f$ , extrai-se apenas o último quadro da dinâmica;

A opção `-fit progressive` ajusta os quadros em relação ao seu anterior progressivamente ao longo da dinâmica.

Para gerar os gráficos de DRMQ temporal e DRMQ espacial:

Criar primeiro os grupos que se quer analisar com `make_ndx`:

`make_ndx -f bsnh_md.tpr.`

DRMQ temporal:

`g_rms -n index.ndx -s bsnh_md.tpr -f traj.xtc -o DRMQtemp.svg.`

DRMQ espacial:

`g_rmsf -n index.ndx -s bsnh_md.tpr -f traj.xtc -o DRMQesp.svg -res.`

Para gerar os gráficos de número médio de ligações hidrogênio:

Criar primeiro os grupos que se quer analisar com `make_ndx`:

`make_ndx -f bsnh_md.tpr.`

Executa-se o programa `g_hbond` da seguinte forma:

`g_hbond -f traj.xtc -s bsnh_md.tpr -n index.ndx -num NumLigH.svg,`

em que `NumLigH.svg` é o arquivo que contém o número de ligações hidrogênio formadas em função do tempo de simulação.

Gerar graficos de distancia

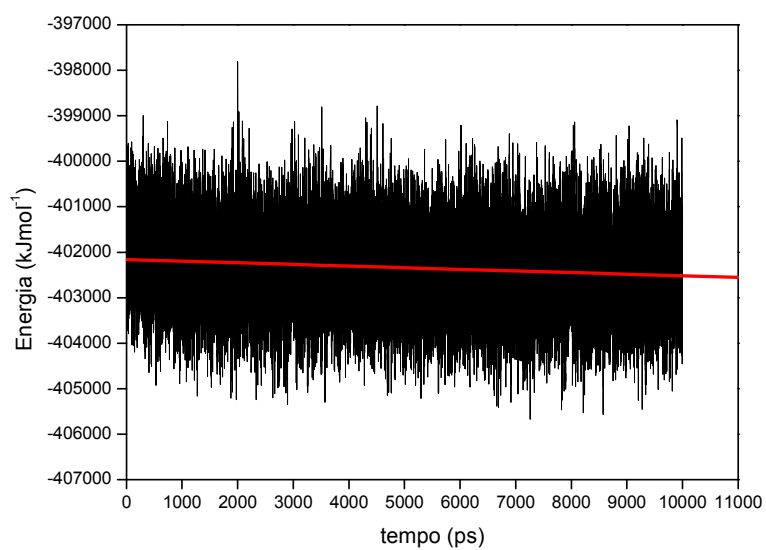
`make_ndx -f cfnh_md.tpr`

`g_dist -f cfnh_mdt.xtc -s cfnh_md.tpr -n index.ndx -o ....svg`

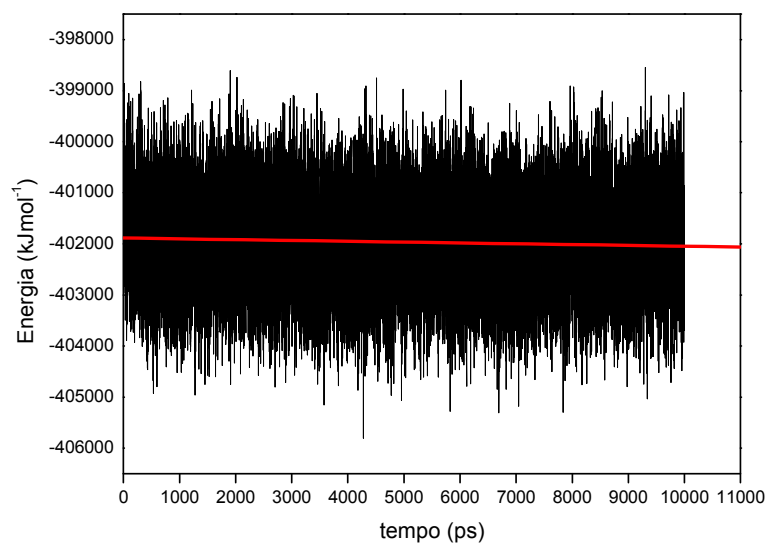
Obs.: Os mesmos comandos foram utilizados para a enzima `cfnh`.

Todos os arquivos com extensão .xvg contidos neste trabalho foram visualmente analisados pelo programa XMGRACE.

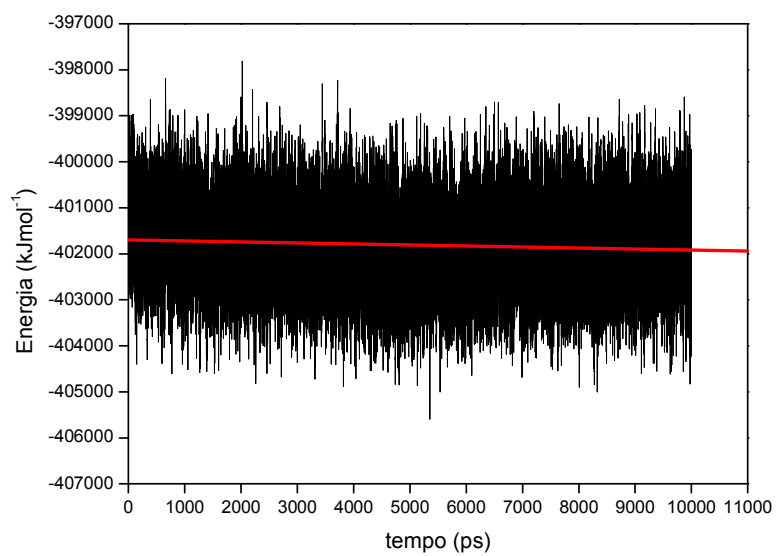
#### APÊNDICE D – Gráficos de Energia total



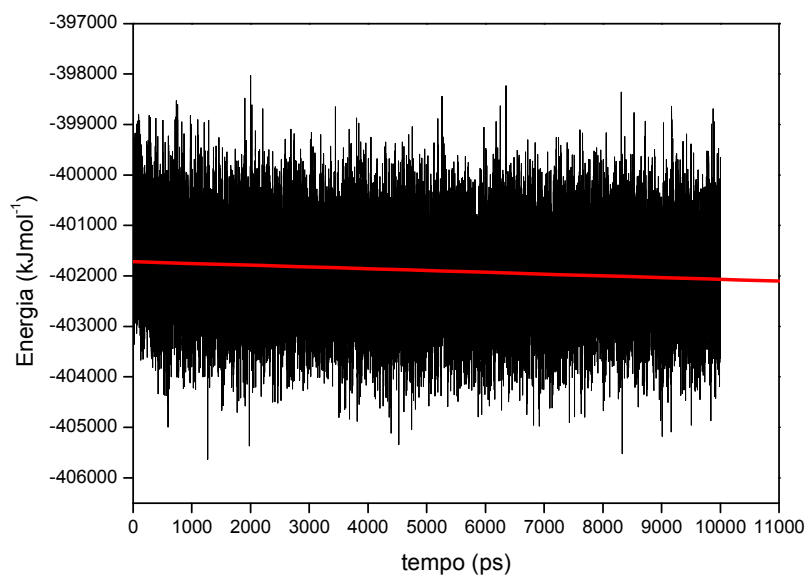
Varição da energia total para o sistema *BsNH*/Inibidor 1.



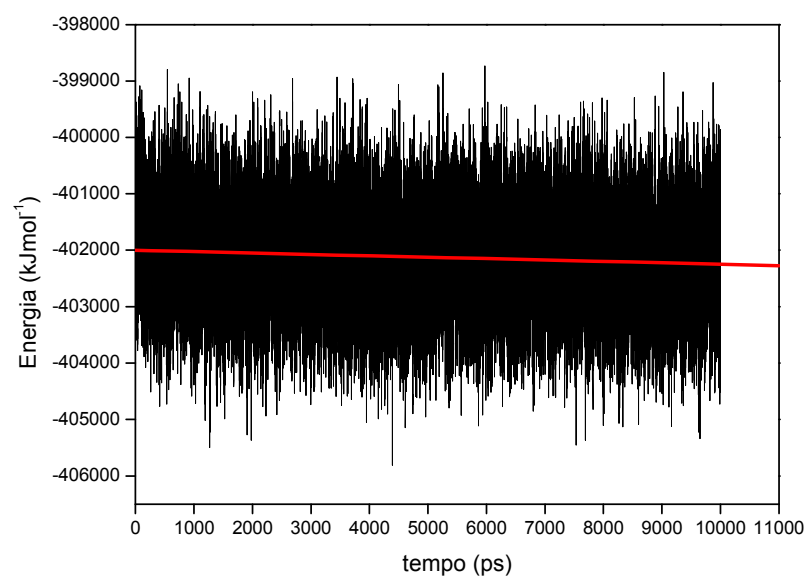
Varição da energia total para o sistema *BsNH/Inibidor 2*.



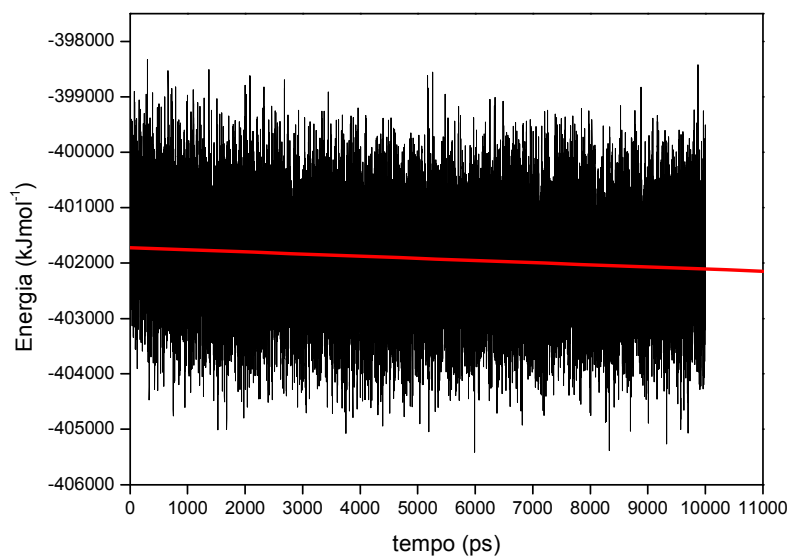
Varição da energia total para o sistema *BsNH/Inibidor 3*.



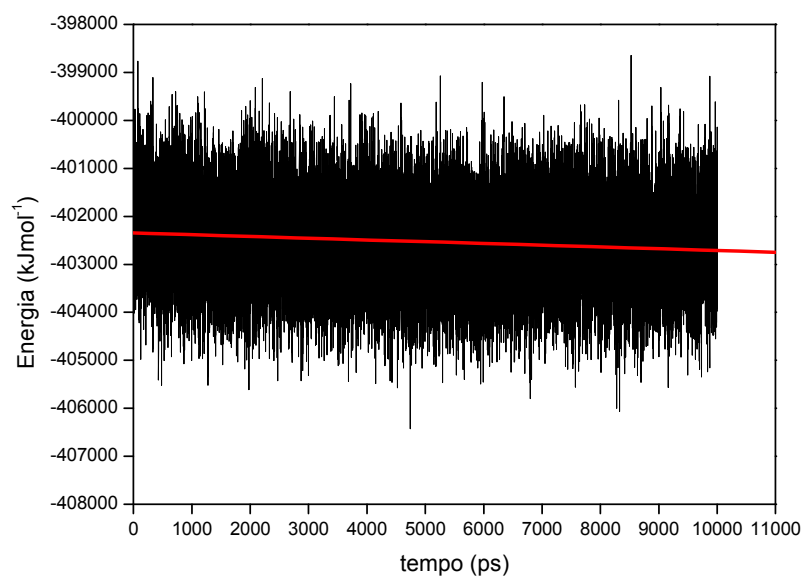
Varição da energia total para o sistema *BsNH/Inibidor 4*.



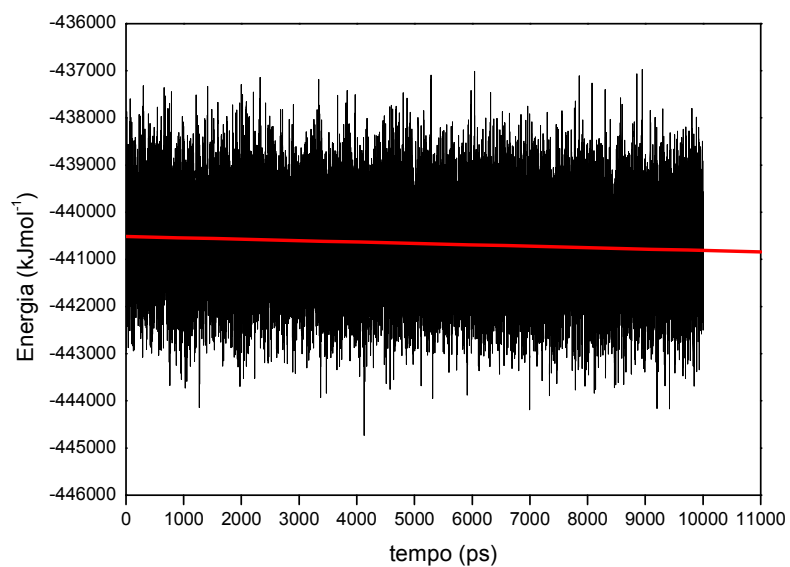
Varição da energia total para o sistema *BSNH/Adenosina*.



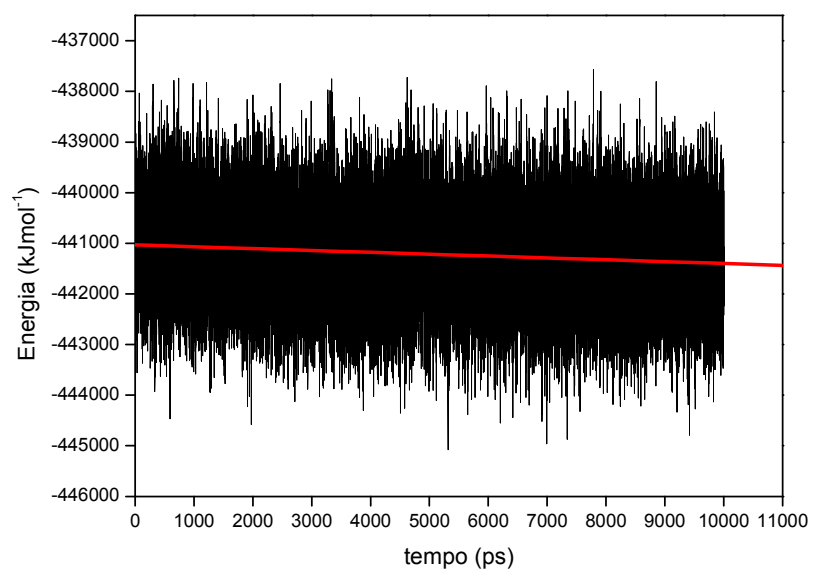
Variação da energia total para o sistema *BsNH/Inosina*.



Variação da energia total para o sistema *BsNH/Uridina*.

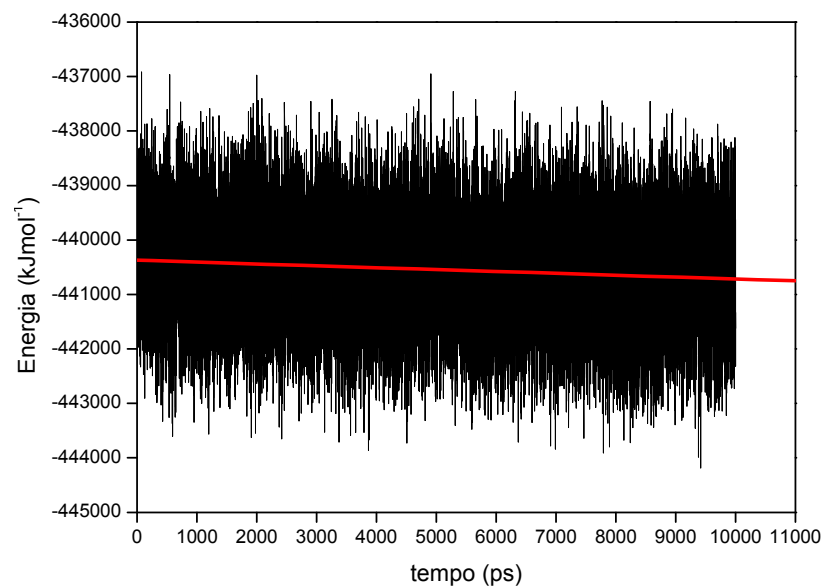


Variação da energia total para o sistema CfNH/Inibidor 1.

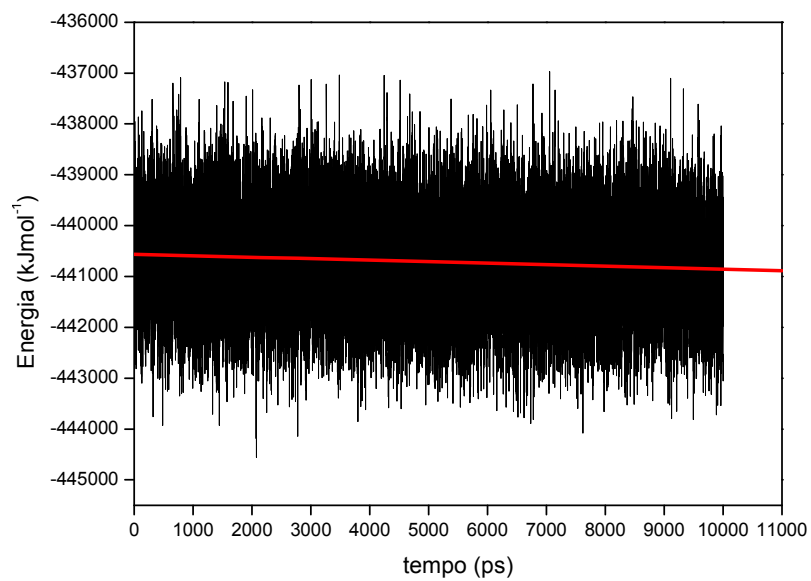


Variação da energia total para o sistema CfNH/Inibidor 2.

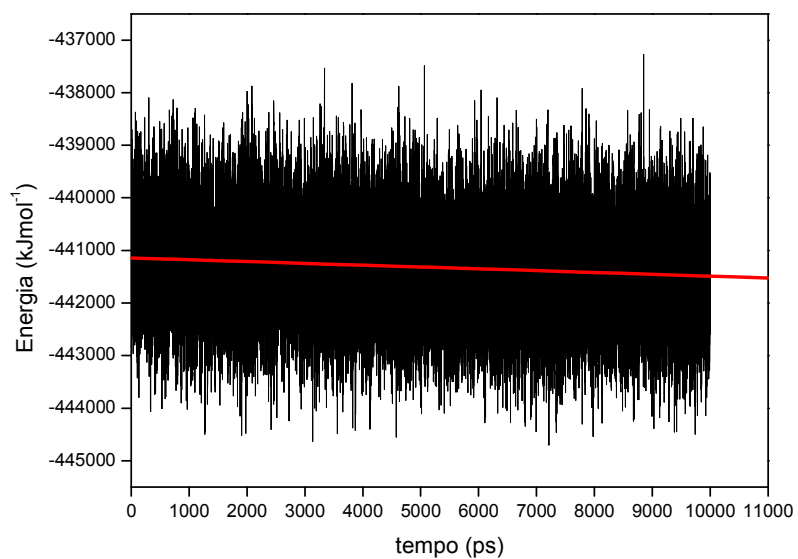




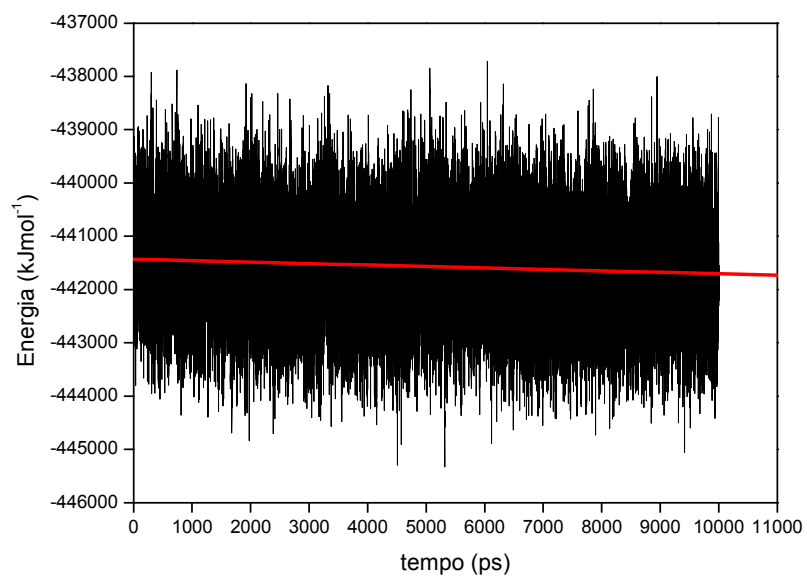
Varição da energia total para o sistema CfNH/Inibidor 3.



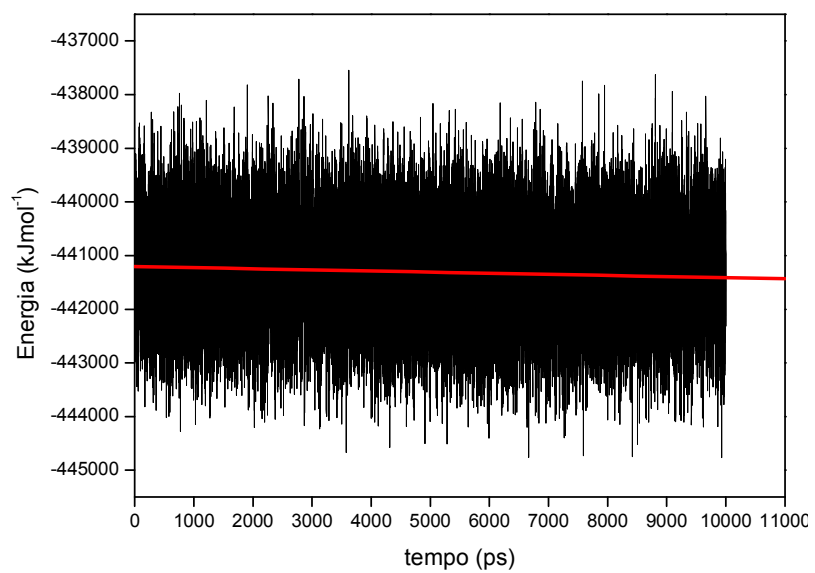
Varição da energia total para o sistema CfNH/Inibidor 4.



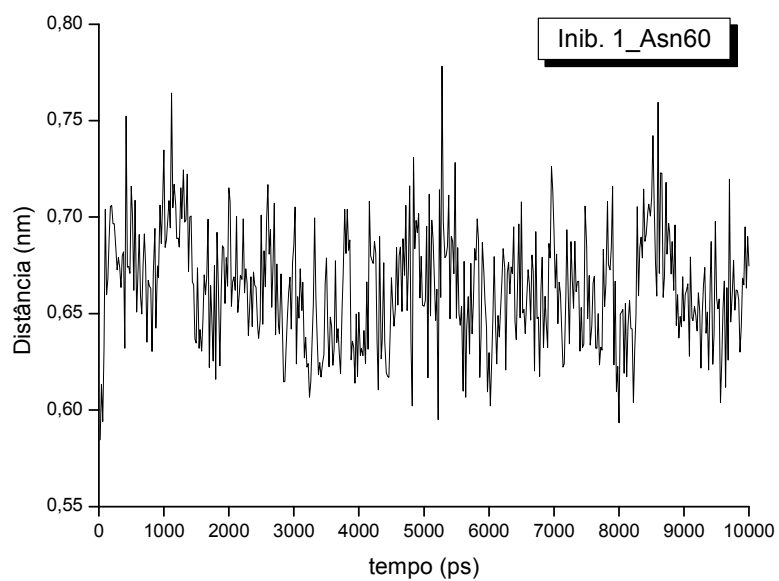
Variação da energia total para o sistema CfNH/Adenosina.



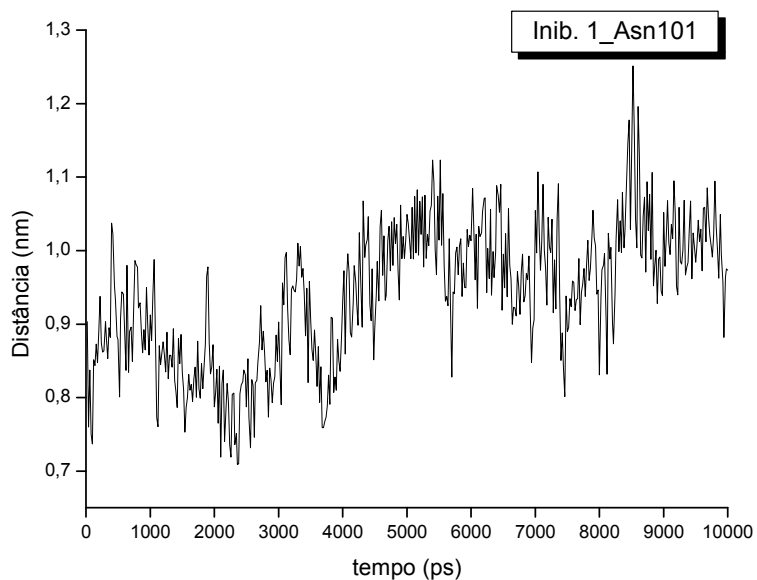
Variação da energia total para o sistema CfNH/Inosina.



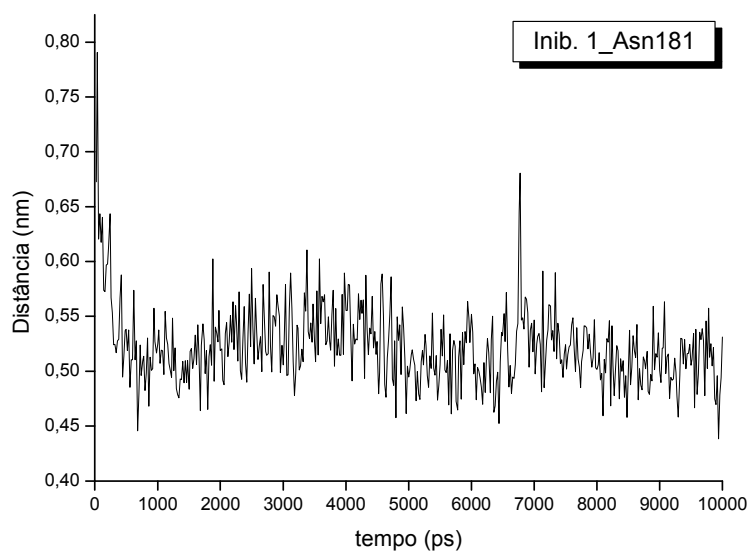
Varição da energia total para o sistema CfNH/Uridina.

**APÊNDICE E – Gráficos de Distância**

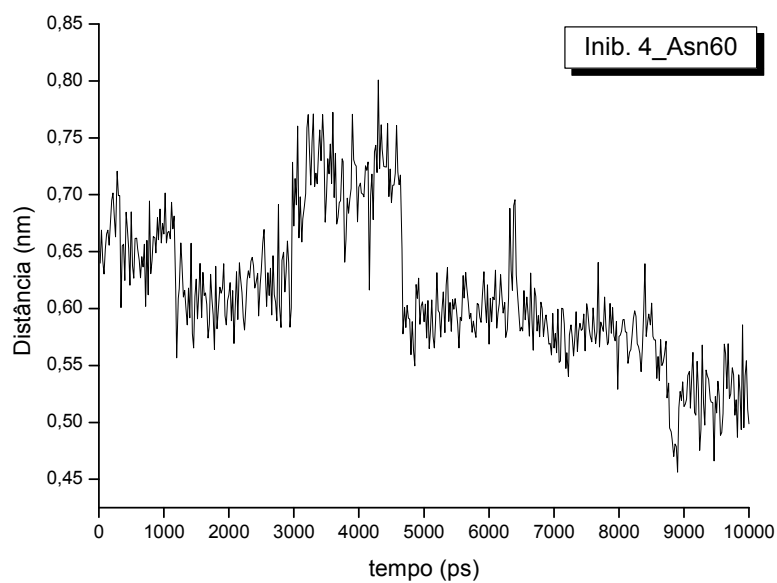
Variação da distância entre o resíduo Asn60 e o Inibidor **1**, durante a simulação de DM.



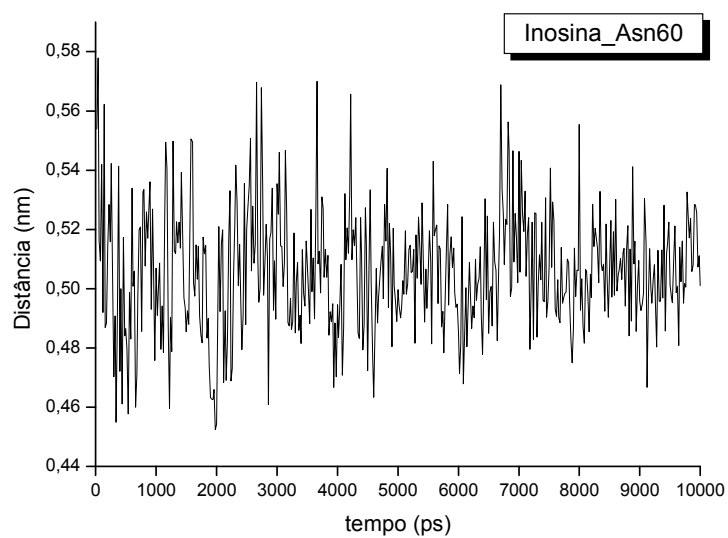
Varição da distância entre o resíduo Asn101 e o Inibidor **1**, durante a simulação de DM.



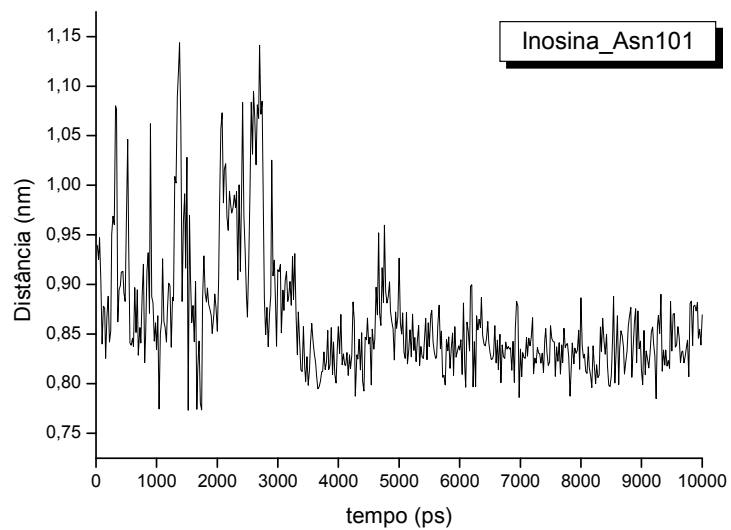
Varição da distância entre o resíduo Asn181 e o Inibidor **1**, durante a simulação de DM.



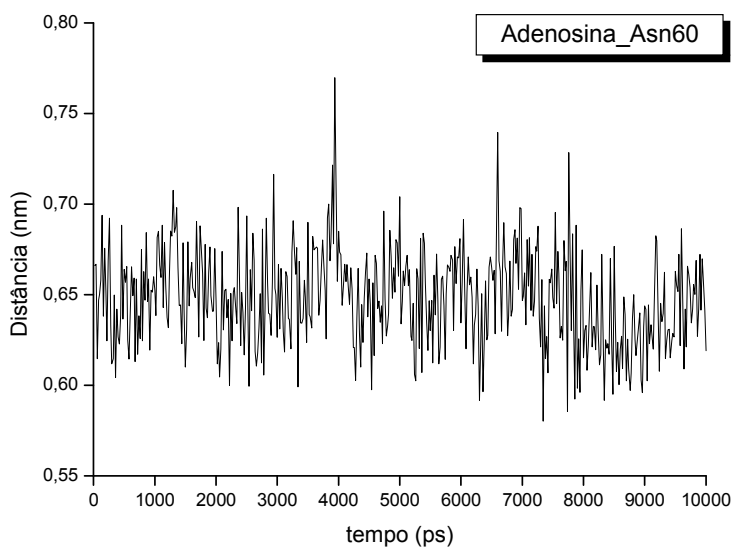
Variação da distância entre o resíduo Asn60 e o Inibidor 4, durante a simulação de DM.



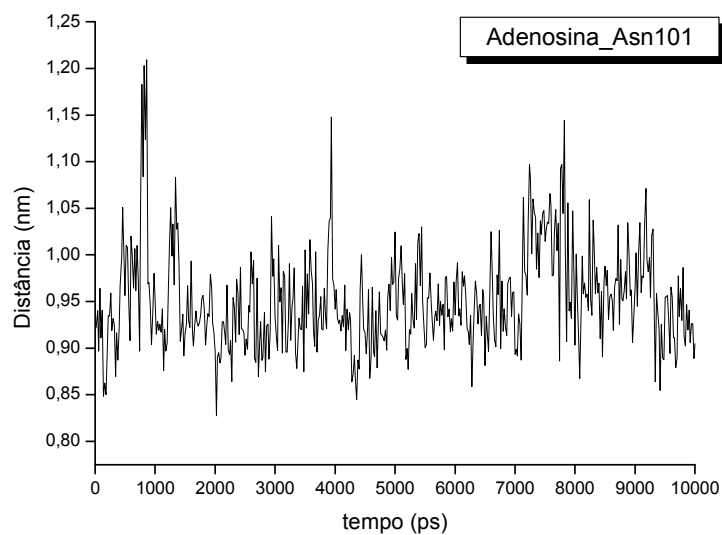
Variação da distância entre o resíduo Asn60 e a Inosina, durante a simulação de DM.



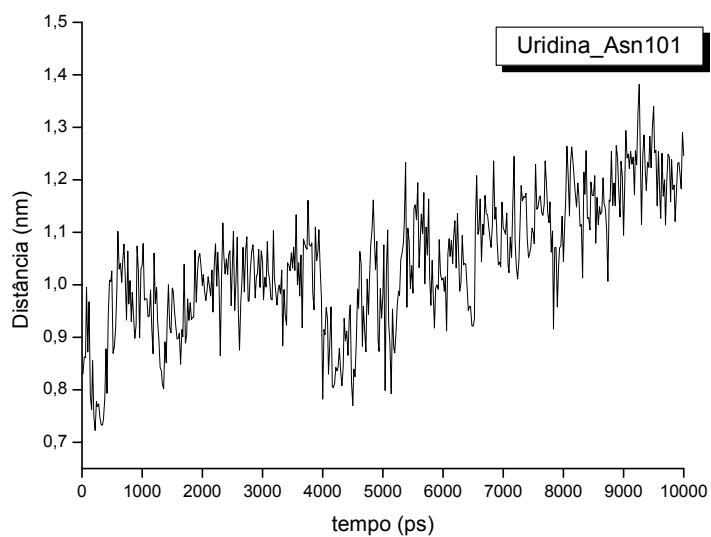
Varição da distância entre o resíduo Asn101 e a Inosina, durante a simulação de DM.



Varição da distância entre o resíduo Asn60 e a Adenosina, durante a simulação de DM.



Variação da distância entre o resíduo Asn101 e a Adenosina, durante a simulação de DM.



Variação da distância entre o resíduo Asn101 e a Uridina, durante a simulação de DM.