

CONSTRUÇÃO DO MODELO DO SÍTIO ATIVO DA AChE DE *AEDES AEGYPTI*.

Daniel Rosa da Silva¹, Carlos Maurício Rabello Sant'Anna², Vicente Antônio de Senna Junior¹, Douglas Batista da Silva¹, Mayara Kethellin da Silva Santos¹.

1- Universidade Iguaçu (UNIG), Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil.

2- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Autor Correspondente:

Dr. Daniel Rosa da Silva

E-mail: danizaor@gmail.com

RESUMO

Enzimas são catalisadores muito eficientes, e aumentam a velocidade das reações bioquímicas. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela realiza. A cinética é uma metodologia importante para o estudo dos mecanismos de reação enzimáticos. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece informação valiosa sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos. No processo de modelagem molecular por homologia estrutural são utilizadas estruturas de proteínas determinadas experimentalmente para se prever a conformação de outra proteína que apresenta uma sequência de aminoácidos similar. A qualidade de modelos estruturais de proteínas gerados por modelagem comparativa e a sua aplicabilidade no processo de desenvolvimento de novos fármacos dependem, predominantemente, do grau de similaridade sequencial entre a proteína com estrutura resolvida (proteína-molde) e a proteína a qual se deseja modelar (proteína-alvo). Em geral, quando o grau de identidade é igual a cerca de 30%, considera-se que o modelo aceitável.

Palavras chave: Enzima; Acetilcolinesterase; Modelo.

ABSTRACT

Enzymes are very efficient catalysts, and increase the speed of biochemical reactions. Each enzyme is classified according to the specific reaction it performs. Kinetics is an important

methodology for the study of enzymatic reaction mechanisms. The study of enzyme inhibitors also provides valuable information on the enzymatic mechanisms and has helped to define some metabolic pathways. In the molecular modeling process by structural homology, experimentally determined protein structures are used to predict the conformation of another protein having a similar amino acid sequence. The quality of protein structural models generated by comparative modeling and their applicability in the process of developing new drugs depend predominantly on the degree of sequential similarity between the protein with resolved structure (protein-template) and the protein to be modeled (target protein). In general, when the degree of identity is equal to about 30%, it is considered the acceptable model.

Key words: Enzyme; Acetylcholinesterase; Model.

1- INTRODUÇÃO

Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por enzimas que, com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, são proteínas. As enzimas são catalisadores muito eficientes, podendo aumentar a velocidade das reações por um fator entre 10^5 e 10^{17} . Para serem ativas, algumas enzimas requerem um co-fator químico, que pode estar fraca ou firmemente ligado à enzima, como íons metálicos ou moléculas orgânicas pequenas chamada de coenzimas. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela realiza (BERG *et al.*, 2008).

Mecanismos de reação detalhados têm sido propostos para muitas enzimas. A cinética é uma metodologia importante para o estudo dos mecanismos de reação, incluindo os enzimáticos (BERG *et al.*, 2008; NELSON & COX, 2002; SILVA., 2017).

As enzimas são inativadas por substâncias específicas, algumas responsáveis por modificações irreversíveis de um grupo funcional essencial para a atividade catalítica, enquanto outras se ligam de modo reversível às enzimas por interações intermoleculares, sem formação de ligações covalentes (BERG *et al.*, 2008; NELSON & COX, 2002; SILVA., 2017).

Os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou parando as reações enzimáticas. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos celulares, de forma que não é surpreendente que inibidores enzimáticos estejam entre os agentes farmacêuticos e os pesticidas mais importantes conhecidos. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece informação valiosa sobre os mecanismos

enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos (MARQUES & YAMANAKA, 2008).

A aquisição experimental de estruturas 3D de proteínas nem sempre é possível, porque a obtenção de amostra suficiente para estudos de cristalografia ou ressonância magnética nuclear (RMN) é difícil e, no caso da cristalografia, os cristais obtidos podem não ter qualidade suficiente; além da obtenção de modelos de proteínas, a modelagem molecular dispõe de ferramentas para a caracterização de sítios de interação com os ligantes bioativos (SANTOS-FILHO *et al.*, 2003).

No processo de modelagem molecular por homologia estrutural são utilizadas estruturas de proteínas determinadas experimentalmente para se prever a conformação de outra proteína que apresenta uma sequência de aminoácidos similar. A qualidade de modelos estruturais de proteínas gerados por modelagem comparativa e a sua aplicabilidade no processo de desenvolvimento de novos fármacos dependem, predominantemente, do grau de similaridade sequencial entre a proteína com estrutura resolvida (proteína-molde) e a proteína a qual se deseja modelar (proteína-alvo). Pesquisas recentes mostram que essa abordagem pode ser utilizada na identificação e validação de alvos terapêuticos, bem como na identificação e otimização de protótipos (HILLISCH, *et al.*, 2004).

A modelagem comparativa (ou por homologia) é uma técnica utilizada para predição de estruturas 3D de proteínas (BAJORATH *et al.*, 1993). Algumas conclusões gerais foram obtidas a partir de observações armazenadas ao longo dos anos sobre as construções de proteínas com estruturas determinadas experimentalmente, dentre elas (RICHARSON *et al.*, 1993):

- I. Homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional;
- II. Proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas, principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices α e fitas (ou folhas) β ;
- III. As principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas, principalmente, por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias.

A modelagem de uma proteína (proteína-alvo) pelo método comparativo baseia-se no conceito de evolução molecular. Parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias destas proteínas e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas (proteína-molde) implica em similaridade de estruturas entre elas. Em bibliotecas de acesso público contendo estruturas de proteínas determinadas experimentalmente, podem

ser feitas buscas por estruturas moldes em potencial para proteínas homólogas. De uma lista de possíveis candidatos, a estrutura molde é escolhida com base em um conjunto de normas, como o grau de similaridade entre a sequência a ser modelada e as sequências molde, a qualidade experimental da estrutura (resolução), a presença de ligantes e cofatores. Embora em muitos casos a sequência alvo possa ser modelada por apenas um único molde, às vezes é necessário empregar mais de uma estrutura molde, cada uma usada para modelar um ou mais domínios estruturais distintos da proteína-alvo (BORDOLI *et al.*, 2009).

Os métodos correntes de modelagem de proteínas por homologia implicam, basicamente em quatro passos sucessivos (SANTOS FILHO & ALENCASTRO, 2003):

- identificação e seleção de proteínas-molde;
- alinhamento das sequências de resíduos;
- construção das coordenadas do modelo;
- validação

A avaliação da qualidade da estrutura de uma proteína modelada é uma etapa fundamental em todo o sistema, uma vez que ela irá delimitar sua possível aplicação. A porcentagem de identidade entre as sequências da proteína a ser modelada e do molde é geralmente admitida como uma primeira avaliação da qualidade do modelo, uma vez que existir uma associação direta entre o grau de identidade das sequências de proteínas e o desvio dos átomos de carbono alfa ($C\alpha$) de seus cernes em comum (CHOTHIA & LESK, 1986). Em geral, quando o grau de identidade é igual a cerca de 30%, considera-se que o modelo aceitável (CASAVOTTO E PHATAK, 2009)

A qualidade estereoquímica do modelo é de importância fundamental. O programa mais utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, o PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993), avalia os comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN *et al.*, 1968). O gráfico de Ramachandran é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis e orienta a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas.

É necessário avaliar também as interações entre a estrutura modelada e o meio, essencialmente água. Neste tipo de análise, pode-se usar o programa WHATCHECK (HOOFT *et al.*, 1996), que dá informações sobre a formação de regiões centrais hidrofóbicas,

a acessibilidade de resíduos e átomos a moléculas de solvente (água), a distribuição espacial de grupos iônicos, a distribuição das distâncias atômicas e das ligações hidrogênio da cadeia principal. No mesmo contexto, o programa PROSAIL (SIPPL *et al.*, 1993) avalia o ambiente de cada aminoácido da proteína modelada (validação localizada), tendo como referência o ambiente esperado em proteínas análogas de alta resolução.

Outras metodologias baseadas em mecânica molecular, cálculos de energia livre de solvatação ou métodos estatísticos têm sido testados (SAUDER *et al.*, 2000). Estas metodologias são, em princípio, capazes de estimar a qualidade da estrutura terciária dos modelos de proteínas.

A elaboração de modelos por comparação ou homologia requer o uso de programas especializados em executar estas etapas, como a entrada nos bancos dados de estruturas de proteínas. Em meio aos programas desenvolvidos para fazer estes trabalhos, tem se destacado o servidor *Swiss-Model* (SCHWEDE *et al.*, 2003), que pode ser acessado livremente na rede pelo site <http://swissmodel.expasy.org>. Este servidor foi o primeiro a permitir que as etapas necessárias para a modelagem de proteínas fossem feitas de forma automatizada (GUEX *et al.*, 2009; BIASINI *et al.*, 2014).

2- METODOLOGIA

Devido à ausência de uma estrutura cristalográfica, inicialmente foi feita uma varredura no sítio Swiss Prot/TrEMBL (<http://www.expasy.ch/sprot/>), um banco de dados de acesso público de sequências primárias de proteínas, buscando-se estruturas da AChE de *A. aegypti*. Até a realização deste trabalho, estavam depositadas cinco sequências da AChE de *A. aegypti* no banco de dados, sendo selecionada a de código Q6A2E2 (MORI *et al.*, 2007), por esta apresentar o maior número de aminoácidos (702).

Esta sequência foi usada na construção do modelo tridimensional no servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), selecionando-se o melhor molde com a ferramenta BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), que foi a estrutura cristalográfica depositada no PDB sob o código 2CMF, uma AChE de *T. californica* complexada com o inibidor pentileno-bis-tacrina, obtida com resolução de 2,5 Å (RYDBERG *et al.*, 2006). As avaliações do modelo também foram feitas utilizando-se o servidor Swiss Model, Swiss PDB Viewer Anolea/Quean e através do gráfico de Ramachandran.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da construção do modelo do sítio ativo da AChE de *Aedes aegypti*.

O alinhamento das sequências primárias do modelo e da proteína molde foi feito no programa NCBI BLASTP 2.2.17 [ALTSCHUL *et al.*, 1997]. Estas sequências apresentam 48% de identidade e 63% de similaridade. O alinhamento entre as sequências da AChE de *A. aegypti* e da AChE de *T. californica* é apresentado na figura 1.

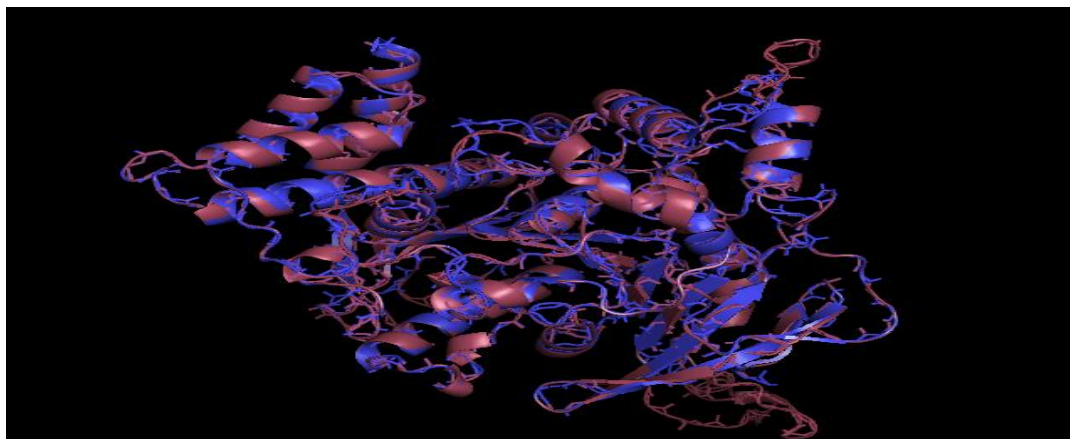
Figura 1. Alinhamento das estruturas primárias da AChE de *Aedes aegypti* (Q6A2E2) e da AChE de *T. californica* (2CMF).

AChE	AA	133	LLITTDKGVRLTLEAPSGKKVDAWLGIPYAQPPLGPIRFRHPRPVEKWTGVLNATTPP	192
AChE	TC	3	LLVNTKSGKVMGTRVPVLS-SHISAFLGIPFAEPPVGNMRFRRPEPKKPWSGVWNASTYP	61
AChE	AA	193	NSCVQIVDTVFGDFPGATMWNPNTPFISEDCLYINVVPHPRPKNSAVMLWIFGGGFYSGT	252
AChE	TC	62	NNCQQYVDEQFPGFSGSEMWNPNREMSIEDCLYLNIWVPSRPRKSTTVMVWIYGGGFYSGS	121
AChE	AA	253	ATLDVYDHRTLASEENVIVVSLQYRVASLGFLFL-GTPEAPGNAGLFDQNLALRWVRDNI	311
AChE	TC	122	STLDVYNGKYLAYTEEVVLVLSLYRVGAFGFLALHGSQEAPGNVGLLDQRMALQWVHDNI	181
AChE	AA	312	HKFGGDP SRVT LFGESAGAVSVSLHLLSALS RDLFQRAILQSGSP TAPWALVS REEATLR	371
AChE	TC	182	QF FGGDPKTVTIFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPNC PWASVSVAEGRRR	241
AChE	AA	372	ALRLAEAVNCPHDA TKLTD TVECLRTKDP NVLVDNEWGTL---GTCEFPFVPVVDGAFLD	428
AChE	TC	242	AVELGRNLN CNLNSDE--ELIHCLREKKPQELIDVEWNVLPFDSIFRFSFVPVIDGEFFP	299
AChE	AA	429	ETPQRS LASGRFKKTDILTGSNTEEGYFYIYYL TELLRKEEGVTVSREEFLQAVRELNP	488
AChE	TC	300	TSLESMLNSGNFKKTDQLLGVNKDEGSFFLLYGAPGFSKDSES-KISREDFMSGVKLSVP	358
AChE	AA	489	YVNGAARQAIVFEYTDWTEPENPNSNRDALDKMVG DYHFTCNVNEFAQRYAEFGNNVYMY	548
AChE	TC	359	HANDLG LDAVT LQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGNGTYLY	418
AChE	AA	549	LYTHRSKGNPWPRWTGVMHGDEINYVFGEPLNSDLGYMEDEKDFS RKIMRYWSNFAKTGN	608
AChE	TC	419	FFNHRASNLVWP EWGMV IHGYEIEFVFG LPLVKELNYTAE EELSRIMHYWATFAKTGN	478
AChE	AA	609	PN-PSPPNSDFEPWKHTAHGRHYLELGLNTTYVGRGPRLRQCAFWKKYLPLVAAT	664
AChE	TC	479	PNEFS-----KWPLFTTKEQKFIDLNT EPMKVHQR LRVQMCVFWNQFLPKLLNAT	528

Os aminoácidos conservados estão destacados em amarelo e; os que apresentam características semelhantes, em cinza.

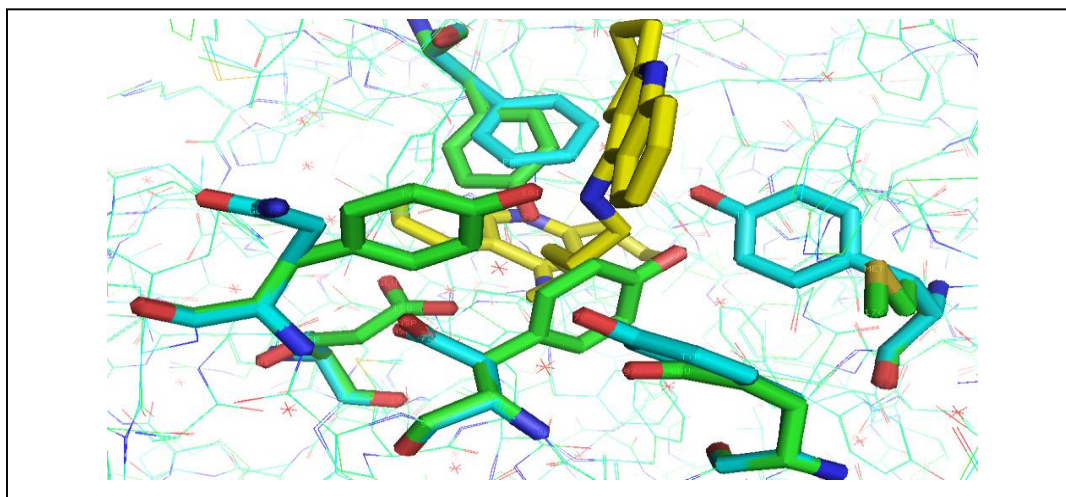
Para este estudo, foi construído inicialmente um modelo 3D da AChE de *A. aegypti* (AeAChE). O modelo 3D da sequência de aminoácidos Q6A2E2 (Mori *et al.*, 2007) (Figura 1) foi obtido por modelagem comparativa com a estrutura cristalográfica da AChE de *T. californica* com o código 2CMF (Rydberg *et al.*, 2006), (Figura 2).

Figura 2 - Sobreposição das estruturas: modelo da AChE de *A. aegypti* (vinho) e AChE de *T. californica* 2CMF (em azul).



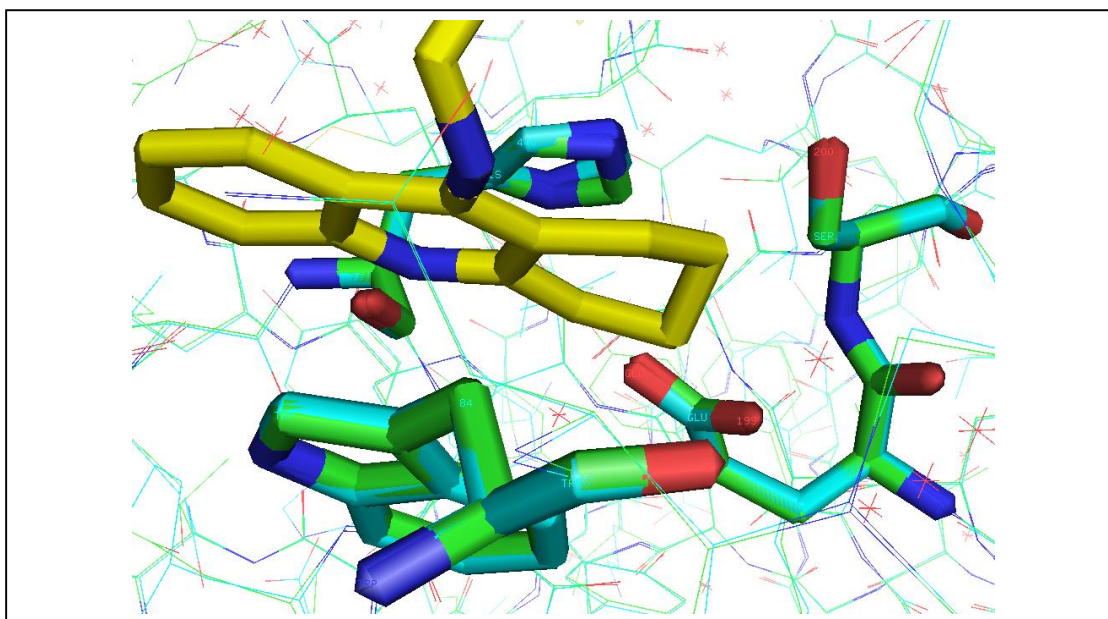
A sobreposição do modelo com o molde (2CMF) mostrou que há algumas diferenças no canal e no sítio periférico, onde seis aminoácidos são trocados: no sítio periférico, Glu97 por Tyr70 e Tyr101 por Gln74; no canal, Tyr390 por Phe330, Tyr99 por Asp72, Glu108 por Ser81 e Met176 por Tyr121 (Figura 2). O sítio catalítico é totalmente conservado entre as duas espécies (Figura 3).

Figura 3- Sobreposição das estruturas do molde e do modelo da AChE de *A. aegypti*, na região do sítio periférico e do canal do sítio ativo.



O ligante pentileno bis-tacrina está com carbonos em amarelo, em ciano, a enzima de *T. californica* (2CMF) e, em verde, o modelo de *A. aegypti*. Em destaque, os aminoácidos diferentes entre as estruturas nesta região.

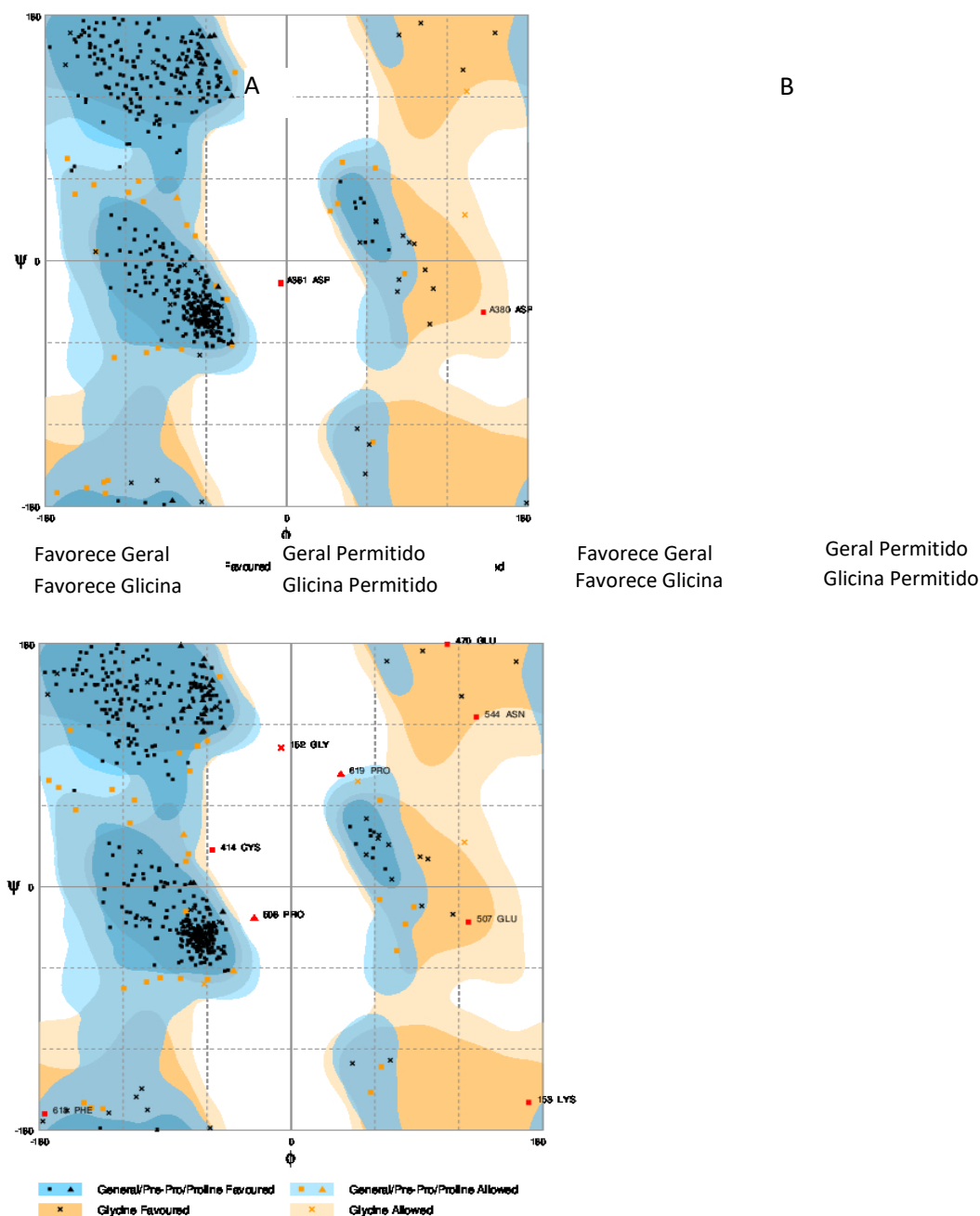
Figura 4- Sobreposição das estruturas do molde e do modelo da AChE de *A. aegypti*, na região do sítio catalítico “aniônico”.



O ligante pentileno bis-tacrina está com carbonos em amarelo, em ciano, a enzima de *T. californica* (2CMF) e, em verde, o modelo de *A. aegypti*. Em destaque, os aminoácidos iguais Glu199, Ser200 e His440 entre as estruturas nesta região.

3.2 Estimativa da Qualidade do Modelo

Os gráficos de Ramachandran (com glicinas e prolínas) podem ser observados na Figura 5. O número de aminoácidos na estrutura gerada pelo *Swiss Model* que se encontram fora da região mais provável é baixo, sete aminoácidos, um percentual de 0,99%, indicando a boa qualidade dos modelos. Deve ser destacado que a estrutura cristalográfica utilizada para o alinhamento dos aminoácidos já possuía um pequeno número de aminoácidos fora da região mais provável. Os aminoácidos que estão fora da região mais provável no gráfico 2CMF são: Asp361 e Asp380. Os aminoácidos que estão fora da região mais provável no modelo são: Lys153, Cys414, Glu470, Pro506, Glu507 e Asn544. Entre todos os aminoácidos, nenhum desses faz parte do sítio de interação da enzima 2CMF e do modelo (RAMACHANDRAN, 1968; LOVELL et al., 2012).

Figura 5- Gráficos de Ramachandran

Fonte: (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Figura 5- Gráficos de Ramachandran: A) estrutura cristalográfica 2CMF depositada no PDB; B) estrutura modelada no servidor *Swiss Model* para a sequência Q6A2E2 de *A. aegypti*. Figuras geradas com o programa Rampage

O método escolhido para a estimativa de qualidade absoluta do modelo da estrutura da proteína é independente do tamanho da proteína e pode ser utilizado tanto para avaliar cadeias isoladas, bem como conjuntos oligoméricos inteiros. A qualidade absoluta é calculada relacionando-se as características estruturais do modelo com estruturas

experimentais de tamanho semelhante. Com base na função de pontuação composta QMEAN (do inglês “Qualitative Model Energy ANalysis”, Análise Qualitativa da Energia do Modelo, (Benkert *et al.*, 2009), foram analisados diferentes aspectos geométricos das proteínas. Para a normalização, a pontuação QMEAN de um modelo é comparada com distribuições obtidas a partir de estruturas cristalograficas de alta resolução resolvidas por difração de raios-X. As estruturas de referência partilham menos de 30% de identidade sequencial e foram resolvidas até uma resolução menor do que 2 Å. O QMEAN Z-escore resultante fornece uma estimativa do "grau nativo" das características estruturais observadas num modelo e indica se o modelo é de qualidade comparável à estrutura experimental. Os Z-escores dos termos individuais da função de pontuação indicam que características estruturais de um modelo apresentam desvios significativos do esperado comportamento "nativo", por exemplo, acessibilidade inesperada do solvente, geometria da cadeia principal, arranjo intra-atômico.

A pontuação global QMEAN4 é um valor composto constituído de uma combinação linear de quatro termos estatísticos potenciais (confiabilidade do modelo estimada entre 0 e 1) (Benkert *et al.*, 2011). Os termos de pseudo-energias que contribuem são dados a seguir (Tabela 1 e Figuras 6 e 7), juntamente com suas pontuações Z (*Z-scores*) em relação à pontuação obtida em estruturas experimentais de tamanho similar resolvido por difração de raios-X de alta resolução.

Tabela 1: Termos da função de escore QMEAN4 para o modelo da AChE de *A. aegypti*

Termos da função de escores	Escore bruto	Z-escore
Energia de interação de C beta	-98.32	-1.21
Energia de pares para todos os átomos	-10094.09	-1.31
Energia de solvatação	-43.24	-0.36
Energia dos ângulos de torção	-107.70	-1.25
Pontuação de QMEAN4	0.659	-1.60

O cálculo do QMEAN Z-score foi realizado no Servidor QMEAN (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) (Benkert *et al.*, 2009), com as ferramentas

disponíveis no espaço de trabalho do servidor SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) (Arnold *et al.*, 2006, Schwede *et al.*, 2003).

Figura 6 - Gráfico do QMEAN Z-score do modelo de AChE de *A. aegypti*, em comparação com um conjunto de estruturas do PDB.

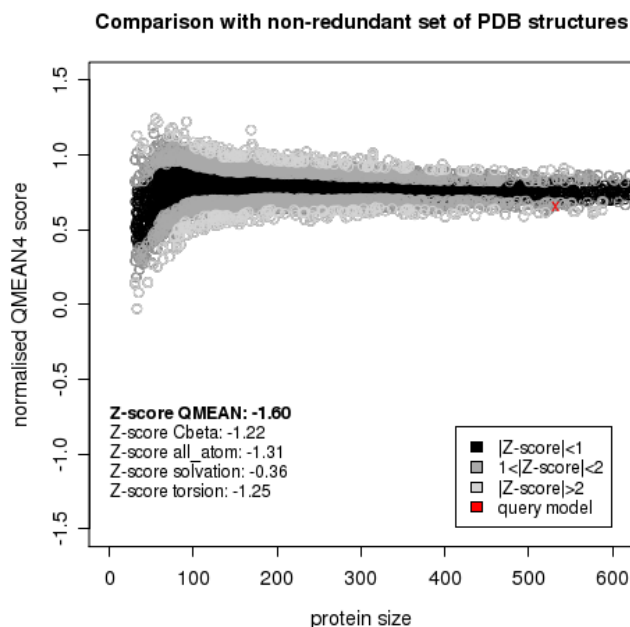
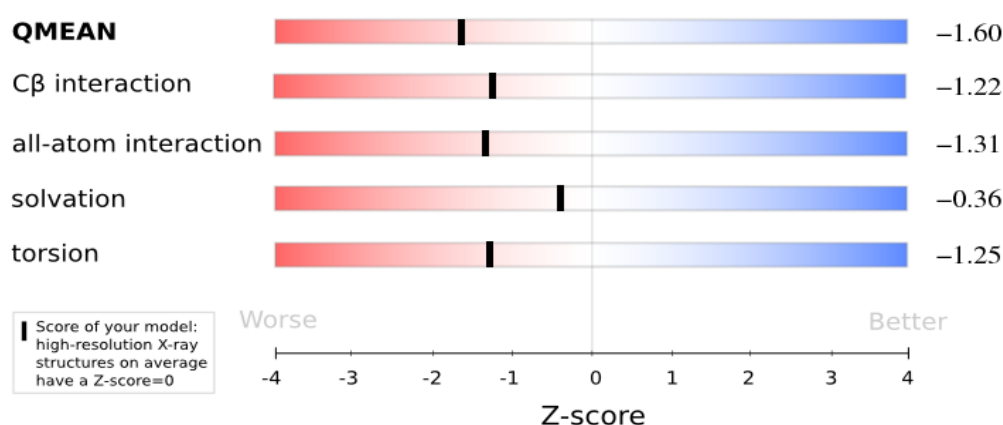


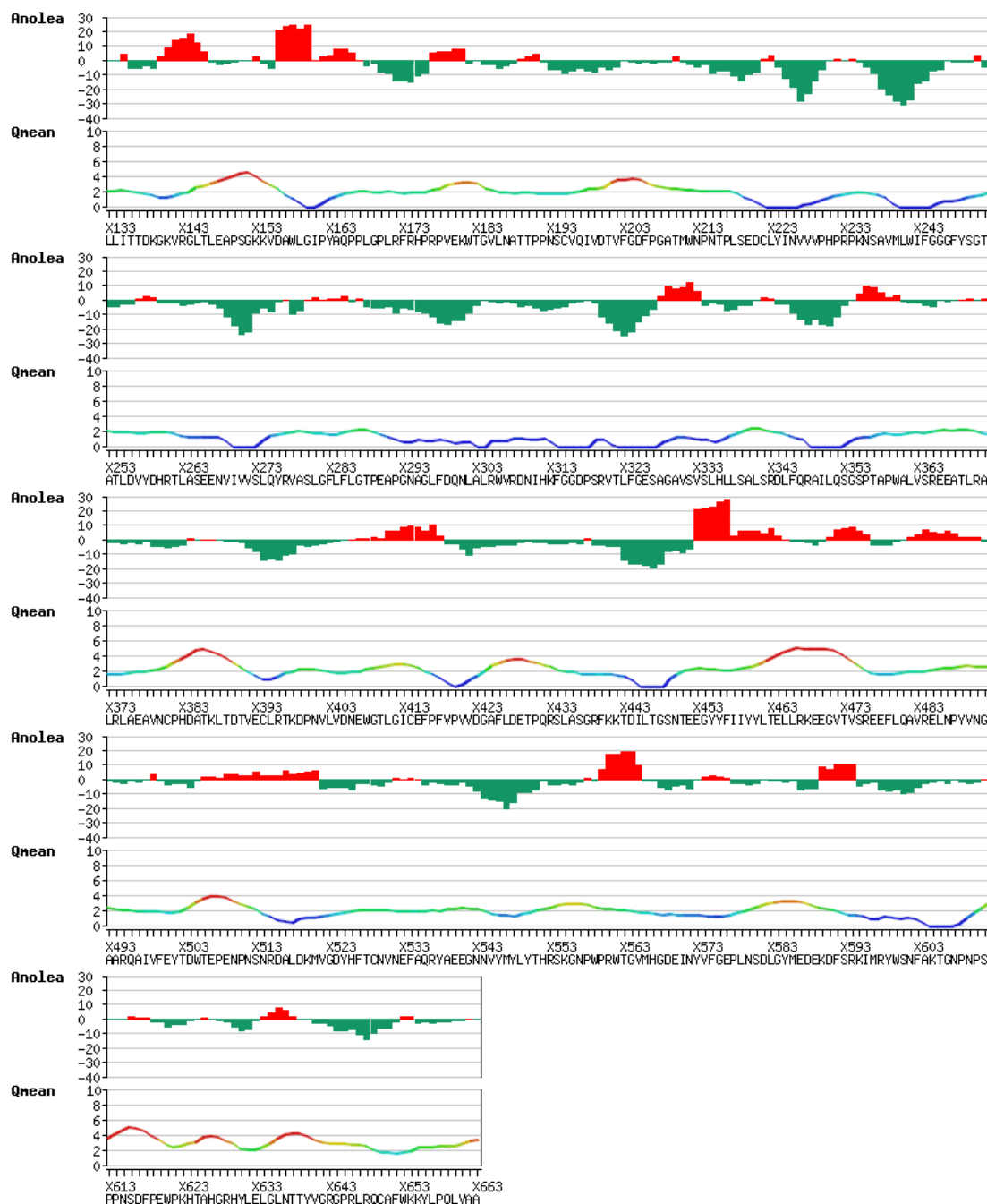
Figura 7 - Z-score do modelo da AChE de *Ae. aegypti*.



As ferramentas disponíveis no SwissPDB Viewer, como Anolea / QMEAN, também foram utilizadas para avaliação da qualidade do modelo. O programa usa potenciais de força média para cálculos da energia de cada um dos resíduos do modelo e exibe os resultados sob a forma de um gráfico. O gráfico exibe uma curva que mostra a energia de cada resíduo (interações com os átomos circundantes). Se não houver contatos ruins, a

energia está em torno ou abaixo de zero, enquanto maus contatos terão alta energia, acima da linha zero (regiões vermelhas) (MICHIELIN *et al.*, 2008). Esse gráfico mostra que a maioria dos contatos de interação entre os átomos foram bons, demonstrando a boa qualidade do modelo.

Figura 8. Gráfico Anolea / QMAEN modelo da AChE de *A. aegypti*.



4- CONCLUSÃO

A principal motivação para construção desse modelo foi, devido não existir uma estrutura cristalográfica da AaAChE no banco de proteínas (Protein Data Bank). Por isso foi feito estudo com a sequência de aminoácidos primários da enzima AaAChE, onde foi criado um modelo para esta sequência que apresentou boa qualidade, sendo a estrutura adequada para estudo futuro de desenvolvimento de novos ligantes, que consigam inibir essa enzima e com isso eliminar o vetor transmissor da dengue e do zica virus o mosquito *Aedes aegypti*.

O alinhamento das sequências primárias de aminoácidos do modelo com a proteína molde, apresentou uma boa identidade entre os aminoácidos alinhados de aproximadamente cinquenta por cento e uma similaridade ainda melhor acima de sessenta por cento.

Analisando os sítios de interações da enzima periférico e catalítico, através de uma sobreposição do modelo com o molde; foi observado que o sítio periférico sofreu algumas modificações e o sítio catalítico permaneceu totalmente conservado.

Observamos que o número de aminoácidos na estrutura gerada pelo *Swiss Model* que se encontram fora da região mais provável é baixo, um percentual de 0,99%, já SwissPDB Viewer, como Anolea / QMEAN, os gráficos demonstram bons contatos de interação dos resíduos com os átomos circundantes de baixa energia indicando a boa qualidade do modelo.

5- REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F. **et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST. A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, **25**, 3389–3402. (1997).

ARNOLD, K. The Swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Struct. Bioinf.*, v.22, pp.195-201, 2006.

BAJORATH, J.; STENKAMP, R.; ARUFFO, A. Knowledge-based model building of proteins: Concepts and examples. **Protein Science**, v. 2, p. 1783-2000.

Benkert, P. **et al.** QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. **BMC Struct. Biol.**, **9**, 35. 2009.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDER, T. "Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics.**, v. 27, pp. 343-350, 2011.

BIASINI, M. *et. al.* **SWISS-MODEL**: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 252-258, 2014.

BORDOLI, L. Protein structure homology modeling using Swiss-model workspace. *Nat. Protoc.* v. 4, pp.1-13, 2009.

CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 676-683, 2009.

CHOTIA, C. & LESK, A. M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **The EMBO Journal**. v. 5, pp. 823-826, 1986.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, p. 162-173, 2009.

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

HOOFT, R. W. W.; VRIEND, G.; SANDER, C.; ABOLA, E. E.; **Nature**, 381, 272. 1996.

LASKWSKI, R. A. ; MACARTHUR M. W.; MOSS, D. S. & THORNTON J. M. **PROCHECK**: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. 283-291, 1993.

LOVELL, S. C. *et. al.* **Structure validation by Calpha geometry**: phi, psi and C-beta deviation. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 50, p. 437-450, 2012.

MARQUES, P. & YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Quimica. Nova. V.* 31, no. 7, p. 1791-1799, 2008.

MICHIELIN, O & CUENDET, M. Protein-Protein Interaction Investigated by Steered Molecular Dynamics: The TCR-pMHC Complex. **Biophysical Journal**, V 95, 3575–3590 , October 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. ; LEHNINGER. **Princípios de Bioquímica**. 3º Edição. Editora Ltda, Brasil. 2002.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISKEHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**. v. 23, pp. 283-256, 1968.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein engineering**. v. 12, pp. 85- 94, 1999.

RYDBERG, E.H. *et. al.* Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. **Journal of medicinal Chemistry**. v. 49 pp. 5491-5500, 2006.

ROST, B.; SANDER, C.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25, 113. 1996.

SANTOS FILHO, O. A. & ALENCASTRO, R. B. Modelagem de Proteínas por Homologia. **Quim. Nova**. v. 26, pp. 253-259, 2003.

SAUDER, J. M.; ARTHUR, J. W.; DUNBRACK, R. L.; *Proteins*, 40, 6. 2000.

SCHWEDE, T. Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**. v.31, pp.3381-3385, 2003.

SILVA, A. E. **Estimação de parâmetros em modelos matemáticos de sistemas reacionais enzimáticos e de expansão de poliuretanos**. p.111, 2017 Dissertação (em área envolvida) – UFP, Curitiba, 2017.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, 17, 355–362. 1993.

THORNTON, J.; SWINDELLS, M. B.; Em *Molecular Structures in Biology*; Diamond, R.; Koetzle, T. F.; PROUT, K. Richardson, J. S., eds.; **Oxford University Press**: Oxford, 1993.