

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

Paulo Henrique Gomes dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE REAÇÃO DAS
HIUASES E SUA EVOLUÇÃO EM VERTEBRADOS**

BELO HORIZONTE

2024

PAULO HENRIQUE GOMES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE REAÇÃO DAS
HIUASES E SUA EVOLUÇÃO EM VERTEBRADOS**

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioinformática.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Bleicher

Coorientador: Prof. Dr. José Fernando Ruggiero Bachega

BELO HORIZONTE

2024

043

Santos, Paulo Henrique Gomes dos.

Caracterização computacional do mecanismo de reação das HIUases e sua evolução em vertebrados [manuscrito] / Paulo Henrique Gomes dos Santos. – 2024.

60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Bleicher. Coorientador: Prof. Dr. José Fernando Ruggiero Bachega.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Pré-Albumina. 3. hidroxissourato hidrolase. 4. Ácido Úrico /metabolismo. I. Bleicher, Lucas. II. Bachega, José Fernando Ruggiero. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA
FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULO HENRIQUE GOMES DOS SANTOS

"CARACTERIZAÇÃO COMPUTACIONAL DO MECANISMO DE REAÇÃO DAS HIUASES E SUA EVOLUÇÃO EM VERTEBRADOS"

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Lucas Bleicher - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Rafaela Salgado Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa Karen Cacilda Weber
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Willian Ricardo Rocha
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 21 de março de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Rafaela Salgado Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 22/03/2024, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Bleicher, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2024, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Willian Ricardo Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 28/03/2024, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Cacilda Weber, Usuário Externo**, em 01/04/2024, às 19:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3127055** e o código CRC **0C643B04**.

Referência: Processo nº 23072.216943/2024-90

SEI nº 3127055

AGRADECIMENTOS

É difícil abordar em palavras o agradecimento que tenho a todas as pessoas que durante esses dois anos foram de extrema importância para a produção do meu trabalho. Porém, existem pessoas que não posso deixar de mencionar explicitamente como meus pais Ailton Aguiar dos Santos e Glaucia Maria Gomes dos Santos, assim como minha irmã Laura Gomes dos Santos e meu cunhado Pablo Heinrich Cunha Parreiras que são meus familiares mais próximos e que em todo o meu processo de formação desde o ensino básico me apoiaram com os estudos, e também nas dificuldades foram minhas muletas para seguir em frente. Para além de familiares, também é esperado que o processo de produção científica seja desenvolvido a partir da colaboração e camaradagem de pessoas, dito isso, durante o mestrado fiz muitas conexões dentro e fora do departamento de Bioquímica, e essas conexões foram responsáveis pelo meu crescimento pessoal e intelectual. Gostaria então de mencionar dois nomes, dois grandes amigos do programa de bioinformática que estiveram comigo durante meu mestrado. Eduardo Horta e Henry Granger foram companheiros no qual para além do aprendizado estiveram comigo em momentos de altos e baixos, e nunca me negaram suporte emocional e até mesmo fugiram de suas rotinas em momentos que eu precisava de ajuda.

Gostaria também de agradecer aos meus orientadores pela paciência e perseverança em trabalhar comigo do início ao fim sempre respondendo minhas dúvidas e me ajudando a abrir caminhos para nossos problemas. Foram dois orientadores que já compartilhavam um laço de amizade e que, através do trabalho conjunto de me orientar, foram capazes também de estender esse carinho de amizade que já possuíam..

Por fim, também agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por desempenharem o importante papel de incentivar o desenvolvimento científico no nosso país, e me deixa orgulhoso de saber que fui capaz de através delas compartilhar minha pedrinha de conhecimento no vasto oceano da ciência brasileira.

“A diferença entre
passado, presente e futuro
é apenas uma persistente
ilusão”

Albert Einstein

RESUMO

A transtirretina (TTR) é uma proteína que exerce diversas funções no organismo dos vertebrados, dentre as quais inclui-se o transporte de hormônios tireoídianos que são de extrema importância para o controle do metabolismo e da temperatura do corpo. Contudo, foram identificados homólogos dessas proteínas em organismos invertebrados, os quais, por sua vez, possuem atividade de HIUase (conversão de 5-hidroxi-isourato em 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina, OHCU, a segunda etapa da via de decomposição de Ácido Úrico), suscitando dúvidas sobre o histórico evolutivo da família de proteínas TTR. Durante a evolução, muitos genes passam por processos de duplicação e divergência, sendo elas grandes forças motrizes da neofuncionalização. Um exemplo desses fenômenos é o gene responsável pela expressão da proteína TTR, a qual divergiu da função de HIUase (5-Hidroxiisourato Hidrolase) para o transporte de T4. Este trabalho avaliou a atividade enzimática de uma proteína ancestral reconstruída destas famílias de proteínas e comparou com a atividade de HIUases modernas. Para o estudo da atividade enzimática das estruturas foi utilizado métodos híbridos QM/MM na qual consistem em compartimentar o sistema a ser simulado em regiões clássica e quântica. Dito isso, é possível calcular o perfil de energia potencial e energia livre da quebra e formação de ligações químicas. Dois diferentes métodos foram utilizados para o cálculo da estrutura eletrônica da região quântica, PM6 e AM1dphot, que foram avaliados a fim de procurar o melhor método para amostrar a coordenada de reação. Além disto, foi feita dinâmica molecular das estruturas ligadas ao substrato, intermediário e produto da reação a fim de avaliar a afinidade de ligação usando MMPBSA e a estabilidade estrutural calculando o RMSD. Foi concluído que a estrutura ancestral se comportou de forma parecida com outras HIUases e o método AM1dphot qualitativamente mostrou de forma mais comportada as geometrias da coordenada de reação. Contudo não foi possível validar o método de cálculo de energia livre devido ao desconhecimento da etapa limitante da reação.

Palavras chave: QM/MM, Evolução Molecular, Dinâmica molecular, Enzimologia

ABSTRACT

Transthyretins (TTR) are proteins that perform several functions in the human body, like thyroid hormones transport in the cerebrospinal fluid. Those hormones are very important in the metabolism and body temperature regulation. Despite the specific functions performed by the TTR, other proteins that have homology with those showed a completely different function, that was the participation in the metabolism of uric acid. These proteins in question were the HIUase, an enzyme that converts the second metabolite in the degradation pathway of uric acid. Along evolution, several genes can duplicate, and after the duplication those can diverge from the initial function, and these processes lead to the neofunctionalization of the genes. The TTR and TTR like families of proteins are an example of neofunctionalization, where the HIUase proteins diverge to the thyroid transporter family TTR. In this work, we evaluated the enzymatic HIUase activity of an ancestral protein that was inferred between all the TTR and HIUases sequences in the protein sequence database, and once determined its activity we also compared with the catalytic properties of a modern HIUase from the *Danio rerio*. For the study of the enzymatic activity of the structures, hybrid QM/MM methods were used, which consist of compartmentalizing the system to be simulated into classical and quantum regions. With that said, it is possible to calculate the potential energy profile and free energy of bond breaking and formation. Two different methods were used for calculating the electronic structure of the quantum region, PM6 and AM1dphot, which were evaluated to find the best method for sampling the reaction coordinate. Additionally, molecular dynamics of the structures bound to the substrate, intermediate, and product of the reaction were performed to evaluate binding affinity using MMPBSA and structural stability by calculating RMSD. It was concluded that the ancestral structure behaved similarly to other HIUases and the AM1dphot method qualitatively exhibited the reaction coordinate geometries more reliably. However, it was not possible to validate the free energy calculation method due to unknowns regarding the rate-limiting step of the reaction.

Keywords: QM/MM, Molecular Evolution, Molecular Dynamics, Enzymology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de degradação das purinas.....	16
Figura 2 - Reconstrução ancestral das Uricases.....	17
Figura 3 - Dímero de TTR humana.....	18
Figura 4 - Homologia estrutural entre TTR e HIUase.....	19
Figura 5 - Conversão do 5HIU em OHCU.....	20
Figura 6 - Reconstrução ancestral das Hidroxi Isourato Hidrolases em vertebrados...	21
Figura 7 - Tetrâmeros das estruturas de HIUase analisadas e posições dos resíduos catalíticos.....	22
Figura 8 - Homologia das sequências analisadas.....	23
Figura 9 - Método Híbrido QM/MM.....	24
Figura 10 - Perfil de energia livre de uma reação.....	26
Figura 11 - Construção do PMF a partir do umbrella sampling.....	27
Figura 12 - Energia livre de ligação.....	29
Figura 13 - Modo de ligação do 5HIU.....	33
Figura 14 - Coordenadas PM6.....	37
Figura 15 - Coordenadas AM1dphot.....	38
Figura 16 - Coordenadas da <i>Klebsciella pneumoniae</i>	39
Figura 17 - Coordenadas AM1dphot expandida da <i>Klebsciella pneumoniae</i>	40
Figura 18 - Coordenadas AM1dphot expandidas das estruturas de <i>D. rerio</i> e ancestral..	41
Figura 19 - Coordenadas refinadas usando DFT.....	42
Figura 20 - PMF utilizando PM6.....	43
Figura 21 - PMF utilizando AM1dphot.....	44
Figura 22 - Visualização gráfica do MMPBSA.....	48
Figura 23 - RMSD de todos os complexos centrado no ligante.....	50
Figura 24 - RMSD centrado no ligante das triplicatas do intermediário.....	50
Figura 25 - Conformações do intermediário no sítio ativo do <i>D. rerio</i>	51
Figura 26 - RMSD centrado na proteína do complexo intermediário.....	52

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos da HIUase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
Tabela 2 - Sistemas e condições simuladas para a primeira etapa do mecanismo de reação proposto.....	36
Tabela 3 - MMPBSA D. rerio.....	47
Tabela 4 - MMPBSA ancestral.....	47

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Hamiltoniano híbrido.....	25
Equação 2 - Barreira de energia livre.....	26
Equação 3 - Valor de energia médio.....	26
Equação 4 - Equação de Eyring.....	27
Equação 5 - Método de obtenção da energia livre de ligação.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

TTR = Transtirretina

CSF = Fluido cérebro espinhal

HIUase = Hidroxiisourato hidrolase

5HIU = 5-Hidroxiisourato

OHCU = 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina

RMSD = *Root Mean Square Deviant*

QM/MM = *Quantum Mechanics / Molecular Mechanics*

PMF = *Potential of Mean Force*

WHAM = *Weighted Histogram Analysis Method*

DFT = *Density Functional Theory*

PB = *Poisson Boltzman*

GB = *Generalized Born*

PES = *Relaxed Potential Surface Energy Scan*

NPT = Ensemble com número de moléculas, pressão e temperatura constantes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Transtirretinas e HIUases	15
1.2. Metabolismo do ácido úrico	16
1.3. Estrutura e função das HIUases	18
1.4. Reconstrução de Ancestrais	21
1.5. Métodos Híbridos QM/MM	23
1.6. Energia de solvatação e interação	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Coordenadas da reação	33
4.2. Dinâmica Molecular e MMPBSA	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1. Coordenadas de reação	36
5.2. <i>Umbrella Sampling</i>	43
5.3. MMPBSA	46
5.4. Dinâmica molecular e RMSD	50
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	53
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtirretinas e HIUases

A transtirretina (TTR) é uma proteína que exerce diversas funções no organismo dos vertebrados, dentre as quais inclui-se o transporte de hormônios tireoidianos que são de extrema importância para o controle do metabolismo e da temperatura do corpo. Nesse processo, o hormônio em sua forma inativa (T₄) é transportado no sangue, principalmente por proteínas como a globulina de ligação à tiroxina (Köhrle J., 2007). Porém, no fluido cefalorraquidiano (CSF), o principal transportador desses hormônios na forma T₄ são as proteínas TTR (Hagen, G. A., Elliot, W. J., 1973). Evidências mostram possíveis outras funções para a TTR, como distribuição de retinol, atividade de metaloprotease e prevenção de β -amiloides no CSF (Kanai et al., 1968; Monaco et al. 1995; Liz et al., 2012; Schwarzman et al., 1994).

Foram identificados homólogos dessas proteínas em organismos invertebrados, os quais, por sua vez, possuem atividade de HIUase (conversão de 5-hidroxi-isourato em 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina, OHCU, a segunda etapa da via de degradação do Ácido Úrico), suscitando dúvidas sobre o histórico evolutivo da família de proteínas TTR (Richardson S., Cody V., 2009). A família de proteínas HIUase compartilhou em média 35% de identidade com a família de TTRs em um alinhamento múltiplo com 49 sequências (Eneqvist et al., 2003), além de seus sítios de ligação também serem localizados na mesma região da interface entre os dímeros (Eneqvist et al., 2003; Hennebry et al., 2006; Jung et al., 2006; Lundberg et al., 2006; Zanotti et al. 2006). Essas evidências mostram que existe um caminho evolutivo em comum entre as duas famílias de proteínas e que, em algum ponto, deve ter existido um ancestral comum.

Durante a evolução, muitos genes passam por processos de duplicação e divergência, sendo elas grandes forças motrizes da neofuncionalização. Um exemplo desses fenômenos é o gene responsável pela expressão da proteína TTR, a qual divergiu da função de HIUase (5-Hidroxiisourato Hidrolase) para o transporte de T₄ no CSF e das outras funções mencionadas anteriormente nos organismos vertebrados (Yamauchi K., Kasai K., 2018). Este trabalho avaliou a atividade das HIUases dentro da filogenia de uma proteína ancestral comum entre HIUases e Transtirretinas que foi reconstruída no trabalho de Lucas Carrijo *et al* 2021.

1.2. Metabolismo do ácido úrico

Em primatas, principalmente hominídeos, o metabolismo das purinas termina na formação de ácido úrico, que é excretado pela urina como destacado na Figura 1. Kratzer J. T. et al (2014) na Figura 2, mostraram evidências que houve seleção ao longo do tempo para a diminuição da atividade catalítica da Uricase, enzima responsável pela oxidação do ácido úrico (Kratzer J. T. *et al*, 2014). Essa diminuição da atividade enzimática da Uricase leva a uma condição de hiperuricemia, e o acúmulo de ácido úrico está relacionado também a doenças cardiovasculares e hipertensão, que nos EUA é uma das principais causas de morte anuais (Watanabe S., et al 2002). No Brasil cerca de 388 pessoas morrem por dia por hipertensão, e as doenças cardiovasculares também são uma das principais causas de morte nas Américas em geral (OMS 2023, Ministério da Saúde 2023) .

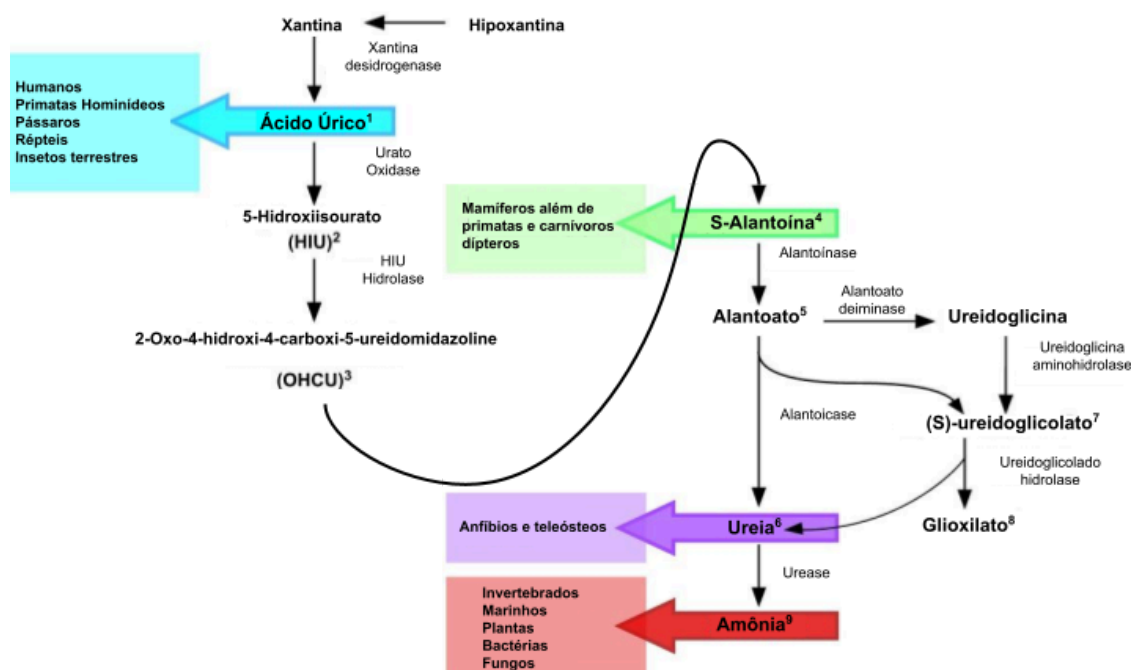


Figura 1 - Via de degradação das purinas.

Muitos mamíferos e outros primatas percorrem a via da degradação das purinas até a formação de alantoína, enquanto em hominídeos a via termina na formação do ácido úrico. A urato oxidase (Uricase), HIU hidrolase (HIUase) e OHCU descarboxilase são as enzimas responsáveis por continuar a degradação do ácido úrico. Adaptado de Lee I. R. *et al*, 2013.

Contudo, por que a evolução selecionaria genes que podem acarretar tais comorbidades? Evidências destacam que a hipertensão e as doenças cardiovasculares são consequências de hábitos alimentares modernos, causados pela dieta baseada em alimentos industrializados e o excesso de sódio (Watanabe S., et al 2002). As principais hipóteses explicam que as mutações na uricase aconteceram no mioceno, e que a alimentação dos nossos ancestrais, baseada em frutas e baixa quantidade de sais, propiciou o silenciamento de parte da via da degradação das purinas, levando ao acúmulo do ácido úrico (Kratzer J. T. *et al*, 2014, Watanabe S., et al 2002). A hiperuricemia no contexto moderno pode trazer comorbidades, porém no contexto de nossos ancestrais, a dieta frugívora combinada ao acúmulo de ácido úrico concederia vantagem evolutiva ao induzir um maior acúmulo de triglicerídeos (Kratzer J. T. *et al*, 2014). Na Figura 2, nota-se uma grande queda, de quase duas ordens de grandeza, da atividade catalítica das Uricases antes mesmo da perda da atividade nos homínídeos. No entanto, é possível que o silenciamento da função da Uricase tenha um impacto na atividade das proteínas subsequentes da via. Sabendo disso, a perda gradual da função dessas enzimas e seu silenciamento poderia afetar a atividade de enzimas posteriores como, por exemplo, a HIUase?

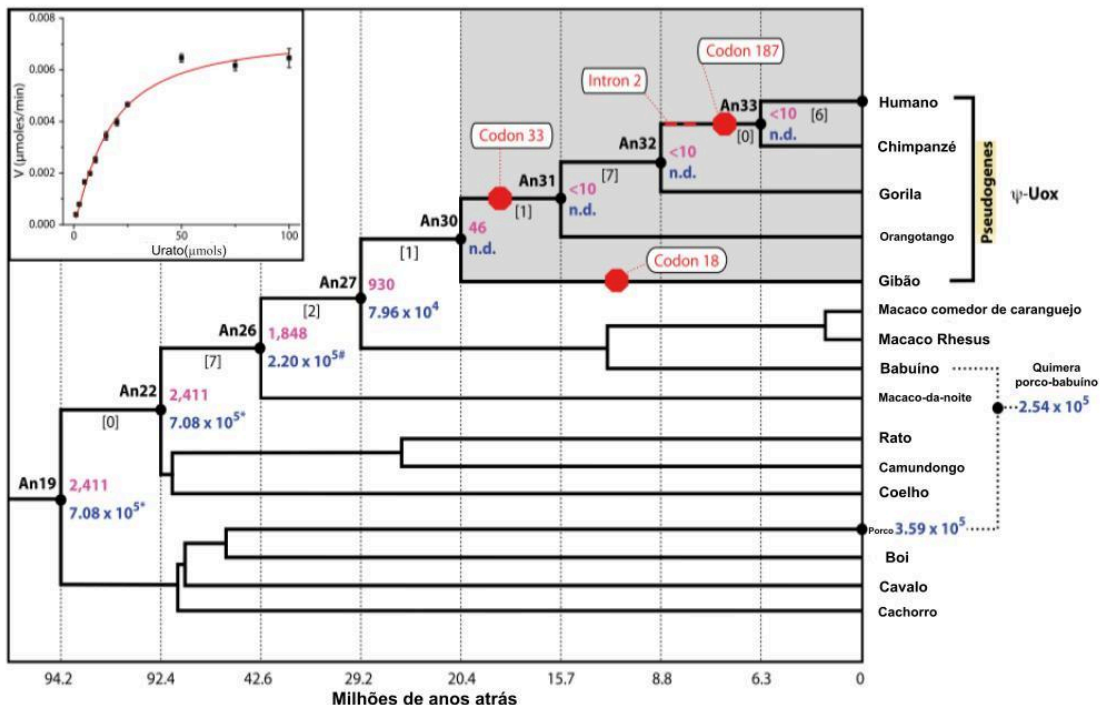


Figura 2 - Reconstrução ancestral das Uricases.

A diminuição da atividade enzimática ao longo dos anos por volta de 20 MYA. Os números azuis representam a eficiência catalítica. Adaptado de Kratzer J. T. *et al*, 2014.

1.3. Estrutura e função das HIUases

A HIUase, assim como a TTR humana, é uma estrutura homotetramérica na qual cada monômero tem por volta de 55 KDa e 120 resíduos de aminoácidos. Sua estrutura é formada por 8 fitas beta divididas de A a H que formam 2 folhas-beta. Todas as fitas interagem de forma antiparalelas, com exceção das fitas A e G. Ao todo, 7 alças ligam as folhas-beta, que possuem de 12 a 15 resíduos, com a última alça, situada após a fita H, que contém uma alfa-hélice composta de 7 resíduos (Blake C. C. F. *et al*, 1974). A estrutura dos dímeros pode ser observada na Figura 3.

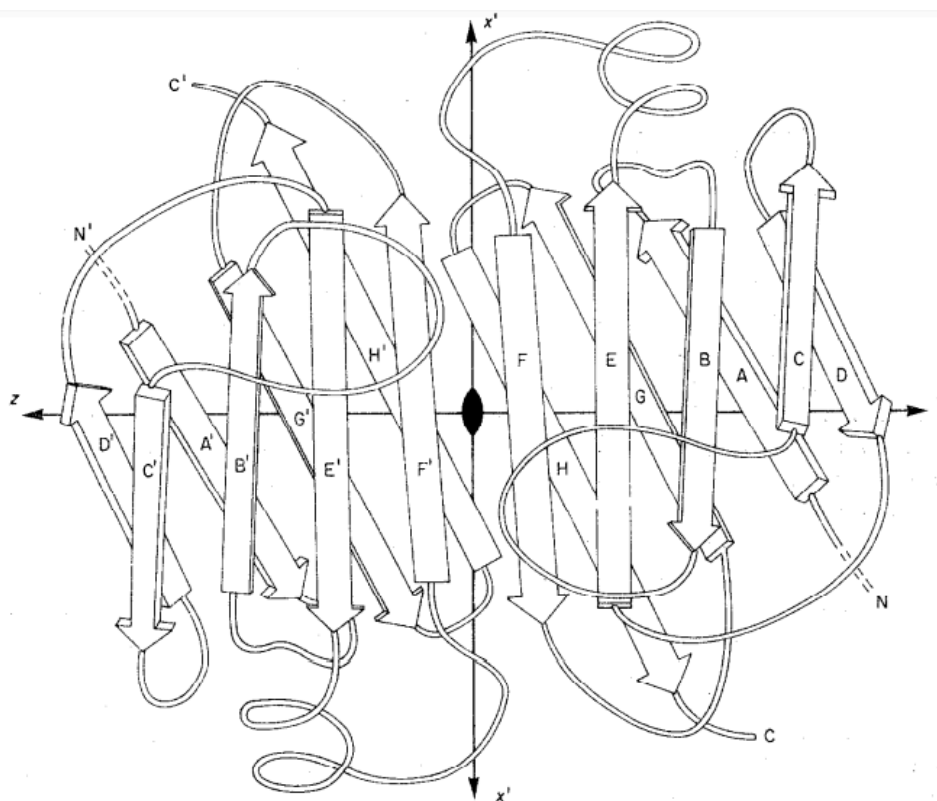


Figura 3 - Dímero de TTR humana.

Os monômeros da TTR humana formam dímeros que interagem de forma espelhada, expondo a região hidrofóbica das folhas beta (Blake C. C. F. *et al*, 1974).

Os dímeros se ligam mediante interações das fitas beta H e F de forma antiparalela, como mostrado na Figura 3. O homotetrâmero é formado pela complexação de um dímero de dímeros mediado pela interação das fitas CBEFF'E'B'C, formando uma cavidade central de aproximadamente 10 \AA^3 . A cavidade formada é predominantemente hidrofóbica, permitindo a ligação das moléculas transportadas pela TTR humana. Por sua vez, a HIUase forma um

homotetrâmero no qual a cavidade central é polar e carregada (de Oliveira et al., 2021). Apesar das diferenças na função, a estrutura da HIUase e TTR humana se conservam, e em um alinhamento é possível obter RMSD inferior a 2 Å, como mostrado na Figura 4.

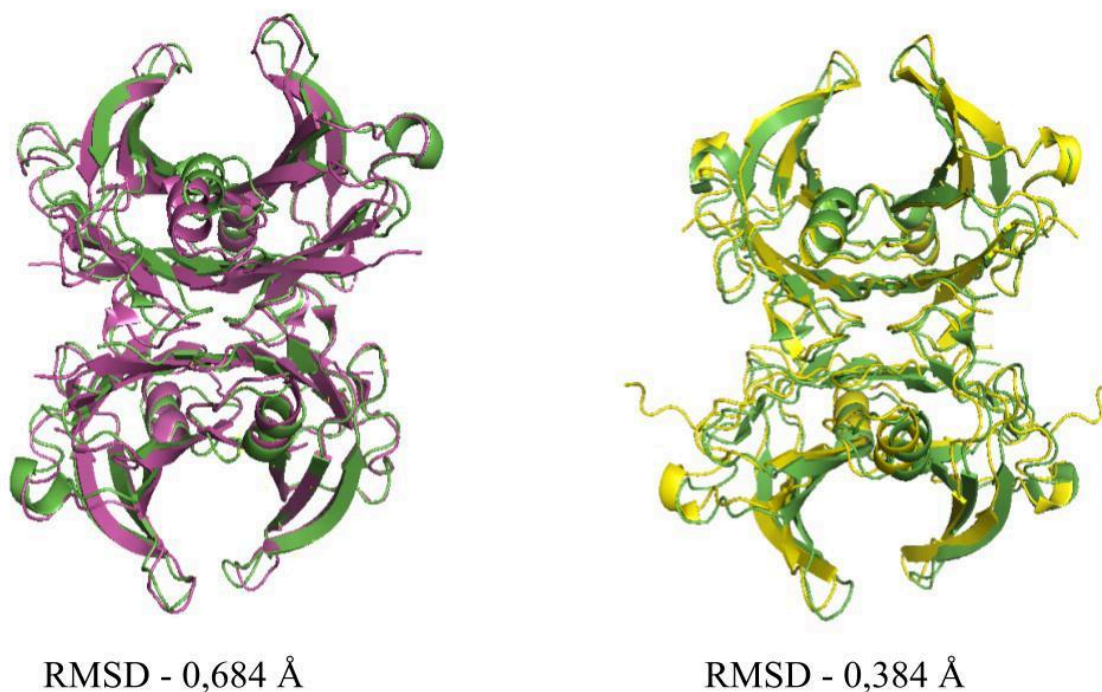


Figura 4 - Homologia estrutural entre TTR e HIUase.

Alinhamento estrutural entre HIUase de *Danio rerio* (verde) e TTR humana (roxo) e HIUase Ancestral (Amarelo). Alinhamento gerado pelo PyMol.

A Figura 4 mostra a conservação estrutural e a homologia entre as TTR e HIUases. No entanto, há divergência das funções, oriundas de pequenas diferenças estruturais entre as duas famílias. Dito isso, as propriedades físico-químicas dos resíduos catalíticos possuem influência na neofuncionalização das TTR. Por sua vez, os aminoácidos carregados presentes na região catalítica da Hidroxi Isourato Hidrolase são importantes para a captura de uma molécula de água e conseqüentemente o início da catálise enzimática, enquanto os resíduos hidrofóbicos nas Transtirretinas desempenham um papel importante na ligação ao T4.

Existem na literatura medidas das propriedades cinéticas da reação da HIUase de *Klebsciella pneumoniae*, assim como o impacto de mutações em resíduos importantes. French J. B (2011) propôs também um mecanismo de ação para a hidrólise do 5HIU, dada pela Figura 5.

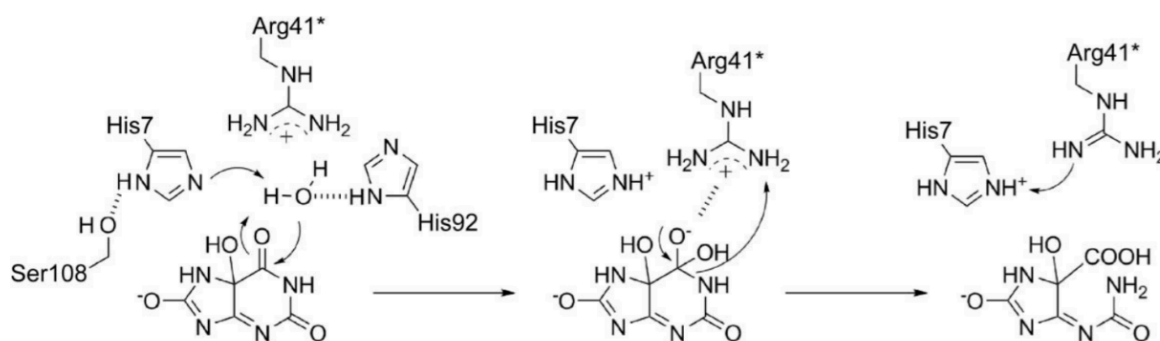


Figura 5 - Conversão do 5HIU em OHCU.

Mecanismo de reação proposto por French J.B para a HIUase de *Klebsciella pneumoniae* (French J. B.; Ealick S. E., 2011).

Nesse mecanismo proposto, nota-se o papel dos resíduos de histidina e arginina, aminoácidos carregados com grande importância na catálise enzimática em ambas as etapas. Na qual, como observado na Tabela 1, possui grande impacto no K_m e no k_{cat} da enzima.

	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
Native KpHIUH	172 ± 2	103 ± 2	1.7×10^6
H7N	0.8 ± 0.09	4400 ± 500	1.8×10^2
R41K	34.7 ± 0.4	195 ± 3	1.8×10^5
H92N	0.35 ± 0.01	430 ± 10	8.2×10^2
S108A	81 ± 0.7	93 ± 2	8.7×10^5

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos da HIUase de *Klebsiella pneumoniae*.

A Tabela mostra o impacto de mutações em resíduos importantes na cinética enzimática da estrutura. (French J. B.; Ealick S. E., 2011).

Dito isso, é possível inferir que a primeira etapa da reação e a coordenação de uma molécula de água no sítio ativo podem ser cruciais para a cinética da reação. Na segunda etapa, por sua vez, a substituição da arginina pela lisina pode diminuir a cinética da reação, porém demonstrando um pequeno impacto na afinidade do substrato em μM . A substituição da serina na posição 108 também teve impactos, contudo menos relevantes comparados aos outros, apesar de ser uma posição conservada em todas as estruturas de HIUase.

1.4. Reconstrução de Ancestrais

Em um recente trabalho do Laboratório de Biologia Computacional de Proteínas da UFMG, ancestrais de transtirretinas em três pontos diferentes de sua evolução foram calculados pela técnica de reconstrução de sequências ancestrais, expressas em *E. coli* e caracterizadas por cristalografia e calorimetria (L. Carrijo *et al*, 2021). As duas ancestrais de transtirretina calculadas após o evento de duplicação gênica (uma referente à mais antiga ancestral comum de transtirretinas após a duplicação e outra à ancestral comum das transtirretinas de *Eutheria*) foram capazes de se ligar ao T4 segundo os experimentos de calorimetria. A mais antiga teve estrutura cristalográfica determinada por difração de raios-x, observando-se a presença de duas moléculas de T4 em seus sítios de ligação. Já a ancestral de todas as transtirretinas e HIUases de vertebrados (isso é, a que representa a sequência mais provável antes do evento de duplicação) foi incapaz de se ligar ao hormônio T4. No entanto, uma análise de *docking* sugere que ela teria sido capaz de se ligar ao 5-hidróxi-isourato (produto da primeira reação de degradação de ácido úrico pela uricase) de forma similar ao de HIUases modernas (de Oliveira *et al.*, 2021). Neste trabalho, portanto, propõe-se avaliar a atividade de HIUase da proteína ancestral e compará-la à de hidroxí isourato hidrolases modernas, evidenciadas na Figura 6.

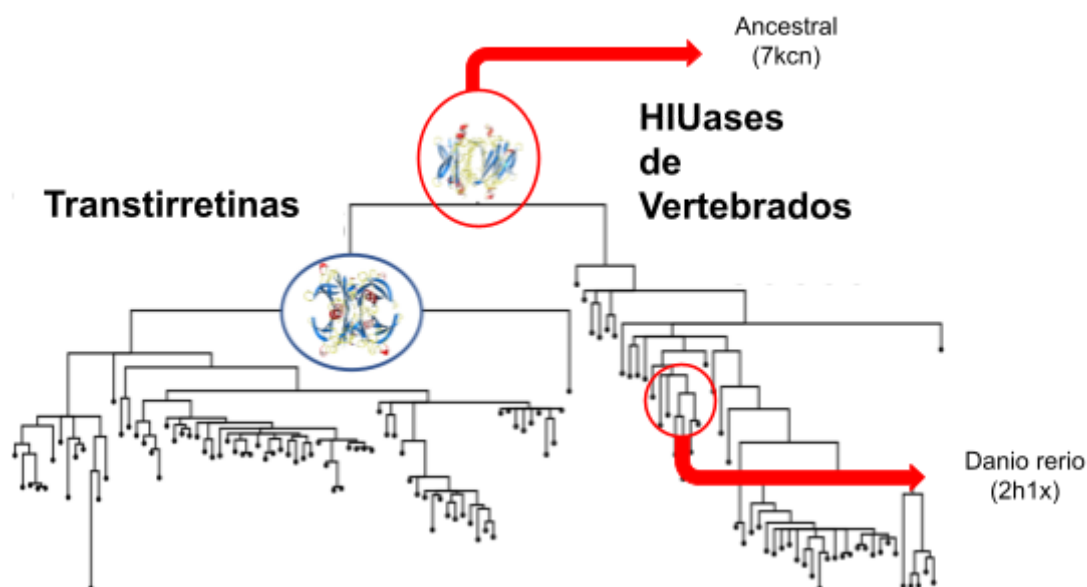


Figura 6 - Reconstrução ancestral das Hidroxí Isourato Hidrolases em vertebrados.

A proteína ancestral foi comparada com a estrutura moderna do *Danio rerio*.

Entre a estrutura ancestral que será analisada e a estrutura moderna do *Danio rerio*, nota-se uma semelhança estrutural entre as proteínas, com algumas pequenas diferenças, como evidencia a Figura 7. Na Figura 4, a região da alfa hélice, assim como o sítio ativo, demonstra diferenças espaciais. O sítio ativo, por sua vez, possui divergência no volume da cavidade, onde a estrutura ancestral possui um maior espaço na região catalítica.

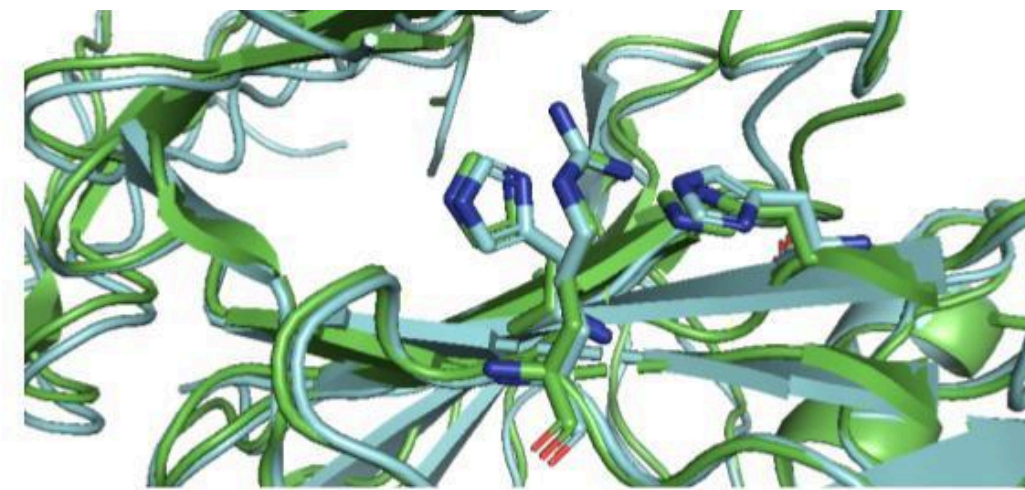


Figura 7 - Tetrâmeros das estruturas de HIUase analisadas e posições dos resíduos catalíticos.

A posição dos aminoácidos importantes se conservam nas estruturas de *Danio rerio* (verde) e a ancestral (ciano). Figuras geradas pelo PyMol e Chimera X.

Apesar disso, os resíduos catalíticos conservam sua posição nas estruturas e sequências das HIUases como evidencia a Figura 7 e Figura 8 respectivamente. No alinhamento da sequência, os aminoácidos conservam suas propriedades de polaridade e carga em geral. Todavia, as divergências encontradas possivelmente levam às pequenas mudanças estruturais observadas anteriormente, apesar da alta identidade entre as estruturas.

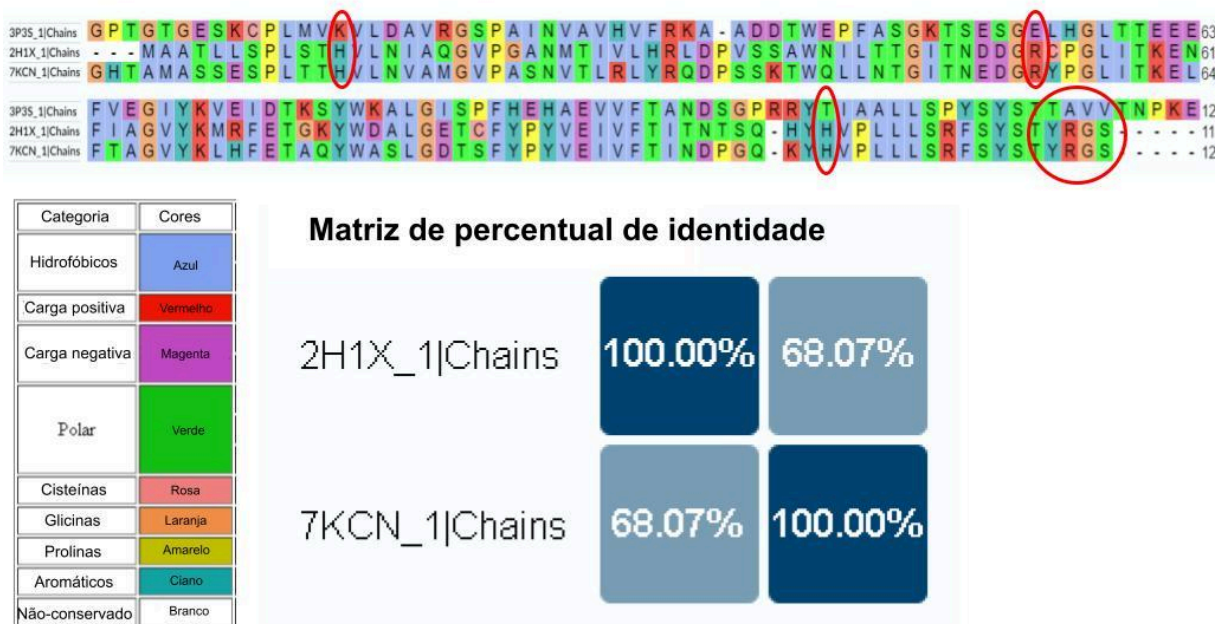


Figura 8 - Homologia das sequências analisadas.

Alinhamento realizado pelo UniProt das estruturas analisadas e uma estrutura de TTR humana.

Para comparar a atividade enzimática das estruturas, foram utilizados métodos híbridos QM/MM de simulação molecular. Para computar a contribuição energética da quebra e da formação de ligações químicas, é necessário o uso da mecânica quântica. Dessa forma, podemos obter os perfis de energia potencial e de energia livre das reações químicas nas diferentes estruturas analisadas. A partir de uma coordenada de reação, podemos calcular parâmetros cinéticos e avaliar a atividade enzimática dessas estruturas. Comparando as barreiras e os perfis de energia da proteína ancestral com estruturas modernas, é possível constatar se a proteína ancestral inferida se comporta de forma parecida com as proteínas conhecidamente ativas e se possui uma maior ou menor constante cinética de catálise.

1.5. Métodos Híbridos QM/MM

A estratégia de compartimentar sistemas moleculares em diferentes níveis de teoria é conhecida como métodos híbridos. Durante a popularização das simulações moleculares de biomoléculas, os métodos híbridos tornaram-se emergentes, chegando a ter um trabalho laureado com o prêmio Nobel em 2013 pelo desenvolvimento dos métodos QM/MM (Clemente C. M., 2023). Entretanto, apesar do grande salto computacional observado no

século XXI, a tarefa de resolver a equação de Schrödinger para moléculas grandes como proteínas ainda não é um horizonte palpável. De forma a diminuir o custo computacional do estudo desses grandes sistemas, foi necessário o desenvolvimento de estratégias para diminuir o processamento necessário e ainda ser capaz de recuperar informações energéticas importantes para os processos químicos. Dito isso, na exploração da atividade enzimática de proteínas, a utilização dos híbridos QM/MM pode ser uma ótima alternativa para se obter informações catalíticas. Esse método foi utilizado, por exemplo, para determinar o mecanismo das Glicosilases de timina do DNA (Kanaan N. *et al.*, 2015). Esse tipo de estratégia é amplamente aplicado quando a pergunta envolvida requer o entendimento da reatividade química das enzimas. Para isso, deve-se separar o sistema em regiões *quântica* e *clássica*. Dessa forma, é possível utilizar a mecânica quântica para calcular a estrutura eletrônica na região do sítio ativo, enquanto a região clássica permitiria obter os impactos da estrutura da proteína em sua atividade enzimática, assim tendo um maior custo-benefício computacional (Clemente C. M., 2023). Porém, é preciso haver um hamiltoniano híbrido capaz de comunicar as duas interfaces teóricas, para que as cargas parciais da região clássica tenham interação com os elétrons da parte quântica.

Neste trabalho, utilizamos o hamiltoniano híbrido desenvolvido pela equipe do software *pDynamo* (Field M. J., 2008), dado por:

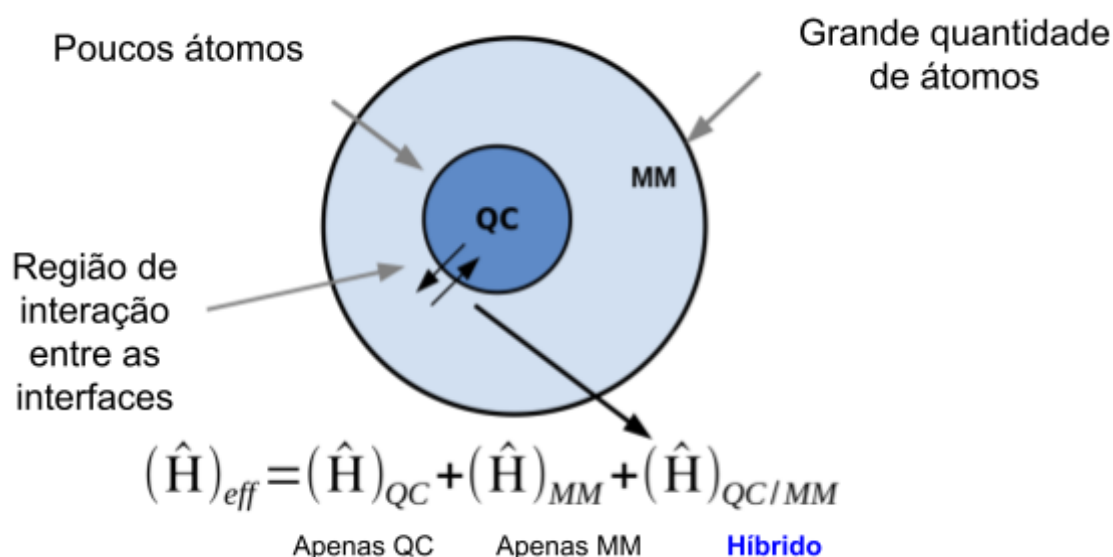


Figura 9 - Método Híbrido QM/MM.

Esquemática da divisão dos sistemas híbridos QM/MM e equação do hamiltoniano efetivo do sistema que consiste na somatória dos hamiltonianos de cada partição.

$$(\hat{H})_{QC/MM} = - \sum_{sm} \frac{q_m}{r_{sm}} + \sum_{im} \frac{Z_i q_m}{r_{im}} + \sum_{im} \left\{ \frac{A_{im}}{r_{im}^{12}} - \frac{B_{im}}{r_{im}^6} \right\}$$

Equação 1 - Hamiltoniano híbrido.

Composto de um termo de Coulomb e outro de Lennard Jones, responsáveis por comunicar as cargas parciais da região clássica com as partículas da região quântica, em que s e i são os elétrons e as cargas dos núcleos QM, respectivamente, em as cargas parciais MM.

O hamiltoniano híbrido consiste em um termo de Coulomb responsável por recuperar a energia de interação das cargas e em um termo do tipo Lennard Jones que computará as contribuições de energia das repulsões entre os núcleos das duas interfaces teóricas.

Para calcular a barreira de energia responsável pela transferência de uma hidroxila de uma molécula de água para o substrato 5-hidróxi-isourato da enzima HIUase, utilizamos a interface gráfica EasyHybrid (Bachega J. F. R., 2013). As coordenadas de reação foram calculadas tanto para a HIUase ancestral anterior à duplicação gênica obtida pela estrutura cristalográfica publicada (código PDB: 7KCN), quanto para uma enzima de um vertebrado moderno (*Danio rerio*) obtida pela estrutura cristalográfica publicada (código PDB: 2H1X). As coordenadas são calculadas de forma manual utilizando uma proposta de mecanismo como referência, e a partir dessas coordenadas obtemos um perfil da superfície de energia potencial.

A energia potencial de um sistema por si só não é capaz de nos fornecer as informações cinéticas desta reação. Dito isso, utilizamos o método de termodinâmica estatística *Umbrella Sampling* para recuperar a energia livre ao longo da coordenada de reação (Laidler K. J *et al*, 1965, Field M. J, 1999). A partir de uma coordenada de reação é possível calcular o PMF (*Potential of Mean Force*) e gerar o perfil de energia livre daquela coordenada de reação. Para isso, é necessário realizar dinâmicas moleculares em cada janela gerada na coordenada de reação a fim de obter o potencial médio da reação. Contudo, para conseguir amostrar microestados nas conformações intermediárias entre reagentes e produtos é necessário utilizar um potencial enviesado a fim de forçar o caminho de reação. No exemplo da Figura 10, os pontos intermediários I1 e I2 são forçados através de restrições harmônicas, permitindo a amostragem e obtenção da energia livre nesses pontos.

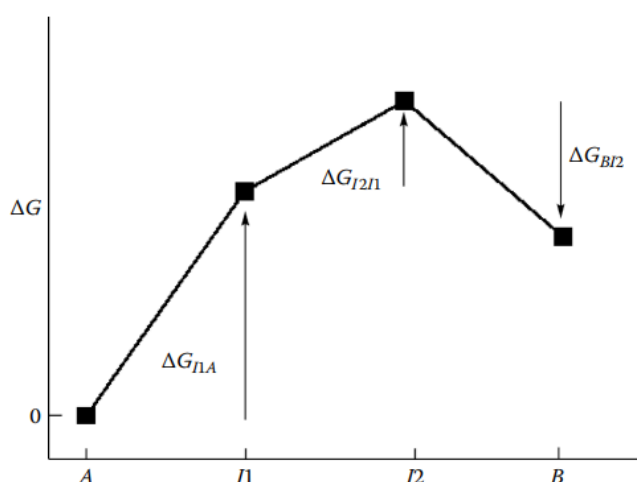


Figura 10 - Perfil de energia livre de uma reação.

O perfil de energia mostra a coordenada de reação de uma conformação A para a B sendo necessário percorrer pelos intermediários I1 e I2 (Field M. J, 1999).

Sabendo disso, a energia livre de Gibbs é obtida através da junção dos potenciais médios de cada janela obtidas na dinâmica molecular, e a barreira de energia entre o estado A e B pode ser dada por:

$$\Delta G = -RT \ln \left\langle \exp \left(-\frac{E}{RT} \right) \right\rangle$$

Equação 2 - Barreira de energia livre.

Na qual R é a constante dos Gases Ideais, T a temperatura e E a energia potencial média (Field M. J, 1999).

Na Equação 2 a energia E de cada janela é computada em função do estado restringido pelo potencial enviesado, que é dado por:

$$E_{\text{umb}}(s) = \frac{1}{2}k (s - s_0)^2$$

Equação 3 - Valor de energia médio.

Em que k é a constante de força aplicada, s_0 o valor de energia da janela restringida e s o valor dinâmico da amostragem de cada janela (Arnab M., Willbee D. S., 2013).

No entanto, cada janela terá um perfil de energia livre distribuído de forma diferente. Dessa forma, o PMF total da coordenada de reação pode ser montado a partir dos pontos de sobreposição de cada uma das janelas computadas, como mostrado na Figura 11. Métodos de análises de histogramas podem ser eficientes para montar o perfil total do PMF da reação, como por exemplo o WHAM (*Weighted Histogram Analysis Method*) (Kumar S. *et al.*, 1992).

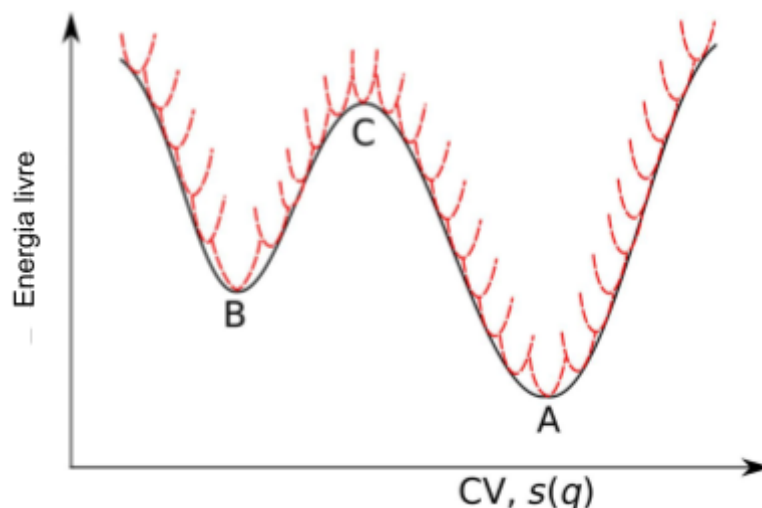


Figura 11 - Construção do PMF a partir do *umbrella sampling*.

A figura exemplifica a construção de um PMF total a partir do WHAM. Em vermelho, observa-se a amostragem baseada no potencial enviesado de cada janela ao longo de uma coordenada de reação. A reação percorre de B a A, passando pelo intermediário C (Qinghua L., 2020).

Obtendo a energia livre de ativação da reação é possível calcular a constante cinética da reação através da equação de Eyring, dada por:

$$k = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

Equação 4 - Equação de Eyring.

Em que k é a constante cinética, ΔG^\ddagger a barreira de ativação de energia livre de Gibbs, κ o coeficiente de transmissão (pode ser calculado por meio da correção de Wigner), k_B a constante de Boltzman, T a temperatura e h a constante de Planck.

Vale ressaltar que os valores da barreira de energia livre em KJ/mol afetam a constante cinética de forma exponencial, isto é, pequenas variações na barreira de energia podem resultar em grandes impactos cinéticos. Dessa forma, é importante avaliar o erro estimado no método computacional, assim como utilizar os diferentes níveis teóricos de cálculo da estrutura eletrônica e refinar os valores de energia potencial com métodos mais precisos. Para isso, neste trabalho também calculamos as barreiras de energia livre para a estrutura da HIUase de *Klebsiella pneumoniae* depositada no PDB com o código 3QVA. Utilizando essa estrutura foi possível comparar o valor da barreira calculada e compará-la à barreira experimental obtida pelo K_{cat} medido por French J. B (French J. B.; Ealick S. E., 2011). E, além disso, comparamos os valores de energia potencial obtidos em diferentes métodos semi-empíricos como PM6 e AM1dphot, refinamos com DFT e aumentamos a região quântica a fim de obter os impactos no perfil de energia. Por fim, também foi proposto o uso do método MMPBSA para obter os valores de energia livre de ligação entre os complexos das estruturas analisadas com seus substratos, intermediário e produtos, que será discutido no tópico seguinte.

1.6. Energia de solvatação e interação

O custo computacional para se obter a energia de solvatação de moléculas e por sua vez obter a energia livre de ligação de um complexo não é trivial, visto que seria necessário computar a contribuição de energia de muitas moléculas de água e por sua vez muitos átomos. Dito isso, existem abordagens aproximadas que tratam o solvente de forma implícita e obtêm a superfície eletrostática média da solvatação das moléculas envolvidas (HONIG B.; NICHOLLS A., 1995; TSUI V.; CASE D. A., 2000). Neste trabalho utilizamos os métodos *Poisson Boltzmann* (PB) e *Generalized Born* (GB) que conseguem valores de acurácia entre 50-60% (TINGJUN H. et al., 2011). O método consiste em somar as contribuições de energia dos estados ligados e desligados do complexos e a energia entre os estados solvatados e de solvatados do complexo e das moléculas individualmente, como ilustrado na Figura 12.

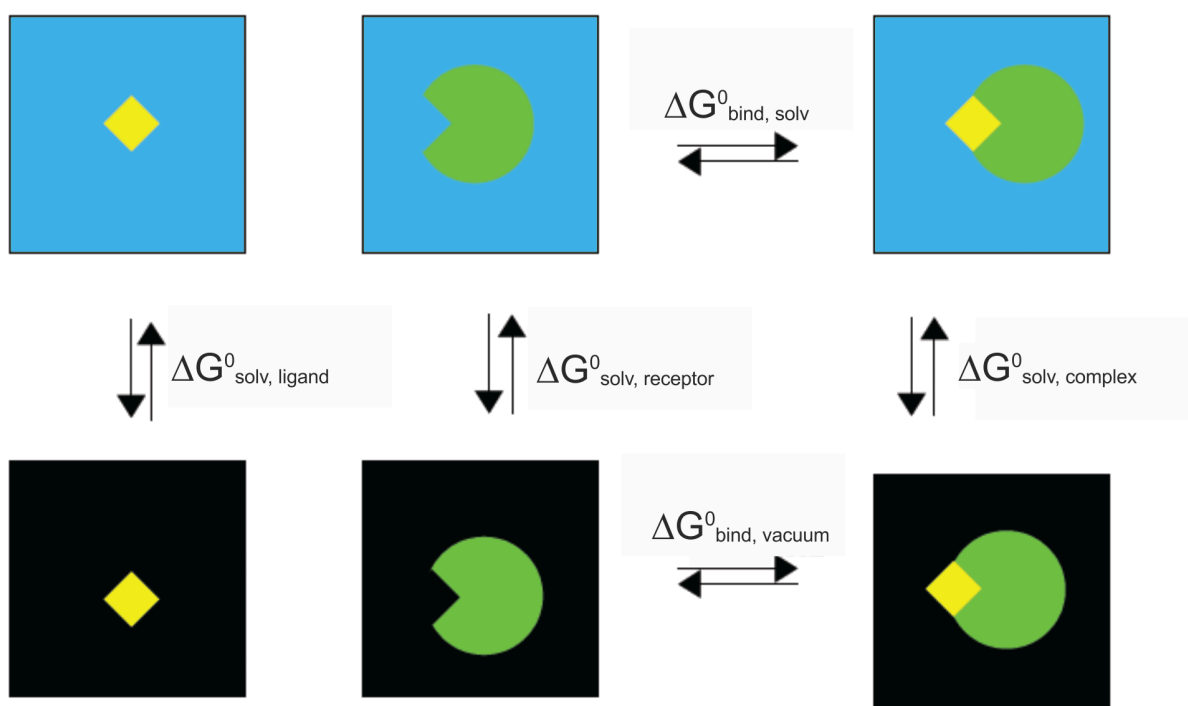


Figura 12 - Energia livre de ligação.

Obtenção da energia livre de ligação da proteína ao ligante pela somatória do custo de energia da solvatação das moléculas envolvidas no complexo (CASE D. A., 2000).

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{el}} + \Delta G_{\text{nonel}}$$

$$\Delta G_{\text{bind, solv}}^0 = \Delta G_{\text{bind, vacuum}}^0 + \Delta G_{\text{solv, complex}} - (\Delta G_{\text{solv, ligand}}^0 + \Delta G_{\text{solv, receptor}}^0)$$

Equação 5 - Método de obtenção da energia livre de ligação.

Somatória das energias livres de solvatação do complexo, ligante e receptor de forma a obter a energia livre de ligação do complexo (Case D. A., 2023).

A energia da fase gasosa demonstrada na Figura 12 é obtida pela aproximação da mecânica molecular e resolvida a partir da energia potencial obtida ao resolver as equações potenciais dos campos de força, enquanto a contribuição do solvente utiliza os métodos PB e GB mencionados acima, que computaria o custo da energia eletrostática através da mudança da constante dielétrica de $\epsilon=1$ no vácuo e $\epsilon=78$ ou 80 no solvente. A Equação 4 descreve a energia livre de solvatação como a soma das contribuições polares e apolares. O cálculo da superfície eletrostática e a interação com o solvente implícito determina os valores do termo polar, enquanto a apolar seriam as contribuições desfavoráveis de energia ao formar cavidades apolares das moléculas (HOMEYER N.; GOHLKE H., 2012).

Por fim, também se faz necessário aproximar a entropia configuracional das moléculas ao longo de uma trajetória de dinâmica molecular a fim de descontar o custo energético da formação do complexo, onde muitas vezes ocorrem restrições conformacionais das moléculas envolvidas. Contudo, estimar e aproximar a entropia das configurações de moléculas grandes não é trivial e pode encontrar barreiras potenciais que têm a possibilidade de impedir que se explore uma grande variedade de conformações (KARPLUS, M.; KUSHICK, J. N., 1981). O cálculo da entropia foi implementado pelo pacote Amber no MMPBSA (Case D. A., 2023) na qual utiliza-se da análise harmônica dos modos normais para inferir os graus de liberdade das moléculas envolvidas ao longo da trajetória e das conformações amostradas.

2. JUSTIFICATIVA

O metabolismo das purinas, como discutido anteriormente, tem fortes relações com o acúmulo sérico de ácido úrico nos hominídeos, que por sua vez tem fortes relações com doenças cardiovasculares e hipertensão. Tais comorbidades podem ser letais e são endêmicas na modernidade humana. Sabendo disso, neste trabalho propomos investigar a bioquímica estrutural de uma proteína envolvida na degradação de intermediários dessa via metabólica a fim de contribuir para elucidação do processo evolutivo por trás do metabolismo dos hominídeos. Vale ressaltar que já existem também iniciativas para utilizar enzimas da via das purinas como tratamento da gota, como, por exemplo, uricases (Li Z. *et al*, 2023; Lily T. *et al*, 2023). Dito isso, estudar a bioquímica por trás das HIUases pode nos oferecer estratégias para complementar aplicações, como o tratamento de doenças envolvendo essa via.

Além disso, este trabalho combina métodos de reconstrução de proteínas ancestrais e métodos de simulação molecular para tornar possível uma investigação evolutiva, estrutural e química de uma família de proteínas. Ao utilizar os métodos QM/MM fomos capazes de obter informações energéticas da reação enzimática, assim como propriedades cinéticas de estruturas que se relacionam em uma filogenia reconstruída das TTR e HIUase (de Oliveira et al., 2021). Dito isso, é possível, a partir das sequências de proteínas conhecidas e da filogenia, entender e procurar informações estruturais de proteínas no passado.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Comparar propriedades termodinâmicas e cinéticas de diferentes HIUases dentro de uma filogenia, utilizando métodos de simulação molecular.

3.2. Objetivos específicos

- Descobrir a etapa limitante da reação e calcular a barreira de energia para todas as estruturas estudadas (7KCN, 2H1X e 3QVA), utilizando o PES (Potential Energy Surface) e o *Umbrella Sampling*.
- Validar o método comparando a constante cinética calculada para 3QVA e a constante medida experimentalmente.
- Comparar as barreiras de energia livre e constantes cinéticas das proteínas dentro da filogenia.
- Avaliar a afinidade das estruturas com o substrato, intermediário e produto da reação para as estruturas, a fim de entender os impactos da energia de ligação na cinética enzimática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coordenadas da reação

Para a obtenção da coordenada de reação, primeiramente foi necessário posicionar o substrato na posição do sítio ativo. O modo de ligação utilizado baseou-se na proposta dada por French J. B. (French J. B.; Ealick S. E., 2011), como ilustrado na Figura 13 a seguir.

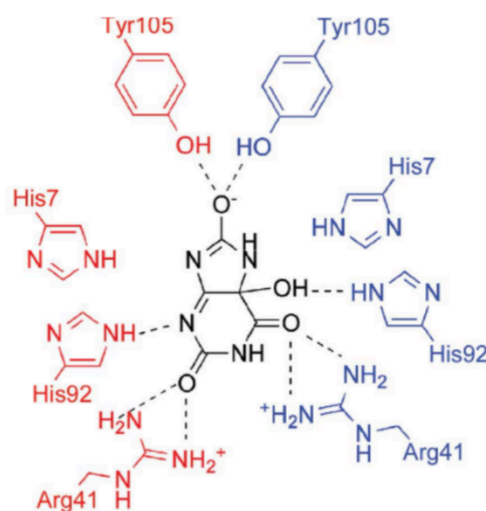


Figura 13 - Modo de ligação do 5HIU.

Pose proposta por French J.B. na HIUase de *Klebsciella pneumoniae* utilizando o software *Macro Model* para o posicionamento do ligante e o pacote *Amber* para minimização das estruturas e obtenção dos contatos. Substrato, subunidade A e subunidade B são representados respectivamente pelas cores preto, vermelho e azul.

A partir das coordenadas obtidas das estruturas cristalográficas com o ligante posicionado, foi realizada uma varredura da energia potencial ao longo da reação através de um *Relaxed Potential Energy Surface Scan* (PES), utilizando a interface gráfica *EasyHybrid3* (<https://github.com/ferbachega/EasyHybrid3>), que consiste em calcular e minimizar a energia potencial em um determinado espaço, seja unidimensional ou bidimensional. O software foi desenvolvido para implementar as ferramentas do *pDynamo* através de uma interface gráfica (Bachega J. F. R., 2013). Os inputs utilizados como entrada foram parametrizados através do pacote *AmberTools* (Case D. A., 2023) e o ligante desenhado no *Avogadro* (Marcus D. H., 2012). As topologias foram geradas utilizando os campos de força *amberff99SB* e *gaff2* (Ponder J.W., Case D. A., 2003). Utilizando o *tleap*, o sistema foi solvatado e neutralizado, e

por fim uma etapa de equilibração do solvente de 500 ps foi realizada para manter as águas em posições adequadas para a varredura da coordenada de reação. Foi modelada, então, a primeira etapa da reação proposta por French J. B, como apresentado na Figura 5.

A varredura do PES da coordenada de reação foi calculada em duas dimensões com uma resolução de 20x20, a transferência do hidrogênio da água para a histidina e o ataque nucleofílico da hidroxila ao ligante, obtendo um perfil potencial em 2D. A partir da matriz de energia potencial obtida, algumas janelas foram selecionadas para representar a barreira potencial da reação, de forma que fossem percorridas as janelas com menor energia dos reagentes até a formação do intermediário da reação. Os tamanhos dos passos do PES foram programados de forma que em cada janela os átomos deslocassem a distância necessária para formar a ligação química final em uma coordenada simples, com exceção da transferência do hidrogênio em que foi utilizado um tamanho de passo com 0,1 angstroms, que utilizou uma coordenada múltipla (ou seja, uma combinação de distâncias do tipo $d_1 - d_2$). Em cada uma das células da matriz foram realizadas otimizações de geometria com o hamiltoniano híbrido utilizando o método de cálculo de estrutura eletrônica semi-empírico AM1dphot (Krishna G., 2014) e PM6 (Steward J. J. P., 2007; Thiel W., 2014), formando a malha de energia potencial da coordenada de reação em 2D. Vale ressaltar que, em cada otimização, os átomos envolvidos na reação foram restringidos utilizando uma constante de força de 4000 kJ/mol. A superfície potencial amostrada foi refinada, aumentando o número de átomos quânticos para aproximadamente 300 átomos e também aplicando DFT com o funcional B3LYP e as funções de base 6-31G utilizando o software Orca (Frank N. *et al*, 2020).

Uma vez obtida a coordenada de reação, observamos variação da energia potencial do sistema. Para obter os perfis de energia livre da reação, é necessário aplicar metodologias de termodinâmica estatística para se explorar o espaço conformacional do sistema. Sabendo disso, realizamos um *Umbrella Sampling*, metodologia que utiliza dinâmica molecular para se obter a função de partição dos estados de um sistema. Para isso, utilizamos cada uma das janelas representantes da coordenada de reação e realizamos uma *Langevin Dynamics* em NPT 50 ps cada, utilizando uma constante de força de 1500 KJ para permitir uma melhor amostragem. O cálculo irá criar o *Potential of Mean Force* (PMF) da coordenada de reação, que é o perfil de Energia Livre da reação (Field M.J., 1999). E, para diminuir o erro e obter uma maior precisão estatística da densidade de probabilidade dos estados, foi usado o algoritmo *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM) (Kumar S. *et al.*, 1992). Posteriormente, utilizamos a barreira de energia livre da reação para recuperar informações cinéticas através da lei de Arrhenius e a equação de Eyring (Field M.J., 1999).

Todos os cálculos foram realizados para as estruturas cristalográficas do ancestral e *Danio rerio*. Contudo, para avaliar o erro estimado, submetemos a estrutura de *Klebsciella pneumoniae* à metodologia para comparar os resultados calculados aos valores cinéticos obtidos experimentalmente por French J. B.

4.2. Dinâmica Molecular e MMPBSA

As coordenadas de reação podem nos dar informações sobre as diferenças catalíticas entre as estruturas analisadas e, como mencionado anteriormente, obter informações cinéticas que podem inferir sua eficiência catalítica. Porém, essa metodologia parte da condição de que o substrato está na posição perfeita para se iniciar a catálise. Sabendo disso, propomos uma análise utilizando dinâmica molecular para avaliar as diferenças de afinidade de ligação entre as estruturas cristalográficas da ancestral e *Danio rerio*.

Utilizamos novamente o campo de força amberff99SB para a proteína e gaff2 para o ligante. Para cada uma das estruturas foram montados 3 sistemas que partiam do mesmo modo de ligação da proteína com o substrato, o intermediário e o produto da reação. Para cada sistema foi feito *Langevin Dynamics* no NAMD3 (Phillips J.C. *et al*, 2020) em etapas de 20 ps de equilíbrio do solvente, seguido de 500 ps de equilíbrio do sistema em NPT e por fim uma produção de 10 ns em NPT.

As trajetórias foram submetidas a um cálculo do programa MMPBSA.py do pacote AmberTools. O algoritmo é capaz de utilizar os métodos *Generalized Born* e *Poisson Boltzmann* para o cálculo das contribuições eletrostáticas e a aproximação *Quasi-harmônica* para recuperar o custo entrópico de ligação através dos modos normais.

Para além disso, também foram feitas triplicatas de 100 ns para todos os sistemas acima e calculado os RMSDs dos ligantes desconsiderando o movimento relativo ao sistema. As triplicatas por sua vez não foram submetidas ao cálculo de mmpbsa, mas apenas à análise estrutural dos ligantes no sítio ativo das proteínas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Coordenadas de reação

As estruturas das coordenadas de reações obtidas se comportaram de maneira bastante parecida e foram feitas amostragens da coordenada de reação em duas dimensões (ataque nucleofílico da hidroxila e transferência do próton) e energias computadas em dois métodos diferentes. Contudo, vale ressaltar que o problema de tunelamento quântico é bastante comum em mecanismos de ação enzimáticos em transferências de prótons (Michael J.S., Nigel S.S., 2000). Sendo assim, seria importante futuramente inferir o erro oriundo desse efeito através da correção de Wigner (Field M.J., 1999). A Tabela 2, mostra os sistemas e as diferentes condições que a primeira etapa da reação foi modelada e nas Figuras 14 e 15 é possível observar as janelas representativas na matriz, assim como as estruturas iniciais e finais da reação utilizando o método PM6 e AM1dphot respectivamente.

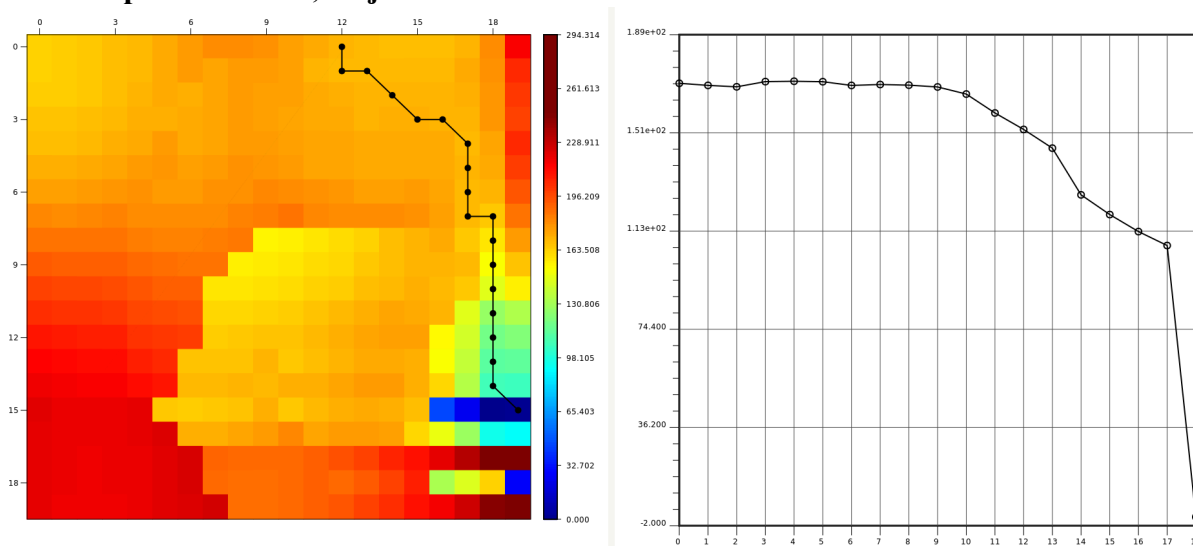
Sistemas	Tamanhos da região quântica		Métodos usados			<i>Umbrella sampling</i>	
	77 átomos	≈300 átomos	AM1dphot	PM6	DFT	PM6	AM1dphot
2h1x	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
7kcn	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3qva	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabela 2 - Sistemas e condições simuladas para a primeira etapa do mecanismo de reação proposto.

Dos sistemas modelados apenas o DFT demonstrou problemas, a 2H1X não foi capaz de calcular as energias por problemas técnicos enquanto a 7KCN apenas coordenadas unidimensionais foram refinadas. Vale ressaltar também que a amostragem das geometrias foram feitas apenas utilizando os métodos AM1dphot e PM6 com 77 átomos quânticos..

1 - 2h1x PM6

Barreira potencial de 6,5 KJ/mol



2 - 7kcn PM6

Barreira potencial de 6,5 KJ/mol

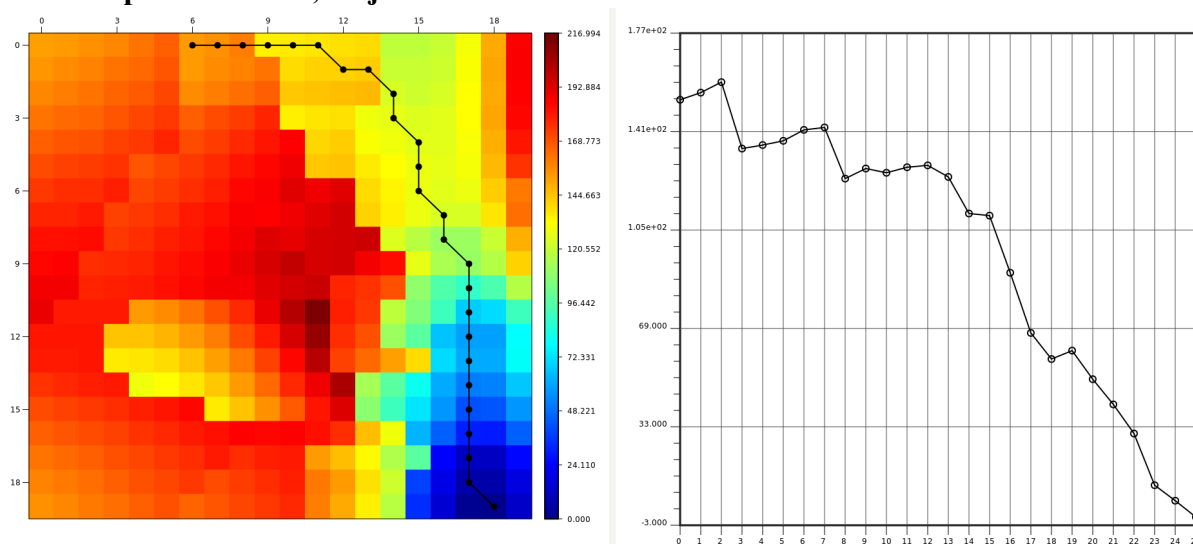
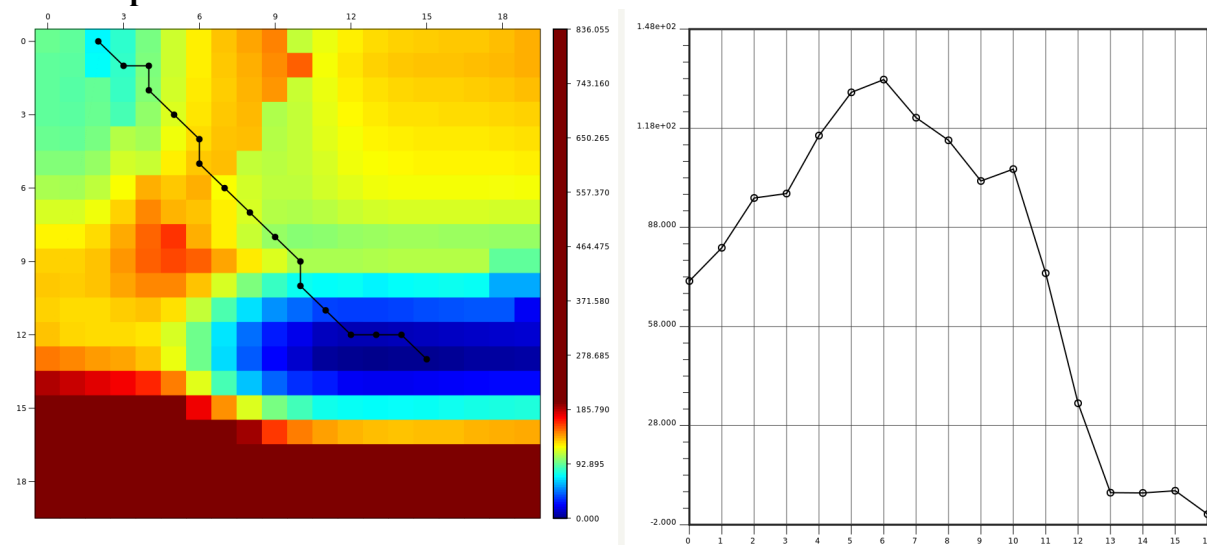


Figura 14 - Coordenadas PM6.

Matriz potencial PM6 da coordenada de reação da estrutura de *Danio rerio* (1) e Ancestral (2) de 6,5 joules/mol ambas .

1 - 2h1x AM1dphot
Barreira potencial de 63 KJ/mol



2 - 7kcn AM1dphot
barreira potencial de 65 KJ/mol

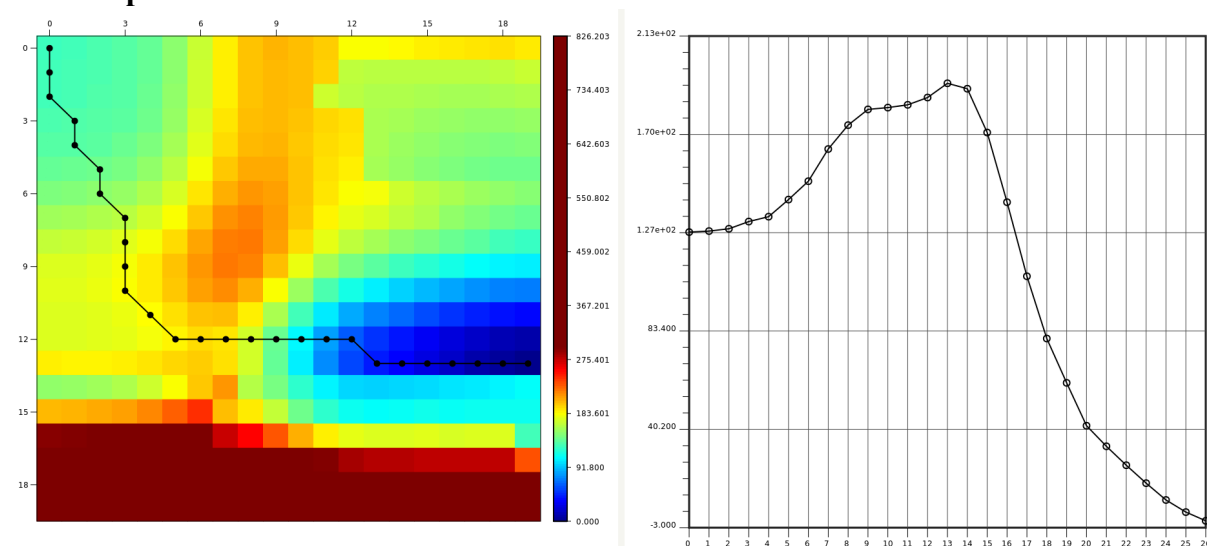


Figura 15 - Coordenadas AM1dphot.

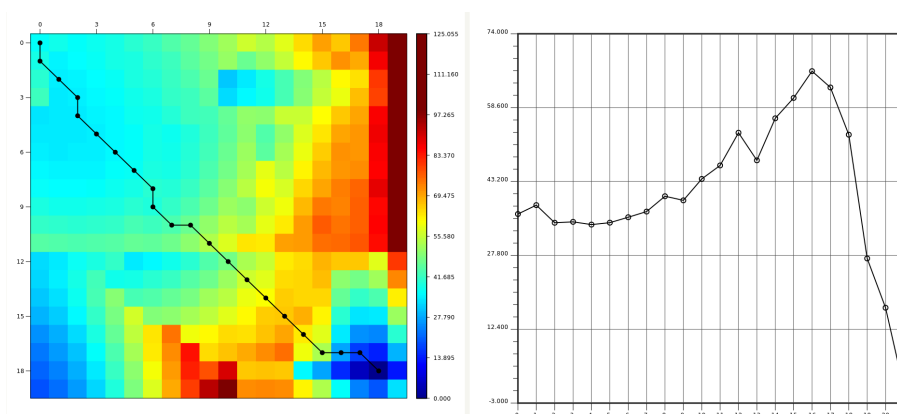
Matriz potencial AM1dphot da coordenada de reação da estrutura de *Danio rerio* (1) e Ancestral (2) de 63 e 65 joules/mol .

Os diferentes métodos mostraram energias e coordenadas completamente diferentes, assim como o perfil da energia potencial na matriz como um todo. Entretanto, o método AM1dphot mostrou um perfil mais bem delimitado e comportado do ponto de vista qualitativo, enquanto o PM6 computou barreiras de coordenadas otimizadas com valores de energia baixos para as estruturas 2h1x e 7kcn. Contudo, o caminho de reação se mostrou pouco intuitivo e irregular com regiões de energia espalhadas de forma não esperada. As

menores barreiras obtidas foram de 6,5 joules utilizando o método PM6, entretanto, a otimização do caminho de reação não foi bem delimitado pela matriz. Dito isso, escolhemos exportar a coordenada diagonal das matrizes calculadas com esse método para submeter ao *umbrella sampling*, enquanto nas matrizes do método AM1dphot foi possível desenhar uma coordenada ótima a partir da matriz 2d. Por fim, as energias PM6 da estrutura de *Klebsciella pneumoniae* mostraram ter a maior barreira de energia potencial entre as estruturas, enquanto o AM1dphot foi a menor, como observado na Figura 16. Além disso, diferentemente das outras estruturas, a matriz PM6 se mostrou bem delimitada nas regiões de reagentes e produtos, com exceção de um vale no canto inferior esquerdo que se refere a um ataque nucleofílico da hidroxila a um carbono indesejado do substrato.

Klebsciella pneumoniae

1 - PM6 Barreira de 30 KJ/mol



2 - AM1dphot Barreira 40 KJ/mol

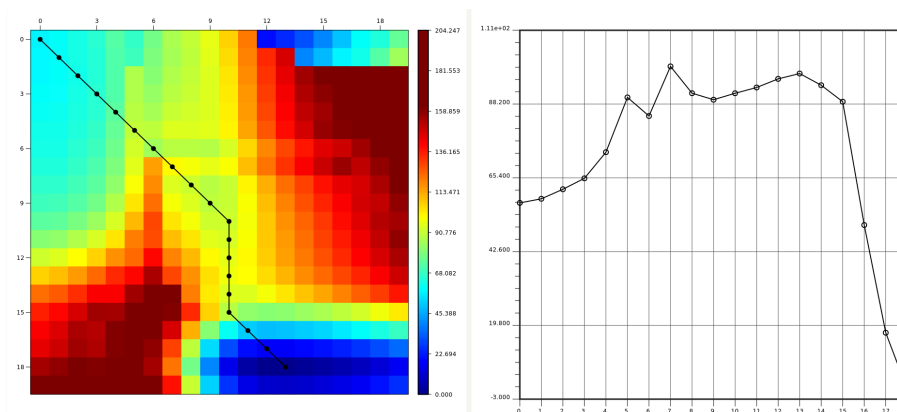


Figura 16 - Coordenadas da *Klebsciella pneumoniae*.

Matriz potencial PM6 e AM1dphot da coordenada de reação da estrutura de *Klebsciella pneumoniae*, com barreira de 30 KJ/mol (1) e 40 KJ/mol (2) .

Além de comparar os métodos, uma outra estratégia adotada para verificar o comportamento das energias potenciais foi aumentar a região quântica. Observando o bom comportamento da matriz no método AM1dphot, aumentamos a sua região quântica de 77 átomos para mais de 300 nas 3 estruturas analisadas. A estrutura de *Klebsiella pneumoniae* demonstrou um comportamento peculiar, os vales iniciais e finais da coordenada se inverteram e a barreira de energia mais que dobrou, como evidencia a Figura 17. O mesmo comportamento estranho se repetiu ao refinar a energia utilizando DFT, como mostrado na Figura 19, na qual o perfil potencial não encontrou um vale final do produto, que no caso seria o intermediário da reação. Enquanto nas outras estruturas, representadas na Figura 18, ao aumentar a região quântica observamos uma matriz mais bem comportada com um caminho de reação mais claro, e, por sua vez, as barreiras de energia diminuíram.

Klebsiella pneumoniae

364 átomos quânticos
Barreira 83 KJ/mol

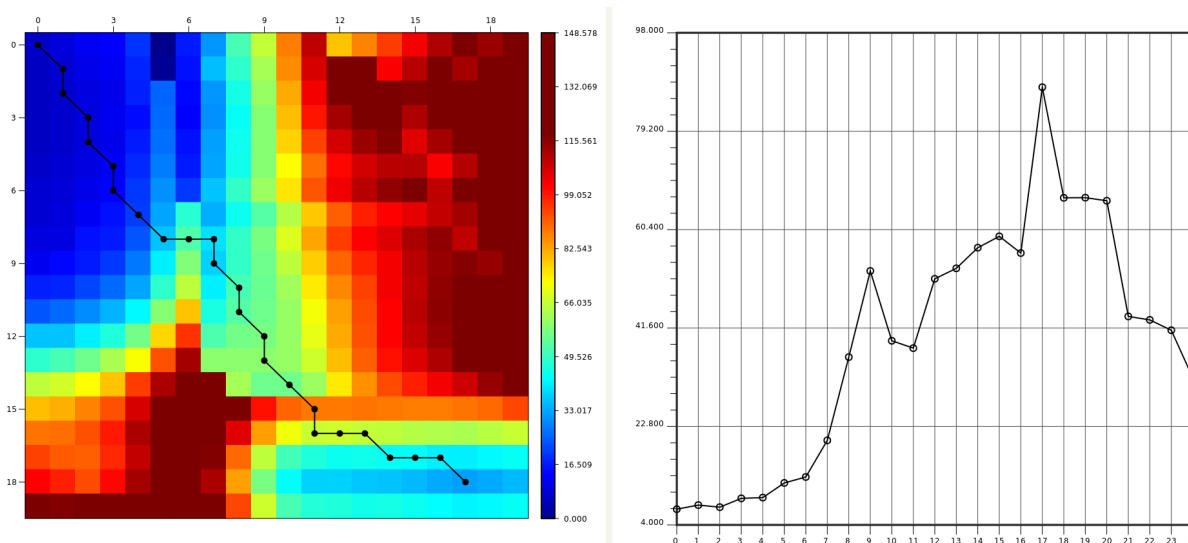
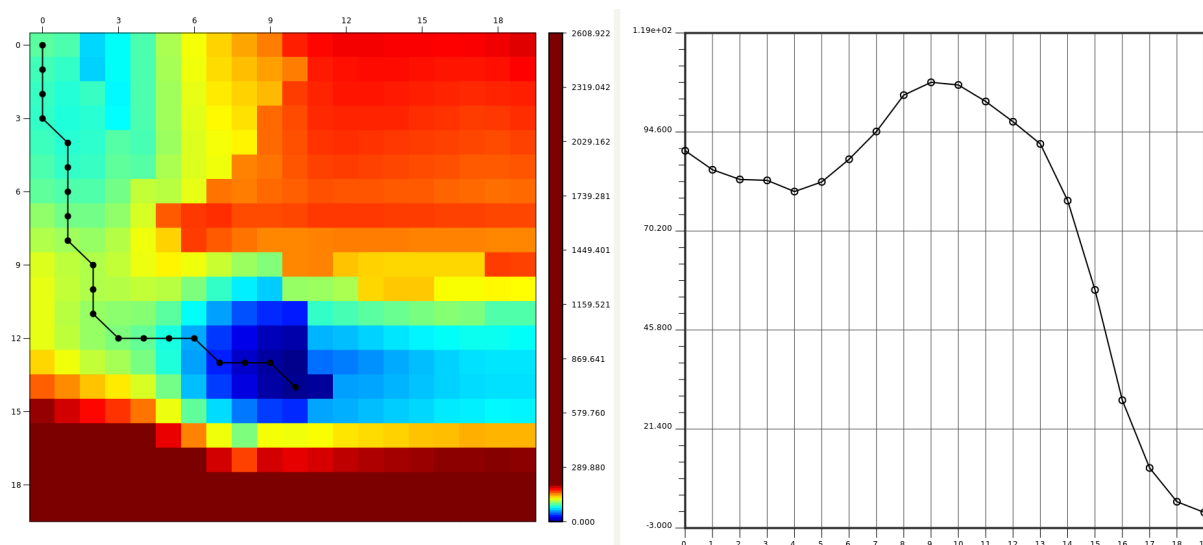


Figura 17 - Coordenadas AM1dphot expandida da *Klebsiella pneumoniae*.

Matriz potencial AM1dphot da coordenada de reação da estrutura de *Klebsiella pneumoniae* com região quântica expandida, barreiras de 40 KJ/mol (1) e 83 KJ/mol (2) .

**1 - 2h1x 359 átomos quânticos
Barreira de 44 KJ/mol**



**2 - 7kcn 334 átomos quânticos
Barreira de 50 KJ/mol**

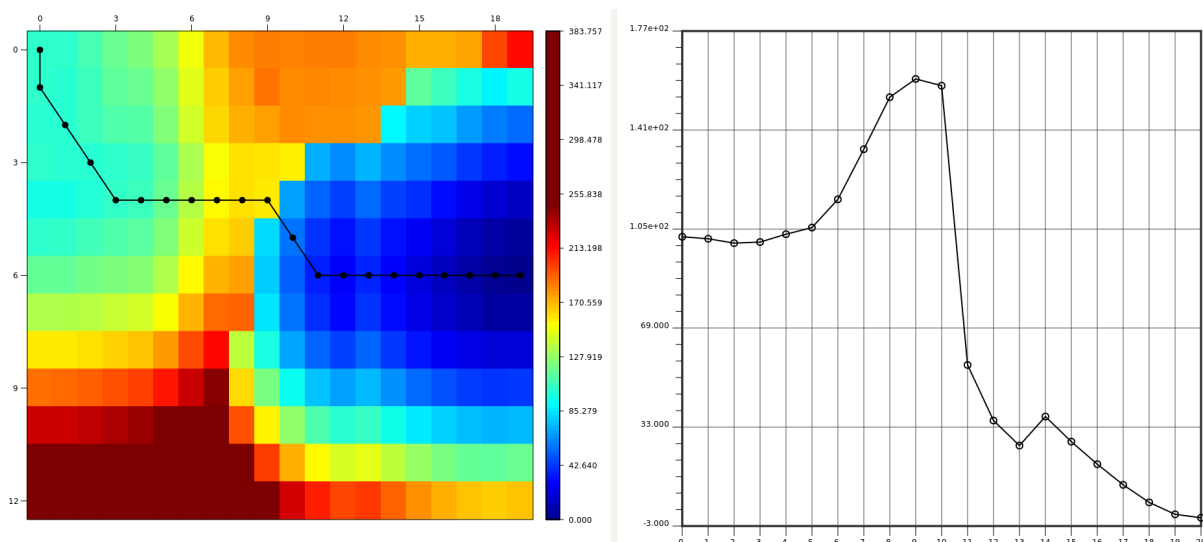


Figura 18 - Coordenadas AM1dphot expandidas das estruturas de *D. rerio* e ancestral.

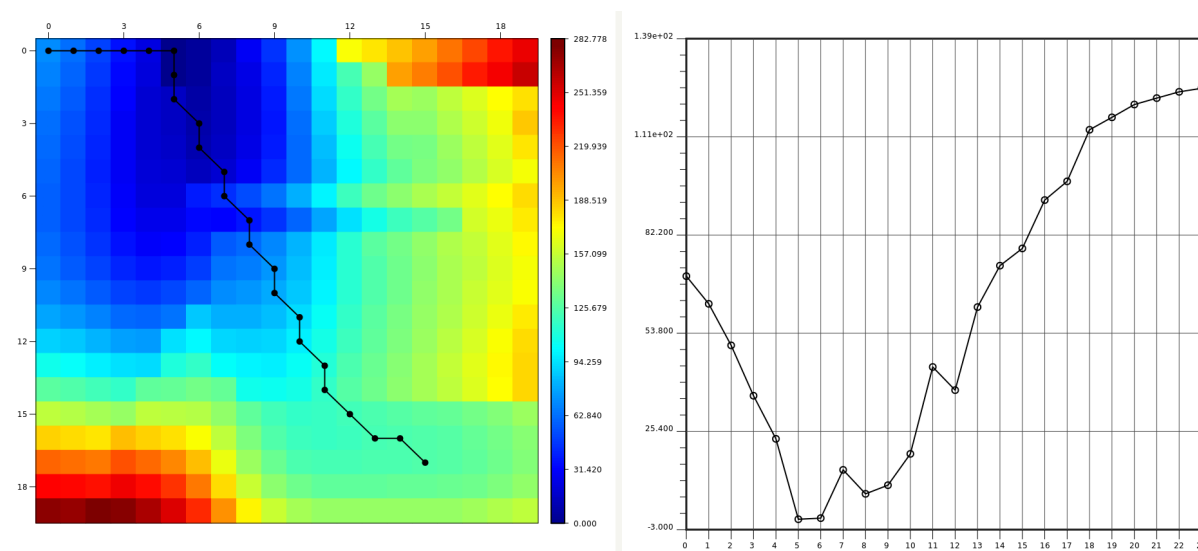
Matriz potencial AM1dphot da coordenada de reação das estruturas 2h1x e 7kcn com região quântica expandida, com barreira de 44 KJ/mol (1) e 58 KJ/mol (2).

Para além disso, refinamos as coordenadas de reação utilizando outros métodos, como DFT (*Density Functional Theory*), utilizando o funcional B3LYP e funções de base 6-31G em cima das coordenadas do método AM1dphot com 77 átomos. Porém, os resultados não foram satisfatórios. As matrizes das estruturas 2h1x e 7kcn falharam em computar os valores de energia por problemas técnicos. A estrutura 3qva, por sua vez, mostrou valores de energia desfavoráveis à reação da etapa 1. Dito isso, a coordenada 1d exportada da estrutura 7kcn para

utilizar na amostragem do *umbrella sampling* também foi submetida ao refino de energia e o perfil potencial obtido foi mostrado na Figura 19, na qual observamos um aumento da barreira potencial, que originalmente era de 65 KJ/mol para 89 KJ/mol.

DFT 77 átomos quânticos 3qva

Barreira inexistente



DFT 77 átomos quânticos 7kcn

89 KJ/mol de Barreira

Coordenada de reação

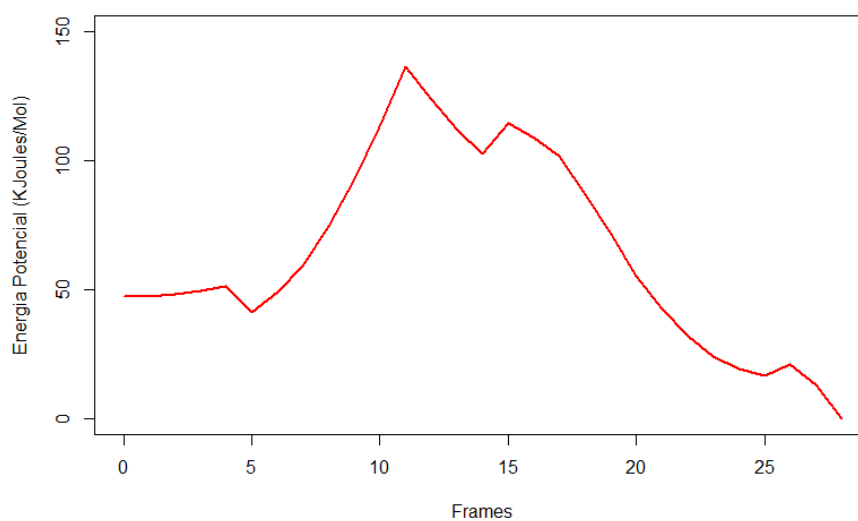


Figura 19 - Coordenadas refinadas usando DFT.

Barreiras potenciais refinadas das estruturas 3qva e 7kcn com 77 átomos quânticos.

Dito isso, é possível que trabalhar com esta reação utilizando uma região quântica de 77 átomos pode ser prejudicial para a amostragem de geometrias, visto que, no caso da estrutura 3qva, a forma do perfil de energia potencial mudou completamente ao aumentar a região quântica. Entretanto, aumentar a região quântica pode ampliar exponencialmente o custo computacional de cálculos, como o refino de energia utilizando DFT e também do *umbrella sampling*.

5.2. Umbrella Sampling

O umbrella sampling e a construção do PMF permite relaxar os sistemas e mostrar de forma mais precisa a energia livre dessas coordenadas. Entretanto, ainda não se sabe qual etapa seria a limitante, sendo assim, a barreira calculada pode não coincidir com a experimental, ou seja, ainda é necessário estudar e modelar a segunda etapa da reação, que não é trivial devido à quantidade de transferência de prótons envolvida. O PMF gerado foi plotado em sobreposição entre as estruturas calculadas, de forma a comparar os valores dos picos como mostra a Figura 20. Das coordenadas de reação mostradas na seção anterior, foram exportadas em uma dimensão as reações de todas as estruturas, utilizando os métodos PM6 e AM1dphot como mostrado nas Figuras 20 e 21 respectivamente.

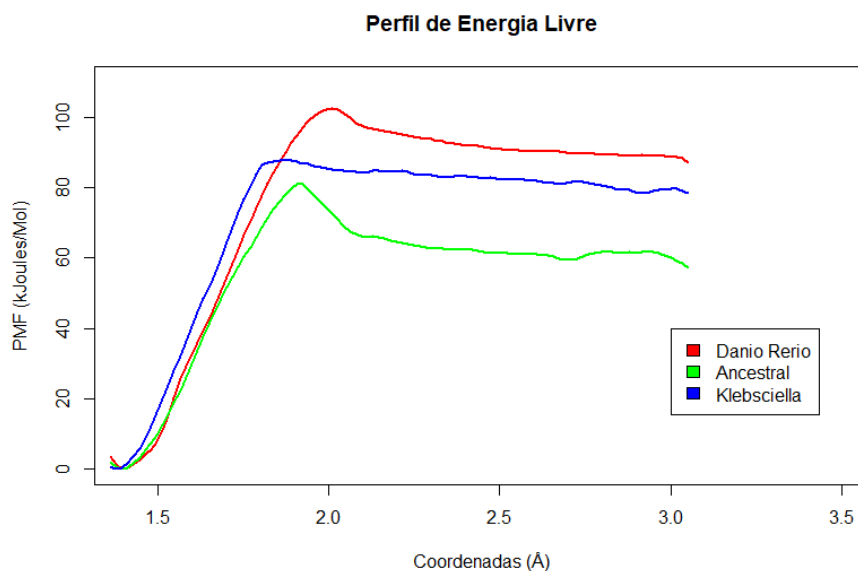


Figura 20 - PMF utilizando PM6.

Perfil de energia livre da primeira etapa da reação calculada nas estruturas de *Danio rerio*, *Klebsiella pneumoniae* e a ancestral usando o método PM6.

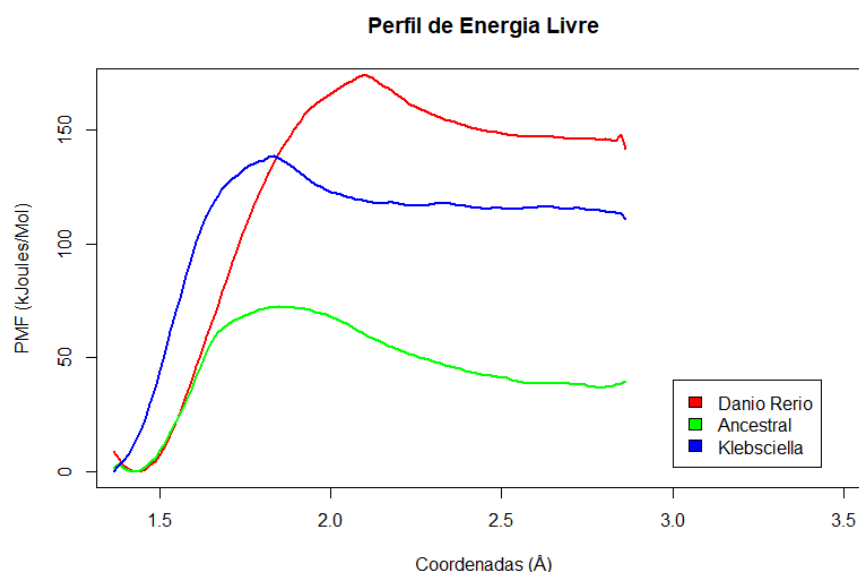


Figura 21 - PMF utilizando AM1dphot.

Perfil de energia livre da primeira etapa da reação calculada nas estruturas de *Danio rerio*, *Klebsiella pneumoniae* e a ancestral usando o método AM1dPhot.

A energia de ativação do método PM6 obtida das estruturas de *Danio rerio*, *Klebsiella pneumoniae* e ancestral foram de 16 KJ/mol, 9 KJ/mol e 23 KJ/mol respectivamente, enquanto no método AM1dphot foi de 32 KJ/mol, 28 KJ/mol e 33 KJ/mol. Ou seja, a proteína ancestral inferida demonstrou ter a maior barreira nos dois diferentes métodos, porém no caso do AM1dphot um valor bem próximo da estrutura moderna de *Danio rerio*. Além disso, apesar da estrutura 3qva ter a maior barreira de energia potencial do método PM6, a mesma teve a menor barreira de energia livre entre as outras no mesmo método, enquanto a ancestral e *D. rerio* tiveram suas barreiras aumentadas em relação à energia potencial. O método AM1dphot, entretanto, foi consistente, no qual as proteínas diminuíram aproximadamente para metade da energia potencial na barreira de energia livre. Isso indica que, em geral, o método PM6 demonstrou inconsistência nos valores de energia potencial entre as proteínas analisadas.

A partir das barreiras de energia livre obtidas podemos inferir a constante cinética de catálise k_{cat} utilizando a equação de Eyring. Vale ressaltar também a natureza logarítmica da lei de Arrhenius, ou seja, pequenas variações na barreira de energia livre em KJ/mol levam a grandes impactos cinéticos. Os experimentos de French J. B indicados na Tabela 1 mostraram que o valor do k_{cat} da proteína nativa de *Klebsiella pneumoniae* (3qva) foi de 172 s^{-1} . Substituindo na equação de Eyring obtemos um valor por volta de 60,5 KJ/mol. Contudo, o

valor calculado para a estrutura 3qva foi de 9 KJ/mol e 28 KJ/mol, ou seja, abaixo do esperado do ponto de vista cinético. Contudo, a subestimação encontrada pode não significar somente erro do método, e sim devido à segunda etapa ser limitante da reação. Sendo assim, não seria possível inferir o erro esperado utilizando apenas a primeira etapa da reação.

Entretanto, algumas limitações devem ser ressaltadas em relação ao cálculo dos PMFs. As constantes de força de ambas as reações foram aplicadas apenas nos átomos pesados, enquanto a transferência dos hidrogênios não foi restringida. Dito isso, a transferência de prótons em si pode ser problemática, visto que há a possibilidade de um tunelamento quântico dessas partículas, informação que por sua vez é perdida ao utilizar a aproximação de Born-Openheimer. Vale ressaltar também que apenas os resíduos participantes da reação foram incluídos na região quântica, ou seja, faz-se necessário expandir a região quântica até que tenha convergência nos valores de energia. Contudo, a estrutura ancestral teve valores bem próximos das estrutura modernas, tanto no *umbrella sampling* quanto nos perfis potenciais, evidenciando que a estrutura 7kcn inferida pode ser uma HIUase com atividade catalítica próxima das modernas.

5.3. MMPBSA

Os cálculos de contribuições entálpicas (Interações Eletrostáticas, dipolo permanente e dipolo induzido) mostraram uma certa consistência entre os métodos de PB e GB. Foi possível observar uma maior afinidade eletrostática das estruturas pela espécie intermediária, como evidencia a Tabela 3 e a Tabela 4, mostrando a importância da transferência da hidroxila para a estabilização e início da reação catalítica, levando à quebra do anel. Espera-se, então, que a barreira energética da primeira etapa de reação seja menor, visto que os resultados do MMPBSA na Figura 22 mostraram que a primeira etapa estabiliza o substrato no sítio ativo, preparando-o para uma segunda etapa e que as barreiras obtidas com o método QM/MM também foram bastante baixas. Sabendo disso, podemos inferir que o aumento da barreira energética da primeira etapa poderia impactar pouco na cinética enzimática por não ser a etapa limitante do processo, porém a estabilidade do intermediário não é negligenciável e pode ser uma etapa importante para avaliar as diferenças energéticas da reação entre as estruturas. Uma evidência disso é o ensaio enzimático feito por French J. B., mostrado na Tabela 1, no qual a mutação do resíduo responsável pela captura do próton de uma molécula de água leva a uma diminuição drástica na eficiência catalítica, e mesmo não realizando interações diretas com o substrato conseguiu aumentar o K_m mais vezes que resíduos que fazem interações diretas, considerando o modo de ligação proposto.

	2h1x (kcal/mol)				
	Entropia	Entalpia(GB)	Entalpia(PB)	$\Delta G(GB)$	$\Delta G(PB)$
Substrato	-29,81	-10,9261 +/- 3,148	8,6454 +/- 5,0192	18,8871	38,4586
Intermediário	-32,787	-22,5172 +/- 3,7110	-16,4272 +/- 5,7578	10,2698	16,3597
Produto	-37,7035	-1,6769 +/- 5,2602	2,1070 +/- 7,6792	36,0265	39,8105

Tabela 3 - MMPBSA *D. rerio*.

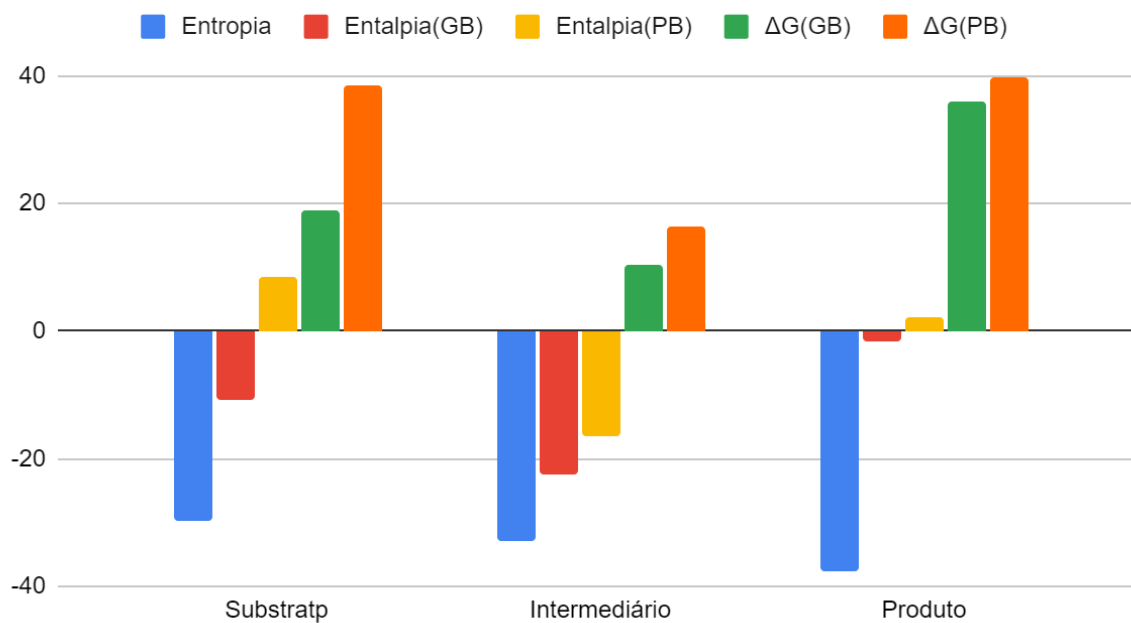
Resultados do mmpbsa da estrutura de *Danio rerio*.

	7kcn (kcal/mol)				
	Entropia	Entalpia(GB)	Entalpia(PB)	$\Delta G(GB)$	$\Delta G(PB)$
Substrato	-29,31	-16,2255 +/- 0,1866	2,2051 +/- 0,2138	13,0844	31,5151
Intermediário	-32,1805	-27,6594 +/- 0,2811	-27,5686 +/- 0,3746	4,5211	4,6119
Produto	-35,6489	-0,7099 +/- 0,1701	4,1466 +/- 0,2746	34,9387	39,7952

Tabela 4 - MMPBSA ancestral.

Resultados do mmpbsa da estrutura ancestral.

MMPBSA Danio Rerio



MMPBSA Ancestral

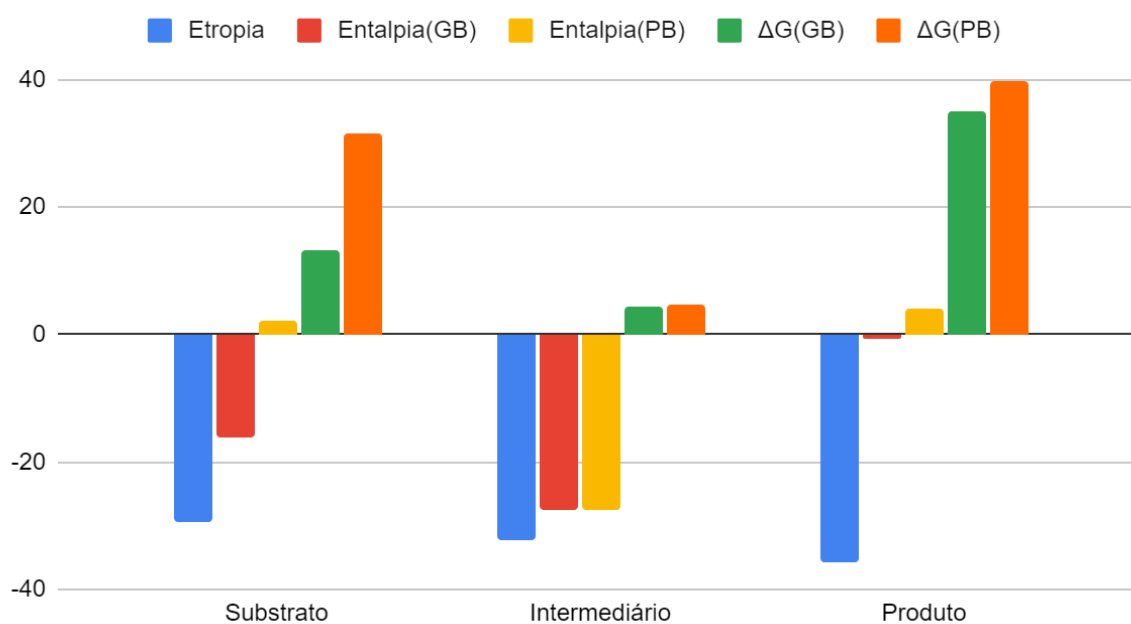


Figura 22 - Visualização gráfica do MMPBSA.

Gráfico em barras dos resultados do mmpbsa de ambas as estruturas mostrando os pesos das contribuições entrópicas e entálpicas.

Foi observada uma divergência na afinidade das estruturas pelo intermediário, diferentemente das barreiras de energia livre da primeira etapa da reação, na qual a ancestral (7kcn) demonstrou valores de entalpia menores. Nesse caso, podemos notar uma maior afinidade desta estrutura pelo estado de transição em relação à proteína do *D. rerio* (2h1x). Contudo, essas pequenas variações de valores de energia precisam ser melhor investigadas e devemos experimentar a mesma metodologia com outras estruturas inferidas no intervalo evolutivo entre a moderna e a ancestral avaliada. Deve-se também validar experimentalmente as propriedades cinéticas da ancestral. Assim, poderíamos observar a tendência geral e procurar melhores evidências quantitativas em relação às diferenças observadas.

Por fim, os resultados de entropia foram desfavoráveis para a formação do complexo. Porém, vale ressaltar que as contribuições acessadas pelos modos normais não refletem diretamente o ambiente biológico. Espera-se que, em contexto celular, as vias metabólicas aconteçam de forma mais integrada e organizada, visto que o ácido úrico é um substrato que decai espontaneamente. A existência dessa via é justificada pela necessidade de padronizar o estereoisômero produzido na degradação do ácido úrico, o que se torna evidente ao reparar que tanto HIUases quanto uricases são homotetrâmeros com sítios simétricos. Contudo, as contribuições entrópicas demonstraram consistência em ambas estruturas, e podemos observar um pequeno aumento no decorrer da reação, visto que a reação leva à quebra de um anel, causando uma maior liberdade conformacional do nosso ligante.

5.4. Dinâmica molecular e RMSD

As triplicatas realizadas de 100 ns foram utilizadas para amostrar as conformações dos ligantes substrato, intermediário e produto para ambas as estruturas analisadas. Para isso, calculamos o RMSD ao longo da dinâmica e observamos a variação da posição dessas moléculas. No mmpbsa observamos que o intermediário foi o ligante mais estável no sítio ativo, contudo, o RMSD dos complexos da estrutura do *Danio rerio* mostrou que o ligante intermediário possuía mais graus de liberdade dentro do sítio catalítico ao comparar com o substrato, diferente da estrutura ancestral que, pelo contrário, mostrou um RMSD do intermediário bem mais rígido, tanto na visão geral dos complexos mostrados na Figura 23, quanto nas triplicatas dos complexos de intermediários na Figura 24.

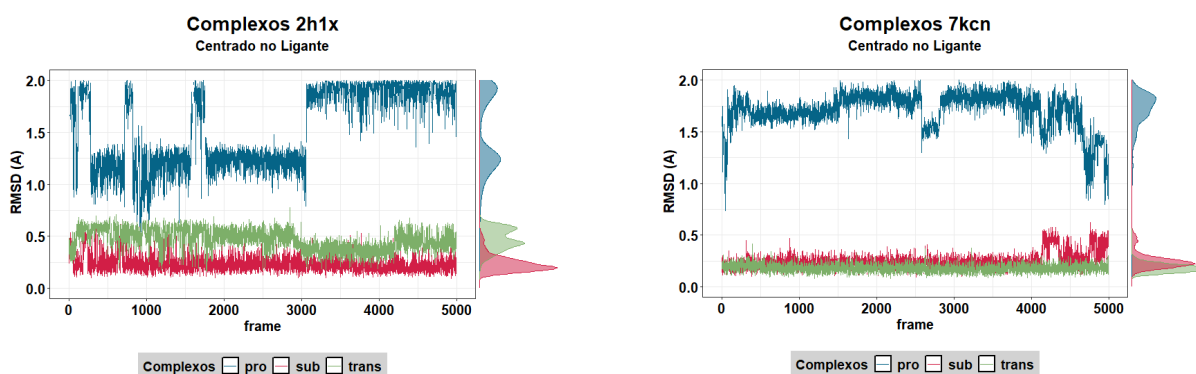


Figura 23 - RMSD de todos os complexos centrado no ligante.

Visão geral do RMSD dos 3 complexos para cada uma das estruturas analisadas e a distribuição das frequências do eixo X ao longo dos frames plotados nas gaussianas laterais.

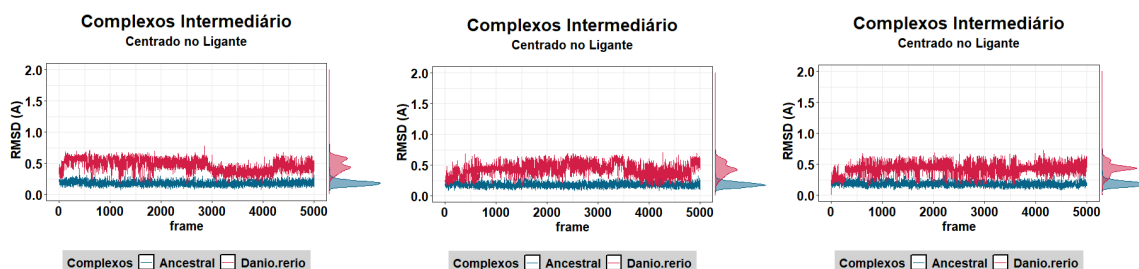


Figura 24 - RMSD centrado no ligante das triplicatas do intermediário.

RMSD das triplicatas de intermediários das estruturas analisadas sobrepostas e a distribuição das frequências do eixo X ao longo dos frames plotados nas gaussianas laterais.

Observando a trajetória do complexo intermediário do *D. rerio*, vemos uma flexibilidade dos torcionais nos anéis e hidroxilas do ligante intermediário, como mostrado na Figura 25. As mudanças torcionais e rotacionais por sua vez se dão devido a interações no sítio ativo, ou seja, inferem uma grande mobilidade do ligante dentro do sítio catalítico, o que pode promover uma dificuldade cinética para o ligante se posicionar no local ideal para a catálise da segunda etapa. A Figura 26 mostra como o RMSD centrado ao movimento da proteína da estrutura do vertebrado moderno foi maior que a estrutura da proteína ancestral. Dito isso, a proteína ancestral poderia ter uma cinética favorecida na segunda etapa.

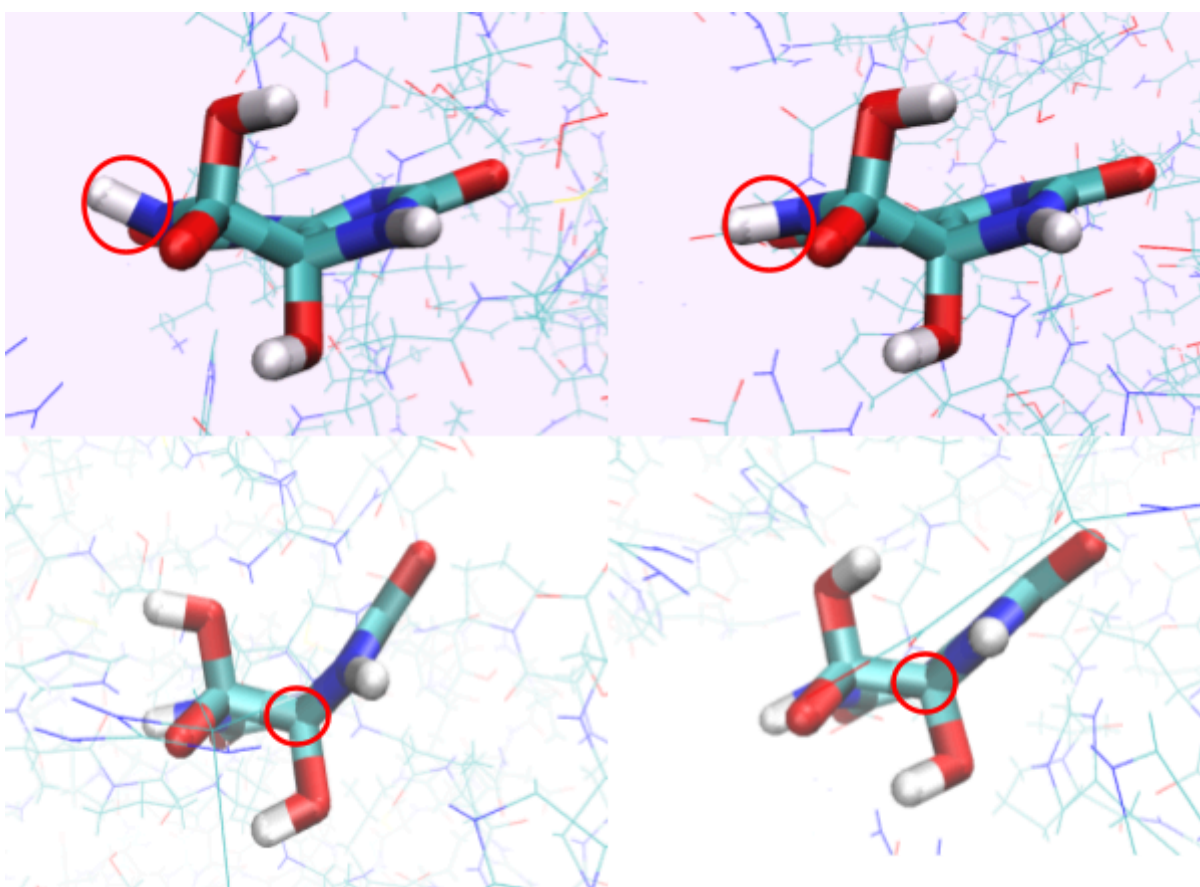


Figura 25 - Conformações do intermediário no sítio ativo do *D. rerio*.

Variações rotacionais (figuras superiores) e angulares (figuras inferiores) do ligante intermediário na proteína do *Danio rerio*, na qual o ângulo marcado em vermelho flutua de 34° a 39°. Figuras geradas pelo VMD (Humphrey W., 1996).

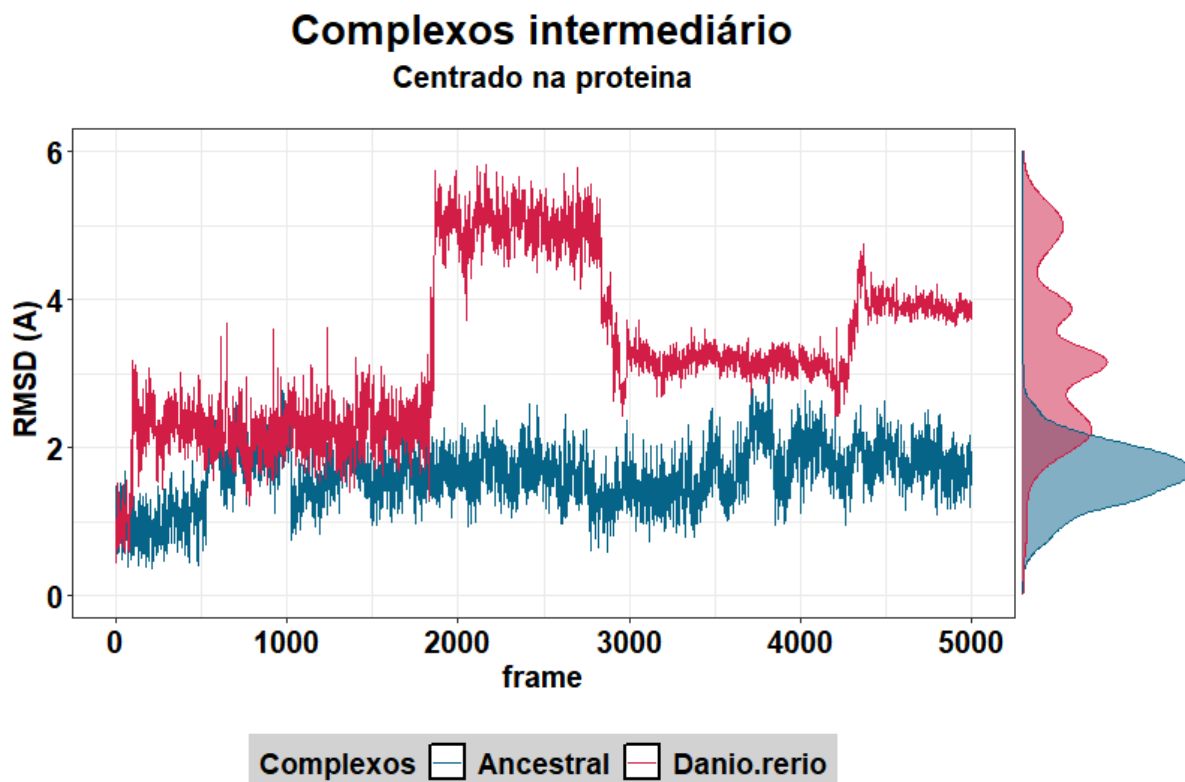


Figura 26 - RMSD centrado na proteína do complexo intermediário.

RMSD centrado na proteína a fim de entender a dinâmica do ligante intermediário no sítio das estruturas de *Danio rerio* (vermelho) e ancestral (azul).

Portanto, apesar de maiores barreiras de energia livre, a ancestral demonstrou melhor afinidade ao intermediário e maior estabilidade estrutural no seu sítio catalítico, o que poderia promover uma menor barreira de energia livre na segunda etapa devido à estabilidade potencial do intermediário no ligante. Até então, tudo indica que a segunda etapa seria a limitante da reação, sendo assim, ainda não podemos dizer qual estrutura é mais favorecida a converter reagentes em produto.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Apesar da literatura mostrar que provavelmente houve uma perda gradual da função das Uricases (Kratzer J. T. et al, 2014), enzima presente na etapa anterior à etapa catalisada pela HIUase. Neste trabalho não fomos capazes de entender plenamente se há relação entre a perda da atividade da Uricase e a atividade enzimática das HIUases modernas. Para isso, seria necessário avaliar mais estruturas dentro da filogenia construída e relacionar com os ramos derivados das estruturas das Uricases que diminuíram vertiginosamente sua atividade catalítica. Contudo, observamos que a estrutura ancestral reconstruída demonstrou, em geral, um comportamento parecido com as HIUases modernas comparadas. Estruturalmente, a ancestral teve o substrato, o intermediário e o produto oscilando no sítio ativo em faixas de RMSD próximas das outras estruturas analisadas, assim como valores de energia de ligação próximas também. As geometrias das coordenadas de reação também foram parecidas e com energias próximas nos respectivos métodos testados. Tais resultados podem ser fortes evidências de que a estrutura construída possui atividade de HIUase, reforçando que esta seria uma proteína próxima da ancestral comum das TTR e HIUase antes da duplicação gênica. Contudo, apesar de terem sido observadas variações nos valores calculados de energia e RMSD, ainda seriam necessários mais testes, assim como uma validação experimental para determinar o impacto dessas diferenças, principalmente do ponto de vista cinético, em que ainda faltam resultados robustos para serem calculados. A validação do método de obtenção do perfil de energia mostrou que não conseguimos aproximar bem o valor calculado do experimental, porém ainda não foi possível determinar se a etapa da reação química calculada se trata da etapa limitante da reação. Ou seja, ainda se faz necessário avaliar a segunda etapa da catálise enzimática e comparar os valores obtidos, e desta vez analisar de forma mais confiável as constantes cinéticas obtidas.

Por fim, a maioria dos problemas na amostragem e a obtenção das energias orbitam nos métodos de cálculo da estrutura eletrônica escolhidos e no tamanho da região quântica utilizada. Dito isso, concluímos que, para futuros cálculos utilizando estes mesmos sistemas, o método AM1dphot pode ser a melhor escolha, pois, apesar de computar uma maior barreira de energia potencial, as matrizes 2d obtidas se comportaram melhor e geraram coordenadas menos ruidosas do ponto de vista qualitativo em relação ao PM6. Quanto à região quântica, acreditamos que devemos realizar cálculos com pelo menos 300 átomos, devido ao papel do resíduo de água na catálise e à possível contribuição dos demais resíduos de água ao redor do

sítio. Vale ressaltar também que se faz sempre necessário refinar as energias utilizando DFT visto que em uma das estruturas o perfil de energia mudou completamente ao ser refinado.

7. REFERÊNCIAS

BACHEGA, José Fernando R., et al. GTKDynamo: A PyMOL plug-in for QC/MM hybrid potential simulations. 2013.

BLAKE, C. C. F. et al. Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution: a preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. **Journal of molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 1-12, 1974.

CLEMENTE, Camila M.; CAPECE, Luciana; MARTÍ, Marcelo A. Best Practices on QM/MM Simulations of Biological Systems. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 9, p. 2609-2627, 2023.

CODY, Vivian. Recent advances in transthyretin evolution, structure and biological functions. **Berlin: Springer**, 2009.

D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, J.T. Berryman, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, N. Forouzes, G. Giambaşu, T. Giese, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, J. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, M.C. Kaymak, E. King, A. Kovalenko, T. Kurtzman, T.S. Lee, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, M. Machado, V. Man, M. Manathunga, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, K.A. O’Hearn, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, A. Rahnamoun, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, A. Shajan, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, J. Wang, H. Wei, X. Wu, Y. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York, S. Zhao, Q. Zhu, and P.A. Kollman (2023), Amber 2023, University of California, San Francisco.

DE OLIVEIRA, Lucas Carrijo, et al. Reenacting the Birth of a Function: Functional Divergence of HIUases and Transthyretins as Inferred by Evolutionary and Biophysical Studies. **Journal of Molecular Evolution**, 2021, 1-14.

ENEQVIST, Therese, et al. The transthyretin-related protein family. **European journal of biochemistry**, 2003, 270.3: 518-532.

FIELD, Martin J. **A practical introduction to the simulation of molecular systems.** Cambridge University Press, 1999.

FIELD, Martin J. The pDynamo program for molecular simulations using hybrid quantum chemical and molecular mechanical potentials. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 7, p. 1151-1161, 2008.

FRENCH, Jarrod B.; EALICK, Steven E. Structural and kinetic insights into the mechanism of 5-hydroxyisourate hydrolase from *Klebsiella pneumoniae*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 8, p. 671-677, 2011.

GOVENDER, Krishna; GAO, Jiali; NAIDOO, Kevin J. AM1/d-CB1: A semiempirical model for QM/MM simulations of chemical glycobiochemistry systems. **Journal of chemical theory and computation**, v. 10, n. 10, p. 4694-4707, 2014.

HAGEN, GARRETT A.; ELLIOTT, WILLIAM J. Transport of thyroid hormones in serum and cerebrospinal fluid. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 1973, 37.3: 415-422.

HENNEBRY, Sarah C., et al. The crystal structure of the transthyretin-like protein from *Salmonella dublin*, a prokaryote 5-hydroxyisourate hydrolase. **Journal of molecular biology**, 2006, 359.5: 1389-1399.

HOMEYER, Nadine; GOHLKE, Holger. Free energy calculations by the molecular mechanics Poisson– Boltzmann surface area method. **Molecular informatics**, v. 31, n. 2, p. 114-122, 2012.

HONIG, Barry; NICHOLLS, Anthony. Classical electrostatics in biology and chemistry. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1144-1149, 1995.

HOU, Tingjun et al. Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods. II. The accuracy of ranking poses generated from docking. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 5, p. 866-877, 2011.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

J.W. Ponder and D.A. Case. (2003) "Force fields for protein simulations." *Adv. Prot. Chem.* 66, 27-85.

JUNG, Du-Kyo, et al. Structural and functional analysis of PucM, a hydrolase in the ureide pathway and a member of the transthyretin-related protein family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2006, 103.26: 9790-9795.

KANAAN, Natalia; CREHUET, Ramon; IMHOF, Petra. Mechanism of the glycosidic bond cleavage of mismatched thymine in human thymine DNA glycosylase revealed by classical molecular dynamics and quantum mechanical/molecular mechanical calculations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 38, p. 12365-12380, 2015.

KANAI, Masamitsu, et al. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. **The Journal of clinical investigation**, 1968, 47.9: 2025-2044.

KARPLUS, Martin; KUSHICK, Joseph N. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. **Macromolecules**, v. 14, n. 2, p. 325-332, 1981.

KÖHRLE, Josef. Thyroid hormone transporters in health and disease: **advances in thyroid hormone deiodination. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, 2007, 21.2: 173-191.

KRATZER, James T. et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 10, p. 3763-3768, 2014.

KUMAR, Shankar et al. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. **Journal of computational chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1011-1021, 1992.

LAIDLER, Keith James et al. **Chemical kinetics**. New York: McGraw-Hill, 1965.

LI, Ze et al. Phylogenetic articulation of uric acid evolution in mammals and how it informs a therapeutic uricase. **Molecular Biology and Evolution**, v. 39, n. 1, p. msab312, 2022.

LIAO, Qinghua. Enhanced sampling and free energy calculations for protein simulations. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 170, p. 177-213, 2020.

LUNDBERG, Erik, et al. The transthyretin-related protein: structural investigation of a novel protein family. **Journal of structural biology**, 2006, 155.3: 445-457.

Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek and Geoffrey R Hutchison; “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” **Journal of Cheminformatics** 2012, 4:17.

Ministério da Saúde. **Hipertensão (pressão alta)**. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hipertensao>>

MONACO, Hugo L.; RIZZI, Menico; CODA, Alessandro. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. **Science**, 1995, 268.5213: 1039-1041.

MUKHERJEE, Arnab; SASIKALA, Wilbee D. Drug–DNA intercalation: From discovery to the molecular mechanism. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 92, p. 1-62, 2013.

NEESE, Frank et al. The ORCA quantum chemistry program package. **The Journal of chemical physics**, v. 152, n. 22, 2020.

OLIVEIRA, Augusto F. et al. Density-functional based tight-binding: an approximate DFT method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1193-1205, 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Relatório lançado pela OMS detalha o impacto devastador da hipertensão e as formas de combatê-la**. Disponível em: <

PHILLIPS, James C. et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. **The Journal of chemical physics**, v. 153, n. 4, 2020.

SCHWARZMAN, Alexander L., et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1994, 91.18: 8368-8372.

STEWART, James JP. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular modeling**, v. 13, p. 1173-1213, 2007.

SUTCLIFFE, Michael J.; SCRUTTON, Nigel S. Enzymology takes a quantum leap forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 358, n. 1766, p. 367-386, 2000.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.

THIEL, Walter. Semiempirical quantum–chemical methods. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 4, n. 2, p. 145-157, 2014.

TRAN, Lily et al. Oral Delivery of Nanoparticles Carrying Ancestral Uricase Enzyme Protects against Hyperuricemia in Knockout Mice. **Biomacromolecules**, v. 24, n. 5, p. 2003-2008, 2023.

TSUI, Vickie; CASE, David A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 56, n. 4, p. 275-291, 2000.

WATANABE, Susumu et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. **Hypertension**, v. 40, n. 3, p. 355-360, 2002.

YAMAUCHI, Kiyoshi; KASAI, Kentaro. Sequential molecular events of functional trade-offs in 5-hydroxyisourate hydrolase before and after gene duplication led to the evolution of

transthyretin during chordate diversification. **Journal of molecular evolution**, 2018, 86.7: 457-469.

ZANOTTI, Giuseppe, et al. Structure of zebra fish HIUase: insights into evolution of an enzyme to a hormone transporter. **Journal of molecular biology**, 2006, 363.1: 1-9.