

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DA
MOLÉCULA ARGENTILACTONA EM *Cryptococcus*
neoformans e *Cryptococcus gattii***

Trabalho de Conclusão de Curso

Jéssica Scherer

Porto Alegre, Junho de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DA MOLÉCULA ARGENTILACTONA EM
*Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii***

JÉSSICA SCHERER

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientadora: Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Cláudia Lemelle Fernandes

Porto Alegre, Junho de 2015.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à UFRGS e a todos os professores pelo apoio e ensino de excelência;

Em especial à minha orientadora professora Marilene Henning Vainstein, pelo apoio, incentivo, confiança e principalmente pela oportunidade. E à minha co-orientadora por todo o tempo dedicado a este trabalho, pelos conselhos, ensinamentos, pela amizade e também pela oportunidade.

Ao professor Charley Staats e professora Livia Kmetzsch pelo auxílio dado sempre que requisitado.

Aos meus pais pelo amor, dedicação, conselhos e incentivo pleno para que eu conseguisse concluir esta etapa da vida. Ao meu irmão pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos dos laboratórios 220 e do núcleo de biologia teórica e computacional do Centro de Biotecnologia pelo companheirismo, auxílio e amizade. Em especial à Vanessa Barcelos, pelos ensinamentos e ao Renato Corá pelo coleguismo e parceria.

Ao Maurício Garcia pelo amor, paciência, companheirismo e amizade de sempre, obrigada por estar ao lado e me dar forças quando precisava.

Aos amigos de Terra de Areia, que mesmo distantes fizeram-se presentes em minha vida, obrigada pelas inúmeras risadas, pelo carinho e amizade. Aos colegas da biotecnologia pelo companheirismo ao longo destes anos. Aos parentes que estiveram ao meu lado apoiando e incentivando.

Às agências de fomento CAPES e CNPq.

RESUMO

Criptococose é uma doença infecciosa causada pelas leveduras *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* e é caracterizada por atingir os pulmões e quando infecta o sistema nervoso, causando meningite. Diferencialmente *C. neoformans* afeta pacientes imunocomprometidos, enquanto *C. gattii* acomete principalmente indivíduos imunocompetentes. Na busca por novos antifúngicos, as moléculas naturais que possuam proteínas-alvo ausentes em humanos são fortes candidatas. Neste contexto, a molécula natural argenilactona, apresenta grande potencial como novo fármaco, pelo fato de afetar a enzima isocitrato liase. Estudos prévios demonstraram que a ausência da enzima em *C. neoformans* não alterou sua virulência em murinos, porém não existem relatos sobre a relação da enzima com virulência em *C. gattii*. Análises *in vitro* mostraram que baixas concentrações de argenilactona, além de alterar o desenvolvimento da cápsula polissacarídica e morfologia, principalmente para *C. gattii*, também interferem com o desenvolvimento a 37 °C de ambas as espécies. Sendo assim, com o intuito de verificar as implicações da molécula na inibição da isocitrato liase de *C. neoformans* e *C. gattii* foram realizados testes com diferentes fontes de carbono como glicose e acetato. Em meios de cultivo contendo acetato, foi verificada uma diminuição do desenvolvimento das espécies na presença de argenilactona, com um efeito dose-dependente mais expressivo em *C. gattii*. Nas análises *in silico*, foram identificadas diferenças no comportamento estrutural das enzimas, apesar de possuírem alta identidade de sequência. A isocitrato liase de *C. neoformans* é muito mais compacta, o que pode influenciar em suas funções. Na presença de argenilactona foi observada uma maior estabilidade de ligação e interações mais favoráveis com a enzima de *C. gattii*, corroborando os resultados obtidos *in vitro*. Assim, conseguimos identificar neste trabalho uma maior inibição da enzima de *C. gattii* por argenilactona; entretanto, novos testes *in vitro* são necessários para analisar melhor o potencial terapêutico desta molécula.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an infectious disease caused by the yeasts *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and is characterized by affecting the lungs and when it infects the nervous system, by meningitis. *C. neoformans* differentially affects immunocompromised patients, whereas *C. gattii* affects mainly immunocompetent individuals. In search for novel antifungals, natural molecules that have no target proteins in humans are strong candidates. In this context, the natural molecule argenilactone, has great potential as new drug, because it affects the enzyme isocitrate lyase. Previous studies have demonstrated that the absence of this enzyme in *C. neoformans* didn't alter virulence in mice, but there are no reports on the relationship of this enzyme with virulence for *C. gattii*. *In vitro* analyses showed that low concentrations of argenilactone, alter the development and morphology of the polysaccharide capsule, especially for *C. gattii*, and also interfere with the development at 37 °C for both species. Therefore, in order to verify the implications of the molecule in the inhibition of isocitrate lyase *C. neoformans* and *C. gattii* growth tests were conducted with different carbon sources such as glucose and acetate. In culture media containing acetate was verified a decrease in the development of the species in the presence of argenilactone with a more significant dose-dependent effect for *C. gattii*. In analyzes of the enzymes *in silico*, structural differences have been identified despite having high sequence identity. The isocitrate lyase of *C. neoformans* became much more compact, something that can influence their functions. In the presence of argenilactone was observed a higher binding stability and more favorable interactions with the enzyme of *C. gattii* were observed, corroborating the results obtained *in vitro*. Thus, we identified in this work a greater inhibition of the *C. gattii* enzyme by argenilactone; however, new *in vitro* tests are needed to better analyze the therapeutic potential of this molecule.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CIM	concentração inibitória mínima
CFM	concentração fungicida mínima
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
GalXM	galactoxilomanana
GXM	glucuronoxilomanana
HIV	vírus da imunodeficiência humana
ICL	isocitrato liase
L-DOPA	L-dopamina
MM	meio mínimo
MOPS	ácido morfolinopropanosulfônico
nm	nanômetro
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato-salino
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RPMI	meios <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSMD	desvio médio quadrático
RMSF	flutuação média quadrática
SNC	sistema nervoso central
YPD	<i>yeast-extract/peptone/dextrose</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DE INFECÇÃO DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP</i>	2
FIGURA 2. DESENVOLVIMENTO À 37°C EM <i>C. NEOFORMANS</i>.	5
FIGURA 3: DIFERENTES IMAGENS DA CÁPSULA POLISSACARÍDICA DE <i>C. NEOFORMANS</i>	6
FIGURA 4: MELANIZAÇÃO DE <i>C. NEOFORMANS</i>	7
FIGURA 5: ESQUEMA DO CICLO DO GLIOXILATO E DO CICLO DE KREBS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	10
FIGURA 6: ESTRUTURA MOLECULAR DO 3-NITROPROPIONATO	12
FIGURA 7: ESTRUTURA MOLECULAR DA ARGENTILACTONA.	13
FIGURA 8: PASSOS DA MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA	14
FIGURA 9: ETAPAS DA SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR À 310 K, COM DESTAQUE NA TERMALIZAÇÃO.	24
FIGURA 10. PRODUÇÃO DE MELANINA EM <i>C. GATTII</i> E <i>C. NEOFORMANS</i> NA PRESENÇA DE ARGENTILACTONA OU DMSO 10 %.	26
FIGURA 11: A CÁPSULA POLISSACARÍDICA DIMUINI E A MORFOLOGIA É ALTERADA NA PRESENÇA DE ARGENTILACTONA EM <i>C. GATTII</i>.	28
FIGURA 12: A CÁPSULA POLISSACARÍDICA DIMINUI E A MORFOLOGIA É ALTERADA NA PRESENÇA DE ARGENTILACTONA EM <i>C. NEOFORMANS</i>	29
FIGURA 13: DESENVOLVIMENTO À 30 °C E 37 °C DE <i>C. GATTII</i>.	30
FIGURA 14: DESENVOLVIMENTO À 30 °C E 37 °C DE <i>C. NEOFORMANS</i>	30
FIGURA 15: VERIFICAÇÃO CRESCIMENTO DE <i>C. GATTII</i> EM MEIOS COM GLICOSE E ACETATO ADICIONADOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARGENTILACTONA.	31
FIGURA 16: VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>C. NEOFORMANS</i> EM MEIOS CONTENDO GLICOSE E ACETATO ADICIONADOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARGENTILACTONA.	31
FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA 3-NPA.	32
FIGURA 18: REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA ARGENTILACTONA.	33
FIGURA 19: ALINHAMENTO PELO CLUSTALW DE <i>C. GATTII</i> E DE <i>A. NIDULANS</i>.	34
FIGURA 20: ALINHAMENTO PELO CLUSTALW DE <i>C. NEOFORMANS</i> E DE <i>A. NIDULANS</i>.	35
FIGURA 21: IMAGENS DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DO MOLDE E MODELO ICL SOBREPSTOS	36

FIGURA 22: GRÁFICO DE ANOLA E QMEAN, FORNECIDO PELO PROGRAMA SWISS-MODEL.	37
FIGURA 23: RESULTADOS FORNECIDOS DO SWISS-MODEL	38
FIGURA 24: RESULTADO FORNECIDO PELO MOLPROBITY	38
FIGURA 25: REPRESENTAÇÃO DO DOCKING MOLECULAR.	40
FIGURA 26: ANÁLISE COMPARATIVA DOS GRÁFICOS DE RSMD E RAI0 DE GIRO DE <i>C. GATTII</i>.	41
FIGURA 27: ANÁLISE COMPARATIVA DOS GRÁFICOS DE RSMD E RAI0 DE GIRO DE <i>C. NEOFORMAN</i>.	41
FIGURA 28: GRÁFICO DE RMSF E ICL DE <i>C. GATTII</i>	45
FIGURA 29: GRÁFICO DE RMSF E ICL DE <i>C. NEOFORMANS</i>	46
FIGURA 30: GRÁFICO DE RSMD DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA ICL DE <i>C. GATTII</i>.	47
FIGURA 31: ESTRUTURA SECUNDÁRIA ICL DE <i>C. GATTII</i>.	48
FIGURA 32: GRÁFICO DE RSMD DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA ICL DE <i>C. NEOFORMANS</i>	48
FIGURA 33: ESTRUTURA SECUNDÁRIA ICL DE <i>C. NEOFORMANS</i>.	49
FIGURA 34: ALINHAMENTO DE <i>C. GATTII</i> E <i>C. NEOFORMANS</i>.	50
FIGURA 35: IMAGENS DAS ESTRUTURAS SOBREPOSTAS DE <i>C. GATTII</i> E <i>C. NEOFORMANS</i> APÓS A DINÂMICA DE 100NS.	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CIM E CFM DE ARGENTILACTONA EM <i>C. GATTII</i> E <i>C. NEOFORMANS</i>.	26
TABELA 2: INTERAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DE <i>C. GATTII</i> (PRETO) E <i>C. NEOFORMANS</i> (VERMELHO) COM ARGENTILACTONA DURANTE A SIMULAÇÃO. OS SÍMBOLOS INDICAM O = LIGAÇÃO HIDROFÓBICA E I = LIGAÇÃO HIDROFÍLICA.	42
TABELA 3: INTERAÇÃO DE AMINOÁCIDOS DE <i>C. GATTII</i> (PRETO) E <i>C. NEOFORMANS</i> (VERMELHO) COM 3-NPA DURANTE A SIMULAÇÃO. OS SÍMBOLOS INDICAM O = LIGAÇÃO HIDROFÓBICA E I = LIGAÇÃO HIDROFÍLICA.	43
TABELA 4: TABELA DE ENERGIA DAS PROTEÍNAS COM OS LIGANTES.	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Criptococose</i>	1
1.2	<i>C. neoformans e C. gattii</i>	2
1.3	<i>Fatores de virulência</i>	3
1.3.1	Capacidade de desenvolvimento à 37°C.....	4
1.3.2	Presença de cápsula polissacarídica.....	5
1.3.3	Produção de melanina.....	7
1.4	<i>Mecanismo de ação de antifúngicos</i>	8
1.5	<i>Ciclo do Glioxilato</i>	9
1.5.1	<i>Isocitrato Liase (ICL)</i>	10
1.5.1.1	<i>Inibidores da ICL</i>	11
1.6	<i>Estudo de moléculas naturais</i>	12
1.6.1	<i>Argentilactona</i>	13
1.7	<i>Modelagem molecular comparativa</i>	13
1.8	<i>Docking molecular</i>	14
1.9	<i>Dinâmica molecular</i>	14
2	OBJETIVO.....	17
2.1	<i>Objetivos específicos</i>	17
3	JUSTIFICATIVA.....	16
4	METODOLOGIA	18
4.1	<i>Análises in vivo</i>	18
4.1.1	<i>Linhagens e meios de cultura</i>	18
4.1.2	<i>Argentilactona</i>	18
4.1.3	<i>Teste de susceptibilidade</i>	18

4.1.4	<i>Avaliação de fatores de virulência</i>	19
4.1.4.1	<i>Teste de melanização</i>	19
4.1.4.2	<i>Formação de cápsula</i>	19
4.1.4.3	<i>Desenvolvimento à 37°C</i>	20
4.1.5	<i>Desenvolvimento em meio com glicose ou acetato</i>	20
4.2	Análises <i>in silico</i>	21
4.2.1	<i>Coordenadas e conformação das moléculas 3-NPA e argenilactona</i>	21
4.2.2	<i>Construção dos modelos estruturais da ICL de C. neoformans e C. gattii – Modelagem por homologia</i>	21
4.2.3	<i>Docking molecular</i>	22
4.2.4	<i>Simulação de dinâmica molecular</i>	23
4.2.5	<i>Programas utilizados</i>	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	<i>Teste de microdiluição em caldo - CIM</i>	26
5.2	<i>Teste de melanização</i>	26
5.3	<i>Produção de cápsula polissacarídica</i>	27
5.4	<i>Desenvolvimento à 37 °C</i>	29
5.5	<i>Desenvolvimento em meio com glicose ou acetato</i>	30
5.6	<i>Coordenadas e conformação das moléculas 3-NPA e argenilactona</i>	32
5.7	<i>Modelagem por homologia</i>	33
5.8	<i>Docking molecular</i>	39
5.9	<i>Dinâmica molecular</i>	39
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	52
7	BIBLIOGRAFIA	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Criptococose*

C. neoformans e *C. gattii* são fungos leveduriformes encapsulados e os principais agentes etiológicos da criptococose em humanos. A infecção se inicia pela inalação da levedura dessecada ou de basidiosporos encontrados no meio ambiente associados ao solo, fezes de pombos ou árvores, podendo acometer coalas, cabras e gatos, além de humanos. Os pombos são considerados os maiores agentes de dispersão das células fúngicas. Além disso, as leveduras podem sobreviver em predadores encontrados no solo, como amebas, carrapatos e vermes (Lin e Heitman, 2006).

Quando inalado, o fungo se deposita nos alvéolos pulmonares e coloniza o trato respiratório, podendo causar infecção aguda ou assintomática, na qual o sistema imunológico obtém êxito contra o invasor, porém permanece de forma latente, manifestando-se quando houver um comprometimento da imunidade do hospedeiro. A disseminação no organismo ocorre via hematogênica, podendo causar infecção sistêmica, chegando ao sistema nervoso central (SNC) e causando a forma mais grave da doença, meningoencefalite (Lin e Heitman, 2006; Liu, Perlin e Xue, 2012) (Figura 1). Há relatos, muito raros, de infecção via gastrointestinal e cutânea (Poeta e Casadevall, 2012).

Mesmo com a similaridade morfológica e no processo de infecção, estima-se que as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* divergiram a cerca de 18,5 e 37 milhões de anos, respectivamente, de um ancestral comum (Lin e Heitman, 2006) e apresentam características moleculares, epidemiológicas, distribuição geográfica e ecológica distintas (Cogliati, 2013).

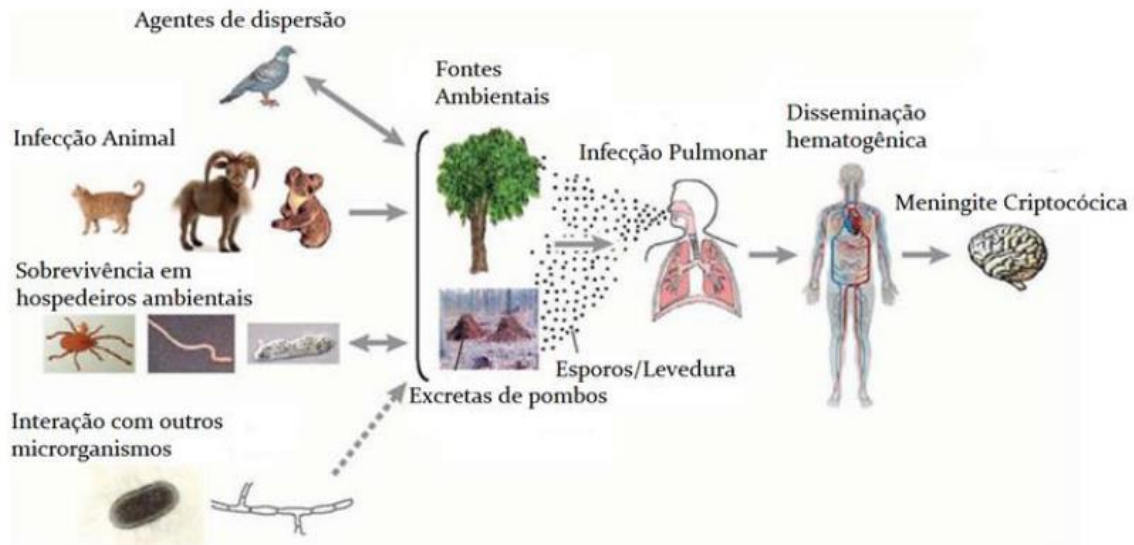


Figura 1: Ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp. Acredita-se que a forma de infecção é através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas, que se depositam nos pulmões e chegam ao SNC pela via hematogênica Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

1.2 *C. neoformans* e *C. gattii*

O primeiro relato de *C. neoformans* provém de uma lesão da tíbia em 1864. Em 1865, Sanfelice isolou a levedura a partir de suco de pêssego fermentado, demonstrando a capacidade de vida livre, mostrando não ser um patógeno humano obrigatório; além disso, comprovar a patogenicidade em modelo animal em laboratório. Apesar de ocorrer em animais e humanos, ainda não foram relatados casos de infecção transmitida entre espécies (Lin e Heitman, 2006). Normalmente, a levedura é encontrada em excretas de pombos e no solo, apresentando distribuição mundial, acometendo pacientes imunocomprometidos como recém-transplantados, pacientes em quimioterapia e sendo a terceira maior causa de morte entre portadores de HIV (Lanjewar, 2011). Acomete cerca de 1 milhão de pacientes com AIDS por ano, levando a óbito aproximadamente 62,5% dos casos, segundo o Centro de controle e prevenção de doenças, CDC, Atlanta, USA (Park et al., 2009). A infecção por *C. neoformans* é associada a lesões no pulmão e cérebro, com tropismo acentuado para o SNC (Ngamskulrunroj et al., 2012).

C. gattii anteriormente conhecido como *C. neoformans* var. *gattii* foi reconhecido como espécie distinta de *C. neoformans* em 2002 (Kwon-Chung et al., 2002). Acreditava-se, anteriormente, que a ocorrência *C. gattii* fosse restrita a regiões tropicais e sub-tropicais como Brasil, África Central e Sul da Ásia (Ellis e Pfeiffer, 1990), porém este conceito foi desmistificado após o surto de infecção por *C. gattii* na ilha de Vancouver, Canadá em 1999. Mais recentemente, houve relatos de casos no estado de Washington, passando-se admitir que esta espécie também vem sendo encontrada em regiões com clima temperado. Estudos indicam que as mudanças climáticas, como a elevação da temperatura podem ser a principal causa da disseminação (Datta, Bartlett e Marr, 2009; Datta et al., 2009). Outra diferença está na fonte ambiental; *C. gattii* é normalmente isolado de árvores de eucalipto, em especial *Eucalyptus camadulensis* e de madeiras em decomposição (Ellis e Pfeiffer, 1990). Todavia, a maior distinção entre está na apresentação clínica, pois *C. gattii* acomete majoritariamente indivíduos imunocompetentes podendo ser mais facilmente disseminado. A infecção é caracterizada pela alta incidência de criptococomas no pulmão e no cérebro, levando muitas vezes a necessidade de intervenção cirúrgica. Esta infecção é mais restrita ao tecido pulmonar e é caracterizada pela alta morbidez e baixa resposta a antifúngicos, apesar de apresentar uma taxa menor de mortalidade comparado a *C. neoformans* (Ngamskulrunroj et al., 2012).

Para obter êxito na infecção, sobreviver e se desenvolver as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* apresentam vários mecanismos de escape do sistema imunológico, conhecidos como fatores de virulência.

1.3 Fatores de virulência

Os fatores de virulência são determinantes para os micro-organismos obterem sucesso durante a infecção e transporem as defesas do hospedeiro, além de auxiliarem na sobrevivência no meio ambiente. Um grande número de genes ligados a certos fatores relacionados ao estabelecimento da infecção já foram caracterizados em *C. neoformans* e *C. gattii*, no entanto, na literatura são 3 os fatores mais relatados, importantes e compartilhados por ambas espécies: capacidade de desenvolvimento à 37 °C, presença de cápsula polissacarídica e produção de melanina. Além destes, outro fator importante relacionado a infecção, é a expressão de enzimas extracelulares, como fosfolipases e ureases, que auxiliam,

respectivamente, na penetração no tecido pulmonar e dissiminação para o SNC (Feder et al., 2015; Kronstad et al., 2012; Rodrigues, Alviano e Travassos, 1999).

1.3.1 Capacidade de desenvolvimento à 37° C

Habilidade fundamental para micro-organismos patogênicos humanos é a capacidade de desenvolvimento em altas temperaturas, como do hospedeiro, que é aproximadamente 37° C. Esta característica é essencial para o estabelecimento de infecções fúngicas invasivas. Somente a tolerância do micro-organismo à temperatura corpórea não torna o micro-organismo patogênico, no entanto esta característica é um pré-requisito para uma infecção efetiva (McCusker et al., 1994).

No gênero *Cryptococcus*, apenas *C. neoformans* e *C. gattii* conseguem desenvolver-se eficientemente em temperaturas acima de 30° C (Figura 2). São descritos alguns genes relacionados com esta capacidade. Um dos primeiros genes identificados foi o *CNAC1* que codifica a proteína calcineurina dependente de Ca^{2+} , uma fosfatase serina/treonina específica, que é ativada na mudança de temperatura desfosforilando algumas proteínas necessárias para o crescimento à 37° C (Kraus, Nichols e Heitman, 2005). Primeiramente, Odom et al., 1997, identificaram que ao tratar *C. neoformans* com um inibidor de calcineurina, o fungo perdia a capacidade de desenvolvimento à 37° C, porém mantinha-se em 24° C. Estudos com mutantes nulos para este gene mostraram que além de perder a capacidade de desenvolvimento a 37° C, os mutantes perderam a virulência na infecção em modelo animal. Mais recentemente, foi visto um perfil semelhante em *C. gattii* no qual o mutante nulo apresentava problemas no desenvolvimento à 37° C e perda parcial ou total da virulência no modelo de infecção. Entretanto, diferentemente de *C. neoformans*, *C. gattii* necessita de calcineurina para desenvolver-se em meio com Ca^{2+} , indicando que este gene deve possuir algumas funções diferentes entre as espécies (Chen et al., 2013).

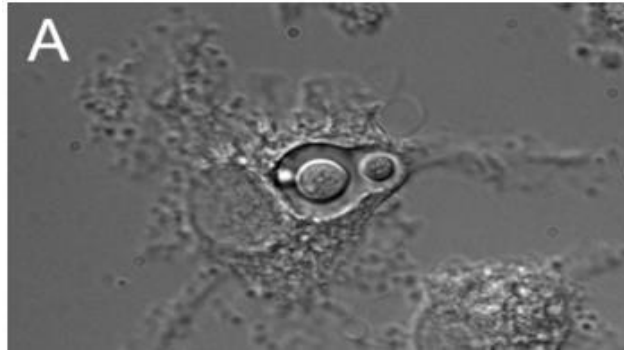


Figura 2. Desenvolvimento à 37° C em *C. neoformans*. Habilidade de proliferação na temperatura do hospedeiro, 37° C. Ilustrando o brotamento no interior de linhagens de macrófago-like. Adaptado de Kronstad, Jung e Hu, 2008.

Outro gene relacionado com o desenvolvimento à 37° C é o gene *URA4*, que gera a enzima *ura4*, que converte carbamoil-L-aspartato fosfato em dihidroorotato, na rota de síntese de pirimidina. O mutante nulo de *URA4* em *C. neoformans* afetou outros fatores de virulência como produção de melanina, cápsula e fosfolipases, mostrando-se avirulento em modelo animal (Gontijo, de et al., 2014).

1.3.2 Presença de cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é considerada o fator de virulência mais importante e foi o primeiro a ser identificado, sendo associado à patogenicidade em *C. neoformans*. Seus componentes, majoritariamente, polissacarídicos são produzidos no interior da célula e exportados por vesículas através da parede celular, constituída por oligômeros de quitina e quitosana. Os fragmentos da cápsula são acomodados na superfície celular por ligações não covalentes, mas pouco se sabe sobre o processo de sua montagem estrutural (Casadevall e Perfect, 1998). Os principais componentes da cápsula são polissacarídeos: glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), sua estrutura é complexa, exige a regulação e expressão de diversos genes em resposta a estímulos (O'Meara e Andrew Alspaugh, 2012; Zaragoza et al., 2009) (Figura 3).

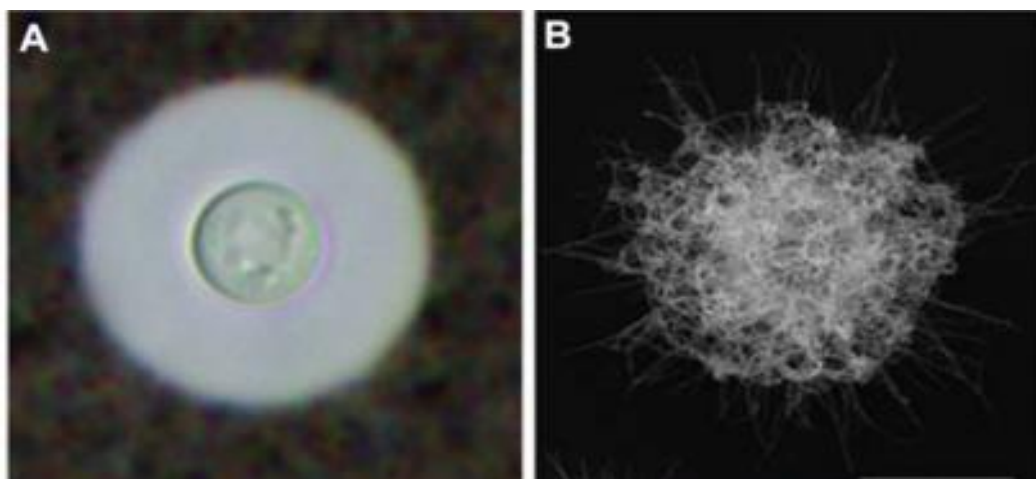


Figura 3: Diferentes imagens da cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. A) Suspensão de células em tinta da Índia. B) Microscopia eletrônica de varredura. Adaptado de Zaragoza et al., 2009.

Mutantes nulos para os genes *CAP* (*CAP10*, *CAP59*, *CAP60*, *CAP64*...) apresentaram-se acapsulares e incapazes de causar infecção (Chang e Kwon-Chung, 1999; Chang, Penoyer e Kwon-Chung, 1996; Chang, 1998; Kwon-Chung et al., 2002).

O tamanho da cápsula varia conforme o ambiente; células coletadas do pulmão de animais infectados possuíam maior diâmetro do que as coletadas do cérebro (Rivera et al., 1998). Por possuir essa habilidade de modulação tanto do tamanho quanto de sua composição, a cápsula destas leveduras, sendo imunomodulada, é capaz de alterar a migração de células no sistema imunológico. Agindo como uma barreira física e antifagocítica, por impedir o reconhecimento de receptores das células do hospedeiro. Ela também inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, inativa o sistema complemento, impede a proliferação de células do sistema imune inato e protege de espécies reativas de oxigênio ROS (O'Meara e Andrew Alspaugh, 2012; Zaragoza et al., 2009). Várias condições de cultura *in vitro* foram descritas como indutoras de formação da cápsula polissacarídica, como meio com privação de ferro e incubação em CO₂, situações que simulam o ambiente encontrado no hospedeiro (Zaragoza e Casadevall, 2004).

No meio ambiente, a cápsula atua na proteção contra predadores naturais como amebas e nematódeos, e contra a desidratação, apresentando uma cápsula de tamanho reduzido, porém densa (O'Meara e Andrew Alspaugh, 2012; Zaragoza e Casadevall, 2004).

1.3.3 Produção de melanina

A melanina é formada por pigmentos hidrofóbicos, negativamente carregados, de alto peso molecular (Figura 4). *Cryptococcus* spp., ao contrário de outros fungos, só é capaz de produzir o pigmento a partir de substrato exógeno, desta forma, a cor e a solubilidade da melanina sintetizada podem mudar conforme a estrutura química do substrato utilizado (Casadevall, Rosas e Nosanchuk, 2000).

No meio ambiente, a melanina protege a levedura da luz ultravioleta e de agentes oxidantes. Já no hospedeiro, também age como antioxidante e inibe a ação de macrófagos (Eisenman e Casadevall, 2012). Estudos mostram que fungos melanizados são mais resistentes à antifúngicos do que fungos não melanizados, como *C. neoformans* que se mostra menos suscetível a anfotericina B (Duin, Casadevall e Nosanchuk, 2002).

A enzima responsável pela conversão da melanina é a lacase, enzima associada à membrana plasmática. A lacase é codificada pelo gene *LAC1*, induzida pela presença de ferro, cálcio e cobre, e inibida pela presença de glicose, nitrogênio e altas temperaturas. Age sobre compostos fenólicos e/ou indólicos, como as catecolaminas (dopamina, norepinefrina e a epinefrina). Ao convertê-las em melanina, faz a deposição da mesma na membrana e parede celular, o que pode justificar o tropismo no SNC, visto que seus precursores são neurotransmissores (Casadevall, Rosas e Nosanchuk, 2000). Independente desta capacidade, a enzima possui atividade ferro-oxidase, assim dentro do fagolisossomo compete com os radicais hidroxilas pelo ferro livre, evitando o estresse oxidativo, protegendo as leveduras de macrófagos alveolares (Liu et al., 1999).

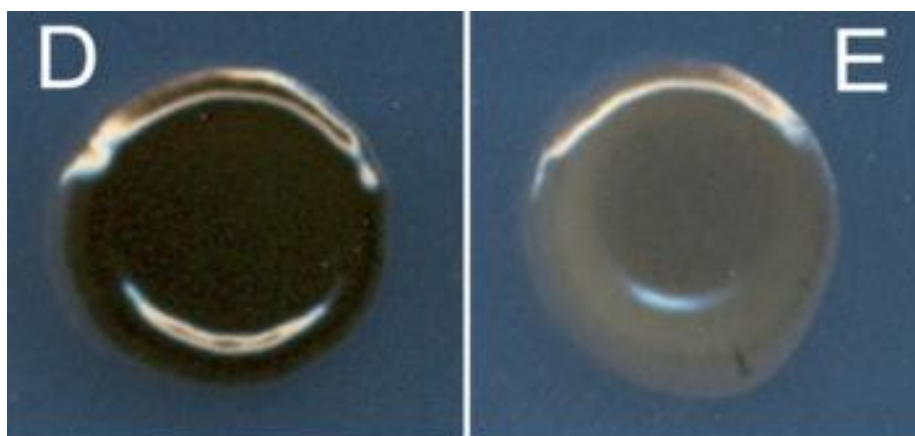


Figura 4: Melanização de *C. neoformans*. D) Formação de melanina resulta em colônias de coloração marrom ou preta e ocorre em meio com baixa concentração de glicose contendo

substrato como a L-dopamina. E) O desenvolvimento em meio sem o substrato resulta em colônias brancas. Adaptado de Kronstad, Jung e Hu, 2008.

1.4 Mecanismo de ação de antifúngicos

Os antifúngicos utilizados na clínica são classificados conforme o mecanismo de ação em azóis, poliênicos, fluoropirimidinas, alilaminas e equinocandinas.

Azóis, como o fluconazol e itraconazol, possuem como alvo a biossíntese de ergosterol, bloqueando a enzima citocromo P450 lanosterol 14 α -demetilase, ocorrendo o acúmulo de 14 α -metil-3,6-diol, que é tóxico para os fungos. Este acúmulo altera a permeabilidade e fluidez da membrana (Odds, Brown e Gow, 2003). Alguns mecanismos de resistência para azóis já foram descritos em *Candida* spp. e *C. neoformans*, como a expressão de bombas de efluxo do fármaco, mutações na enzima alvo, superexpressão da enzima e alteração no padrão da membrana com ausência de ergosterol (Posteraro et al., 2003; Sanglard e Odds, 2002).

Poliênicos, representados pela anfotericina B, ligam-se ao ergosterol da membrana plasmática, desestabilizando-a, levando a permeabilidade de cátions e ânions, o que pode ocasionar extravasamento de organelas celulares vitais e em decorrência a morte celular, além de estimular a resposta imune inata das células através de citocinas pró-inflamatórias (Baginski e Czub, 2009; Ma e May, 2009). A resistência é muito rara, porém há uma alta taxa de nefrotoxicidade e hematotoxicidade. Algumas reformulações lipídicas já foram feitas, no entanto, obtiveram pouco efeito na redução de toxicidade e tornaram-se muito caras, não as tornando viáveis (Baginski e Czub, 2009).

Fluoropirimidinas, que incluem a flucitosina, são transportadas para dentro das células por citosinas permeases e modificada por citosina desaminases. A desaminase que não está presente em humanos, converte a 5-fluorouracil em 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), sendo incorporada em moléculas de RNA inibindo a tradução de proteínas. Também pode converter em 5-fluorodeoxiuridina monofostato (FdUMP), inibindo a timidilato sintase, que é crucial para a produção de timidina, bloqueando a síntese de DNA. A resistência está associada a mutações que levam a deficiências nas enzimas de transporte e metabolismo, e ao aumento da síntese de pirimidinas que competem com o fármaco (Vermees, Guchelaar e Dankert, 2000).

Alilaminas e equinocandinas, atuam na síntese no ergosterol e na síntese do polissacarídeo da parede celular β -1,3-glicana, respectivamente, atingem um baixo número de fungos, não causando dano para *Cryptococcus* spp., não sendo utilizados na clínica contra criptococose (Odds, Brown e Gow, 2003).

Assim, devido à alta taxa de toxicidade dos medicamentos já existentes, que ocorre em virtude da conservação estrutural entre as células de fungos e as células humanas, e a resistência adquirida estarem aumentando consideravelmente, torna-se imprescindível a busca por novos fármacos.

A busca por novos medicamentos com ação antifúngica, possui duas vertentes muito fortes, promissoras e complementares: a procura por moléculas-alvo em enzimas presentes em fungos e ausente em mamíferos e a busca por moléculas naturais, isoladas de plantas (Prado et al., 2014). Com isto em vista, algumas rotas tornam-se fortes candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos que atuem sobre elas.

Um exemplo é o estudo sobre a expressão global de genes durante a infecção no tempo de máxima resposta celular do hospedeiro, onde foi demonstrado que nesta condição genes relacionados ao ciclo do glioxilato são mais expressos em *C. neoformans*. Esta via metabólica é responsável pela obtenção de energia através de moléculas de 2 carbonos. Este estudo apontou a primeira enzima da rota, a Isocitrato Liase (ICL), com uma expressão elevada (Rude et al., 2002).

1.5 *Ciclo do Glioxilato*

O ciclo do glioxilato presente em bactérias, fungos, plantas e nematódeos, é uma via alternativa para o metabolismo de acetil-CoA de 2 carbonos gerar succinato de 4 carbonos, que pode ser reutilizado no ciclo de Krebs, cujo objetivo principal é a produção de glicose, mas também produz precursores na rota de biossíntese de carboidratos e aminoácidos (Kunze et al., 2006).

Descrito por Kornberg e Madsen, 1957, o ciclo apresenta duas enzimas-chaves a ICL e a malato sintase (MLS). A ICL catalisa a clivagem de D-isocitrato em glioxilato e succinato e a MLS catalisa a reação de condensação de acetil-CoA e glioxilato em malato (Nogales et al., 2004) (Figura 5). Estas enzimas mostraram ser super-expressas em condições de baixa

concentração de glicose, na presença de acetato ou etanol, condição de infecção e dentro de macrófagos (Rude et al., 2002; Umemura et al., 1997).

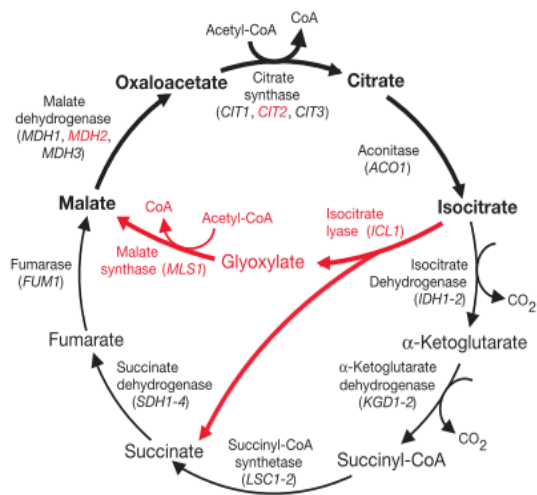


Figura 5: Esquema do ciclo do glicoxilato e do ciclo de Krebs de *Saccharomyces cerevisiae*. Demonstrando em preto o ciclo de Krebs e em vermelho a rota do ciclo do glicoxilato (Lorenz e Fink, 2001).

1.5.1 Isocitrato Liase (ICL)

A ICL, como molécula-alvo para produção de fármacos, apresenta vários pontos relevantes: presença em patógenos procariotos e eucariotos, mas não em vertebrados. Está em uma rota de obtenção de nutrientes, pois a maioria dos medicamentos foca em alvos de divisão celular ou síntese de membrana celular, mas não em prejudicar o metabolismo. Inibidores desta enzima já demonstraram ter ação antifúngica (Hautzel, Anke e Sheldrick, 1990). Além disso a estrutura da ICL vem sendo cada vez mais estudada *in silico*, o que pode auxiliar em análises para busca de futuros candidatos a fármacos (Sharma et al., 2000).

A estrutura da enzima foi primeiramente descrita no fungo *Aspergillus nidulans* por difração de raio-x, com uma resolução de 2.8 Å, apresentando-se na forma quaternária de homotetrâmero. Muitos estudos utilizaram esta estrutura como molde para modelagem por homologia, devido à alta conservação da sequência entre espécies, assim como propriedades catalíticas e cinéticas em resposta a inibidores (Britton et al., 2000; Prado et al., 2014; Sharma et al., 2000).

Em *Cryptococcus* spp., os estudos estão voltados para *C. neoformans* que demonstrou com a infecção em coelhos e modelos para meningite, uma superexpressão de ICL após 7 dias

no espaço subaracnóide. No entanto, ao contrário do que demonstrado em outros fungos, a virulência em camundongos não foi afetada no mutante nulo para o gene ICL. Apesar deste estudo mostrar que a inibição dessa enzima não é suficiente para evitar a infecção neste modelo animal, a importância dessa rota para a virulência ainda deve ser analisada em outras condições e modelos, como efeito em tecidos-específicos e a interação de inibidores de outra rotas de energia, ou fatores de virulência (Rude et al., 2002). Outro ponto é que em *C. gattii*, não há estudos relacionando a virulência com a ausência do gene, mostrando a necessidade de mais pesquisas na área para *Cryptococcus* spp., pois em outros gêneros de fungos já há grandes avanços na busca por inibidores desta enzima, porém nenhum em nível de comercialização (Cheah, Lim e Sandai, 2014; Krátký e Vinšová, 2012).

1.5.1.1 Inibidores da ICL

São descritas algumas moléculas com a capacidade de inibição da ICL de fungos e bactérias, como *Candida albicans* e *Mycobacterium tuberculosis*, destacando-se o 3-nitropropionato (3-NPA) e 3-bromopiruvato. Apesar de demonstrarem este potencial estas moléculas não podem ser testadas *in vivo* por apresentarem alta toxicidade para células humanas e baixa atividade. Então o desenvolvimento de um inibidor seletivo de ICL com propriedades farmacologicamente favoráveis ainda está em aberto (Ahn et al., 2013; Schloss e Cleland, 1982).

O 3-NPA (Figura 6) é um composto orgânico que além de atuar como inibidor de ICL, sendo o mais utilizado em estudos, é aplicado como indutor da doença de Huntington em camundongos, doença neurodegenerativa que afeta os gânglios, levando a distúrbios cognitivos e de movimento (Veres et al., 2015). Devido ao risco relacionado é necessária a procura por novos compostos que possam atuar como inibidores de ICL e moléculas naturais aparecem com grande notoriedade.

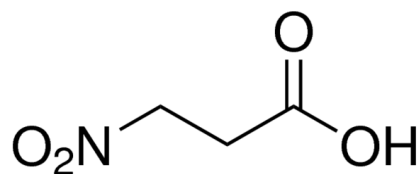


Figura 6: Estrutura molecular do 3-nitropropionato. Também conhecido como ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/n22908?lang=pt®ion=BR>).

1.6 *Estudo de moléculas naturais*

Atualmente, observa-se o crescimento da utilização de fitoterápicos, que demonstram ser seguros e eficazes, além de serem promissoras fontes de moléculas menos nocivas a saúde humana, com aplicabilidade em diversas áreas (Yunes, Pedrosa e Filho, 2001).

O Brasil destaca-se pela a sua biodiversidade, o que contribui para a descoberta de novos metabólitos com ações diversas e economicamente interessantes, porém também torna difícil a seleção de plantas para estudo, devido à vasta diversidade. Para isto, o conhecimento popular contribui na busca por espécies de interesse, como a planta de gênero *Hyptis*, rica em óleos essenciais, popularmente utilizados para tratamento de infecções gastrointestinais, cólicas e reumatismo (Fatima, de et al., 2004). Dentro do gênero pode-se destacar a espécie *Hyptis ovalifolia*, conhecida como malva-do-cerrado, já utilizada popularmente no tratamento de reumatismo.

Esta espécie é um erva perene de 0,80 m a 1,30 m de altura, sendo encontrada nos estados de Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais. Seu extrato etanólico, as frações e o óleo essencial das folhas já foram testados contra 28 isolados clínicos de *C. neoformans* (Paula et al., 2001). No seu óleo essencial foi identificada uma molécula bioativa: argetilactona, testada em patógenos humanos como *Trypanosoma cruzi* (Fátima et al., 2006) e *Leishmania amazonensis* (Waechter et al., 1997). Em todos os ensaios foram observados uma atividade inibitória do desenvolvimento destes patógenos.

1.6.1 Argentilactona

A argentilactona apresenta estrutura lipofílica, pequena e pouco complexa (Figura 7). Atualmente pesquisas com o fungo dimórfico *Paracoccidioides lutzii* demonstraram que houve a inibição de desenvolvimento do fungo na presença de argentilactona. Esta inibição se apresentou dose-dependente, interferindo também em uma das principais características deste fungo, a transição do diformismo. Na busca pelo mecanismo de ação da molécula, Prado e colaboradores (2014) analisaram sua interferência na atividade da enzima ICL, de *P. lutzii* cultivado em meio com glicose ou acetato. Para comprovar a inibição enzimática verificada, foram feitas análises complementares com a proteína recombinante, constatando uma expressiva inibição da enzima, evidenciando ser a ICL alvo da argentilactona (Prado et al., 2014).

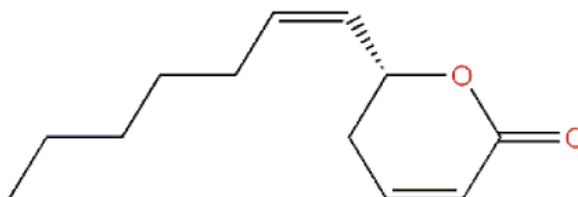


Figura 7: Estrutura molecular da argentilactona (<http://kovats.org/database/kovats/kovats-detail-argentilactone.php>).

1.7 Modelagem molecular comparativa

Na modelagem comparativa, estruturas determinadas por cristalografia de raio-X ou ressonância magnética nuclear, servem de molde para prever a estrutura tridimensional de proteínas com sequência de aminoácidos similares (Martí-Renom et al., 2000). A modelagem molecular por homologia é apresentada pela execução de um fluxograma de trabalho, no qual a identificação dos moldes é seguida pelo alinhamento destes com a sequência da proteína a ser modelada. Posteriormente, são construídos os modelos que são avaliados. O resultado pode tanto validar o modelo como levar a uma nova fase de procura de moldes ou alinhamento dos modelos (Figura 8).

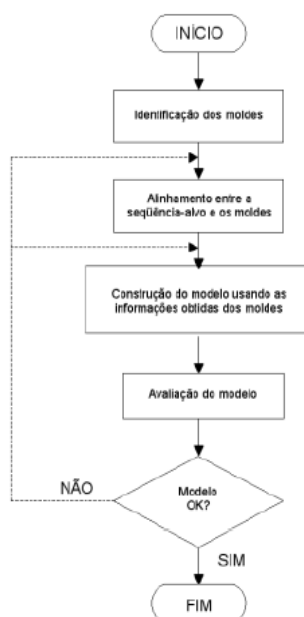


Figura 8: Passos da modelagem molecular comparativa. (Adaptado de Martí-Renom et al., 2000)

1.8 Docking molecular

O *docking* molecular é um método computacional que prediz a conformação e a intensidade da interação, em geral, entre um receptor e um ligante (Trott e Olson, 2010). Esta ferramenta é essencial para a identificação de possíveis sítios de ação de inibidores, como a ligação da argenilactona com a ICL.

1.9 Dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular são baseadas na computação do movimento de átomos em uma molécula, que nos dias atuais, tornaram-se ferramentas muito difundidas, abrangendo estudos de estrutura e dinâmica de biomoléculas, interações de moléculas com sua proteína-alvo, desnaturação e enovelamento protéicos, entre outros (Tuszynski et al., 2014).

A base de cálculos para uma dinâmica molecular é a integração da equação de

movimento de Newton $\frac{d^2r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$, sendo $\frac{d^2r_i(t)}{dt^2}$ a aceleração, m_i a massa e F_i a força sobre um determinado átomo, que ao ser realizado sucessivamente em todos os átomos no sistema gera uma trajetória das moléculas, de posição em relação ao tempo. A energia potencial e cinética é calculada a cada passo da simulação, sobre cada átomo separadamente, sendo descrita como Campo de Força, que é um conjunto de funções e parâmetros para calcular a mecânica molecular, definindo as energias de estiramento e torção de ângulos de ligações. O campo de força, somado com interação entre átomos não ligados, efeitos eletrostáticos, ligações de hidrogênio e outros efeitos estruturais expressam a energia potencial de cada átomo e fornecem dados para calcular a energia do sistema de acordo com os núcleos dos átomos, representados por esferas unidas por molas (Leach, 2001; Schlick, 2006).

Estes estudos computacionais auxiliam no melhor entendimento de mecanismos de ação de moléculas com potencial farmacológico, sendo possível analisar a proteína-alvo, a sua ligação com o composto e a interação entre as duas moléculas em relação ao tempo, podendo determinar se os eventos determinados pelo *docking* molecular serão mantidos e como é a interação entre eles.

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento da resistência adquirida e alta toxicidade dos antifúngicos existentes, torna-se imprescindível a busca por novos fármacos, com características de menor toxicidade como o mecanismo de ação em proteínas-alvo existentes em fungos e inexistentes em humanos.

Assim, tendo em vista o potencial antifúngico da molécula natural argenilactona identificado em estudos prévios e o mecanismo de ação de inibição da ICL, novos estudos com diferentes fungos são interessantes para identificar novos possíveis destinos de tratamento para a molécula. No entanto, sabe-se que a ausência da enzima ICL em *C. neoformans* não altera a virulência em modelo murino; porém, não há relatos para *C. gattii*.

Desta forma, estudos *in vitro* e *in silico* podem indicar se o comportamento, estrutura e funcionalidade da enzima é o mesmo entre as espécies. Logo, o trabalho em questão justifica-se como uma busca por novos fármacos contra *C. gattii* e análise do mecanismo de ação da argenilactona contra *Cryptococcus* spp.

3 OBJETIVO

Diante da problemática de resistência e toxicidade dos antifúngicos existentes, o estudo de proteínas-específicas presentes nos patógenos e ausente em humanos tem sido de grande interesse. Sendo assim, este trabalho tem como enfoque a investigação da molécula argenilactona na inibição do desenvolvimento de *C. gattii* e verificação do mecanismo de ação da molécula na inibição da enzima ICL, em comparação com *C. neoformans*.

3.1 *Objetivos específicos*

- I. Determinar a concentração mínima inibitória da molécula argenilactona para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*;
- II. Avaliar o efeito da argenilactona nos principais fatores de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, formação de cápsula polissacarídica, desenvolvimento a 37° C e produção de melanina;
- III. Determinar sítio de ligação da molécula argenilactona na enzima isocitrato liase de *C. gattii* e *C. neoformans* através de *docking* molecular;
- IV. Analisar estabilidade de ligação da argenilactona na isocitrato liase de *C. gattii* e *C. neoformans* através de dinâmica molecular;
- V. Desenvolver uma análise comparativa da ação da argenilactona nas diferentes espécies de *Cryptococcus*.

4 METODOLOGIA

4.1 Análises *in vivo*

4.1.1 *Linhagens e meios de cultura*

As linhagens de *Cryptococcus* spp. utilizadas neste trabalho foram *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. A linhagem R265, sorotipo B de *C. gattii* foi previamente identificada Kidd et al., 2004 e cedida pelo Dr. Wieland Meyer da coleção de cultura de micologia molecular do laboratório de pesquisa de Micologia Molecular do Hospital Westmead (Universidade de Sidney, Austrália). Para o crescimento das linhagens foram utilizados os seguintes meios: YPD (2% glicose, 2% peptona e 1% extrato de levedura); YPD sólido (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura e 1,5% ágar); MM sólido (15 mM glicose, 10 mM sulfato de magnésio, 29,4 mM KH_2PO_4 , 13 mM glicina, 3 μM tiamina, 1 mM L-DOPA, 2% ágar em pH 5,5); MM acetato (0,28 M acetato de potássio, 10 mM sulfato de magnésio, 29,4 mM KH_2PO_4 , 13 mM glicina, 3 μM tiamina); MM glicose (0,11 M glicose, 10 mM sulfato de magnésio, 29,4 mM KH_2PO_4 , 13 mM glicina, 3 μM tiamina), RPMI-1640 com MOPS.

4.1.2 *Argentilactona*

O composto argentilactona foi gentilmente cedido pela professora Dra. Maristela Pereira da Universidade Federal de Goiás. O óleo foi diluído em 10% de DMSO, filtrado e mantido em alíquotas de 1 mg/ml em geladeira.

4.1.3 *Teste de susceptibilidade*

A concentração inibitória mínima (CIM) da argentilactona foi determinada para as espécies de *Cryptococcus* pelo método de microdiluição de caldo, de acordo com protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A2. Em uma placa de 96 poços o composto foi adicionado em diluições seriadas. A placa foi mantida em 5% de CO_2 à 37°C

por 72 h. O CIM foi definido como a menor concentração sem crescimento celular visível. Para determinar a concentração fungistática e fungicida, 10 µl da suspensão de cada poço foi plaqueado em YPD sólido, e as placas foram incubadas à 30° C por 48 h, sendo considerada a concentração fungicida mínima (CFM) a menor concentração que não apresentou formação de colônia.

4.1.4 Avaliação de fatores de virulência

4.1.4.1 Teste de melanização

Para avaliação da produção de melanina as linhagens de *Cryptococcus* foram cultivadas em 20 mL de YPD líquido à 30° C e 200 rpm por 24 h. Foram retirados 1ml do cultivo transferidos para tubos de *ependorf*, centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos, seguido por 3 lavagens de 1 ml de 1% PBS estéril e inoculadas em MM líquido que foi incubado à 30° C com 200 rpm por 24 h. Novamente as células foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos e ressuspensas em MM líquido com L-DOPA, as células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas para 1×10^5 células e preparadas concentrações seriadas até 1×10^0 no volume de 3 µl da gota. Em uma placa de 96 poços foi adicionado MM sólido L-DOPA contendo argenilactona em diferentes concentrações (CIM, sub-CIM e controle com DMSO). Após as gotas secarem a placa foi levada para estufa à 30° C por 72 h, protegida de luz, a avaliação da melanização foi visual.

4.1.4.2 Formação de cápsula

Para mensurar o tamanho da cápsula *C. neoformans* e *C. gattii* foram cultivados em 20 mL de YPD líquido por 24 h à 30° C e 200 rpm. Após esse tempo, o cultivo foi centrifugado em *ependorf* e as células lavadas 3 vezes com PBS 1% estéril e ressuspensa em 1 mL de PBS 1% estéril. As células foram contadas na câmara de Neubauer e aliqüotadas em 1×10^4 células. Foram adicionadas 200 µL das células em meio RPMI-1640 com MOPS contendo concentrações seriadas de argenilactona ou DMSO 10%, em placas de 24 poços com o volume final de 400 µL por poço. A placa foi incubada por 72 h à 37° C em estufa com

5% de CO₂. Ao término as células foram retiradas dos poços, centrifugadas à 13.000 rpm por 2 minutos, lavadas 3 vezes com PBS 1% estéril e fixadas com paraformaldeído 4% *overnight* à 4° C. As células foram misturadas com nanquim e analisadas no microscópio Axioskop 40 (Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando a câmera digital AxioCam MRC (Zeiss, Alemanha) controlada pelo programa Axiovision v. 4.7.2 (Zeiss, Alemanha). O tamanho da célula e cápsula foram mensurados utilizando o programa ImageJ (NIH, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>). O tamanho da cápsula foi definido pela divisão do diâmetro do corpo da célula pelo diâmetro da célula total, dada pela parede celular. Foram mensuradas 100 células de cada condição.

4.1.4.3 Desenvolvimento à 37° C

As células das linhagens estudadas foram inoculada em 20 mL de YPD líquido por 24 h à 30° C e 200 rpm. Foram retirados 1 ml do cultivo transferidos para tubos *ependorf*, centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos, seguidas por 3 lavagens de 1ml de PBS 1% estéril, as células foram ressuspendidas em 0,5 mL de PBS 1% estéril, diluídas 1:100 e medida a OD de 600 nm, com branco de PBS 1%. Foram feitas diluições de 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ células. Em placas de 24 poços foram preparadas com 300 µL de YPD sólido com a argentiactona ou DMSO 10%. Com uma pipeta foram feitas gotas de 3 µL de cada concentração de célula nos poços, após as gotas secarem uma placa foi incubada por 48 h à 30° C e outra à 37° C. A avaliação do desenvolvimento foi visual.

4.1.5 Desenvolvimento em meio com glicose ou acetato

O pré-inóculo foi preparado em 20 mL de YPD líquido por 24 h à 30° C e 200 rpm. Foram retirados 1 ml do cultivo transferidos para tubos *ependorf*, centrifugados a 13.000 rpm por 2 minutos, seguidos por 3 lavagens de 1 ml com MM e as células foram contadas em câmera de Neubauer e adicionadas 5x10⁴ células em inóculos de 8 mL de MM com glicose líquido e MM com acetato líquido com concentrações seriadas em argentiactona ou DMSO 10% por 48 h à 30° C e 200 rpm. Após incubação as células foram contadas em câmera de Neubauer.

4.2 Análises *in silico*

4.2.1 Coordenadas e conformação das moléculas 3-NPA e argenilactona

As moléculas inibidoras de ICL, 3-NPA e argenilactona, não possuíam estruturas tridimensionais disponíveis, assim utilizou-se o programa Avogadro (Hanwell et al., 2012), que é um avançado editor e visualizador de moléculas, com habilidade multiplataforma em química computacional, modelagem molecular, bioinformática e áreas afins, oferecendo uma renderização flexível de alta qualidade (Hanwell et al., 2012). A otimização da estrutura foi refinada pelo programa GAMESS, que produz estruturas baseadas em cálculos de química quântica com as bases de cálculo 3-21G, 6-31G e 6-311+G (Gordon e Schmidt, 2005; Mo, Song e Lin, 2007).

As topologias para o campo de força utilizado na dinâmica molecular, foram obtidos do programa *online* ATB (<http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/>), que fornece topologias e parâmetros para simulações moleculares, desenho computacional de fármacos e refinamento de técnicas de raio-X (Koziara et al., 2014).

4.2.2 Construção dos modelos estruturais da ICL de *C. neoformans* e *C. gattii* – Modelagem por homologia

Para a construção dos modelos estruturais tridimensionais da enzima ICL das espécies de *Cryptococcus*, primeiramente foi necessária a obtenção das sequências de aminoácidos, retiradas do bando de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) de *C. neoformans* (AFR94564.1) e *C. gattii* (XP_003196291.1).

Com os dados das sequências, utilizou-se o BlastP do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para buscar uma estrutura tridimensional definida de ICL, com alta similaridade. Desta forma, obteve-se o molde de *Aspergillus nidulans* (PDB:1DQU), determinado experimentalmente por difração de raio-X com resolução de 2,8 Å (Britton et al., 2000). Para obter o alinhamento e a comparação das sequências de *Cryptococcus* spp. com o molde, estas foram submetidas ao programa *online* Clustal W2

(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_clustalw.html), no qual obteve-se identidade 59,86% para *C. gattii* e 60,04% para *C. neoformans*.

A modelagem por homologia foi realizada com o programa Modeller 9V12, que implementa uma modelagem comparativa da estrutura de proteínas através de restrições espaciais, podendo fazer modelagem *de novo* de alças e otimizar modelos em relação a flexibilidade definida para determinada função (Eswar et al., 2006; Fiser, Do e Sali, 2000; Sali e Blundell, 1993).

Desta forma, foram obtidos cinco modelos da enzima para cada espécie, os quais foram analisados pelo servidor *online* MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu>) que oferece uma avaliação detalhada do contato de todos os átomos, produzindo dados de alta acurácia como o mapa de Ramachandran e distribuição de rotâmeros, fornecendo a qualidade estereoquímica da molécula (Davis et al., 2007). Outro programa *online* utilizado para verificar a qualidade do modelo teórico, o SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), avalia a qualidade conforme o potencial QMEAN, que é uma função de pontuação para estimar a qualidade local e global dos modelos. Assim, a geometria local é dada pelo um potencial de torção dos ângulos ao longo de três aminoácidos. São gerados potenciais de interações atômicos par a par, que de acordo com a distância são usados para avaliar a interação energética de todos os átomos do modelo e as interações entre os carbonos C β , além disto, um potencial de solvatação descreve o meio em uma solução aquosa (Biasini et al., 2014). Outros métodos de avaliação do SWISS-MODEL são o ANOLEA e o z-score. O ANOLEA é um método capaz de indicar com precisão cada resíduo desordenado, mesmo se os átomos desse não violar a soma dos raios de Van der Waals. E o z-score é dado pelo cálculo de energia total da proteína, assim quanto maior o z-score menor é a qualidade da estrutura submetida (Melo e Feytmans, 1998).

O modelo que apresentou os melhores resultados nessas avaliações foi escolhido para os seguintes passos de *docking* e dinâmica molecular.

4.2.3 *Docking molecular*

Para gerar uma interação inicial entre os inibidores e a enzima ICL, foi utilizado a técnica de *docking* molecular, com o servidor *online* PatchDock.

O PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) dá a possibilidade do usuário fornecer duas moléculas como: proteína, DNA, peptídeo ou ligante, fornecendo como saída uma lista de potenciais complexos escolhidos pela complementariedade de forma. O programa baseia-se em três parâmetros de análise: i) Representação da forma molecular, na qual é calculada a superfície da molécula, em seguida é aplicado um algoritmo de segmentação para detectar regiões geométricas, de modo que apenas locais com pontos de acesso são mantidos; ii) Comparação de regiões da superfície, é aplicado um algoritmo que utiliza um híbrido de misturas geométricas e representações de *clusters*, técnica que combina os resultados obtidos detectando regiões côncavas com regiões convexas e planas; iii) Filtragem e pontuação, os complexos obtidos são analisados, descartando complexos nos quais o receptor não acomoda os átomos do ligante. Assim, os candidatos são classificados de acordo com a pontuação da complementariedade das formas geométricas (Schneidman-Duhovny et al., 2005).

Foram avaliados cinquenta modelos teóricos dos inibidores de cada espécie. Sendo escolhidos para seguir para a etapa de dinâmica molecular os candidatos que possuíam melhor pontuação. Além deste, outro critério de escolha foi a busca por ligantes que encontravam-se mais próximos a região de ligação e interação com aminoácidos descritos em estudos anteriores de Prado et al., 2014, em ICL de *Paracoccidioides lutzii* com argenilactona, para assim verificar a estabilidade e os aminoácidos relacionados na ligação.

4.2.4 Simulação de dinâmica molecular

Os cálculos foram realizados pelo pacote GROMACS 4.5.7 (Spoel, Van Der et al., 2005), com campo de força GROMOS 53a6 (Poger, Gunsteren, Van e Mark, 2010). Seguindo o protocolo descrito por Groot, de e Grubmüller, 2001. As simulações foram realizadas à 310 K, com duração de 100 ns.

Cada condição (enzima, enzima-argenilactona e enzima-3-NPA) de cada espécie foi solvatada em caixa triclínica em condições periódicas de contorno, com modelo de água SPC (Berendsen, Grigera e Straatsma, 1987). Para neutralizar o sistema, foram adicionados íons de acordo com a necessidade. A temperatura e a pressão foram mantidas, utilizando constantes

de acoplamento de, respectivamente, $\tau = 0,1$ ps e $\tau = 0,5$ ps. A constante dielétrica do meio foi tratada como $\epsilon = 1$.

Visando uniformizar a energia das estruturas obtidas na modelagem e no *docking*, foram feitas termalizações no sistema com aquecimento gradativo, evitando deformação das moléculas. Assim, após 1 ps de restrição de posição à 50 K seguidos de 9 ps para adaptação, os sistemas foram aquecidos gradualmente de 50 K a 300 K. Após os primeiros 10 ps, foram seguidos cinco passos de 50 K a cada 5 ps (Figura 9). Após a termalização, o sistema segue a simulação de dinâmica à 310 K durante todo o processo.

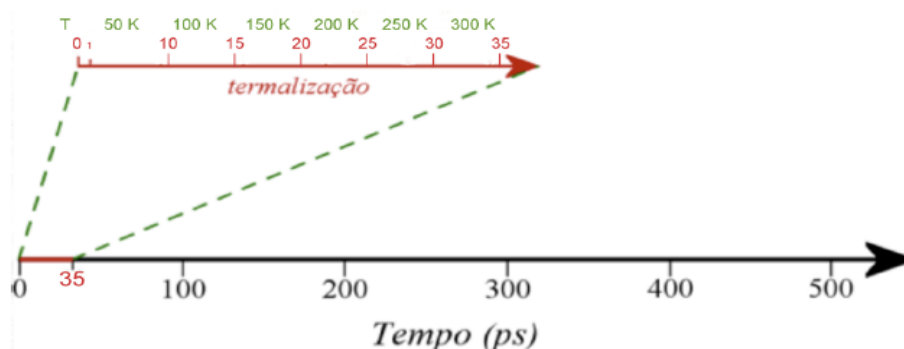


Figura 9: Etapas da simulação de dinâmica molecular à 310 K, com destaque na termalização. De 0 ps a 35 ps, com a primeira etapa de 1 ps seguida por 9 ps, e após, cinco etapas de 5 ps. Aumento 50 K em cada etapa, a partir da segunda, chegando a uma temperatura de 300 K ao final da termalização, sendo elevada à 310 K no início da simulação e mantida esta temperatura por todo o processo (Adaptado de Verli e Guimarães, 2004).

A validação dos resultados obtidos nas simulações de dinâmica molecular foram produzidos através da observação da estabilidade dos sistemas, ou seja, pela a manutenção durante o processo, de propriedades como energia, densidade, volume, analisados através de gráficos gerados pelo pacote do GROMACS e estrutura secundária, obtido pelo servidor *online* PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). Assim como a comparação dos resultados obtidos com os descritos por Prado et al., 2014 na ICL de *P. lutzii*.

4.2.5 *Programas utilizados*

De maneira geral, as ferramentas de visualização empregadas foram: VMD v1.8.6 (Humphey, Dalke e Schulten, 1996), PyMOL (Schrödinger, 2012) e para analisar as interações proteína-ligante o programa LigPlot 4.3.5 (Laskowski e Swindells, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de microdiluição em caldo - CIM

O CIM e CFM da argenilactona estão descritos na tabela 1. Foi observada a inibição contra *Cryptococcus spp.*, verificando que *C. gattii* é mais sensível comparado a *C. neoformans*.

Tabela 1. CIM e CFM de argenilactona em *C. gattii* e *C. neoformans*.

Espécies	Linhagem	CIM µg/ml	CFM µg/ml
<i>C. gattii</i>	R265	15,62	31,25
<i>C. neoformans</i>	H99	31,25	62,50

5.2 Teste de melanização

Para avaliar a síntese de melanina, foi adicionado ao meio uma concentração equivalente a metade do valor de CIM ou DMSO 10% como controle. A figura 10 demonstra

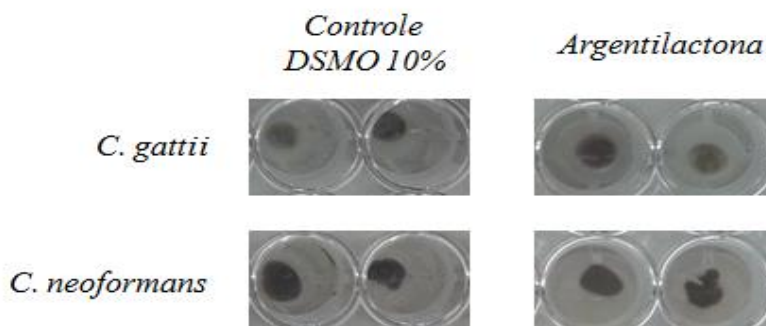
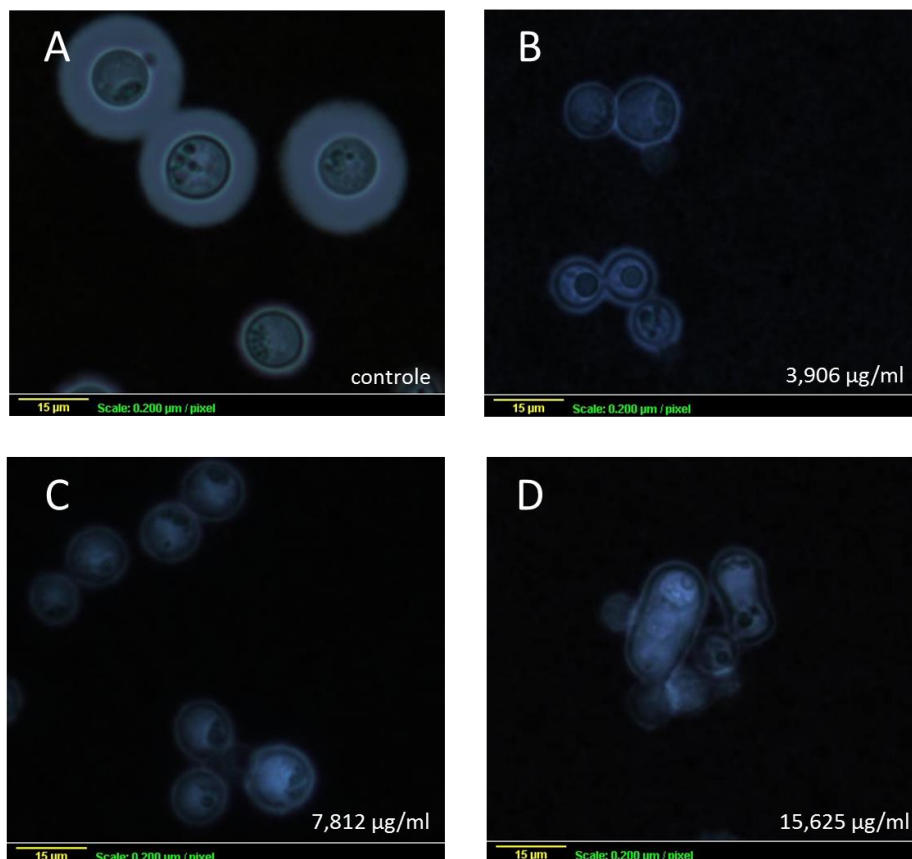


Figura 10. Produção de melanina em *C. gattii* e *C. neoformans* na presença de argenilactona ou DMSO 10 %. As concentrações de argenilactona foram 7,8 µg/ml para *C. gattii* e 15,62 µg/ml para *C. neoformans*.

Não foi possível identificar uma diferença visual no padrão de melanização entra as espécies indicando que a argenilactona não afeta na expressão e atividade da lacase.

5.3 *Produção de cápsula polissacarídica*

A cápsula polissacarídica foi inibida na presença de argenilactona nas duas espécies em estudo, porém mais acentuadamente em *C. gattii*. Foi observada, também, uma alteração morfológica na qual as células não conseguem concluir o processo de divisão celular. Esta característica se acentua com o aumento da concentração de argenilactona ao meio. Foram avaliadas diferentes concentrações de argenilactona e como controle DMSO 10% (Figuras 11 e 12).



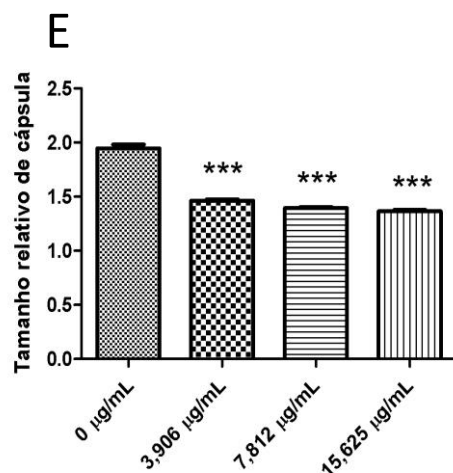


Figura 11: A cápsula polissacarídica diminui e a morfologia é alterada na presença de argentinolactona em *C. gattii*. As células foram cultivadas em condições de indução de cápsula em meio RPMI-1640 à 37° C e 5% CO₂ por 72 h, e coradas com nanquim A) Controle em DMSO 10%. B) Argentinolactona 3,90 µg/ml. C) Argentinolactona 7,812 µg/ml. D) Argentinolactona 15,625 µg/ml. E) O gráfico representa o tamanho da cápsula relativo ao tamanho do corpo celular. Foram medidas 100 células em cada condição. Teste estatístico ANOVA, p-valor < 0,0001.

Em *P. lutzii* foi identificada por microscopia de fluorescência uma deficiência na formação da parede celular, indicando que a argentinolactona afeta os polímeros que constituem a parede (Araújo, 2014). Isto poderia justificar a falha na divisão celular e a diminuição da presença de cápsula, pois esta se fixa à parede celular (Zaragoza et al., 2009). Mais estudos são necessários para definir se a diminuição da cápsula pode ser devido a ausência da produção, verificando por teste de ELISA o efeito na GXM. Também se faz necessário verificar se a argentinolactona induz algum defeito na parede celular, o que prejudicaria a fixação dos polissacarídeos da cápsula.

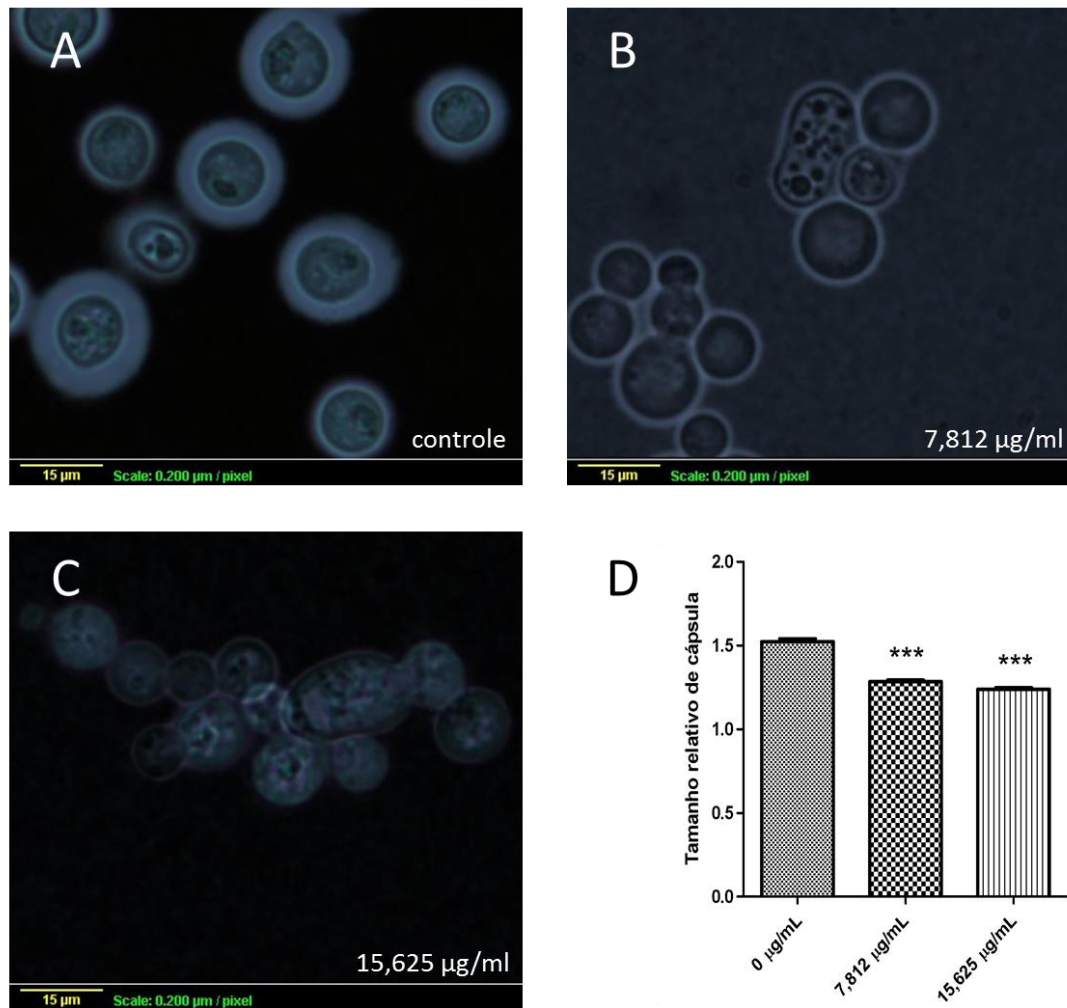


Figura 12: A cápsula polissacarídica diminui e a morfologia é alterada na presença de argenticlactona em *C. neoformans*. As células foram cultivadas em condições de indução de cápsula em meio RPMI-1640 à 37° C e 5% CO₂ por 72 h, e coradas com nanquim. Não foi possível recuperar número de células suficiente para determinar a produção de cápsula e morfologia no valor de CMI 31,25 µg/ml. A) Controle em DMSO 10%. B) Argenticlactona 7,812 µg/ml. C) Argenticlactona 15,625 µg/ml. D) O gráfico representa o tamanho da cápsula relativo ao tamanho do corpo celular. Foram medidas 100 células de cada condição. Teste estatístico ANOVA, p-valor < 0,0001.

5.4 Desenvolvimento à 37° C

O desenvolvimento à 37° C mostrou-se alterado na presença de argenticlactona, de forma mais acentuada em *C. neoformans*, característica não demonstrada em 30 °C. As concentrações testadas foram iguais à metade do valor do CIM (Figura 13 e 14).

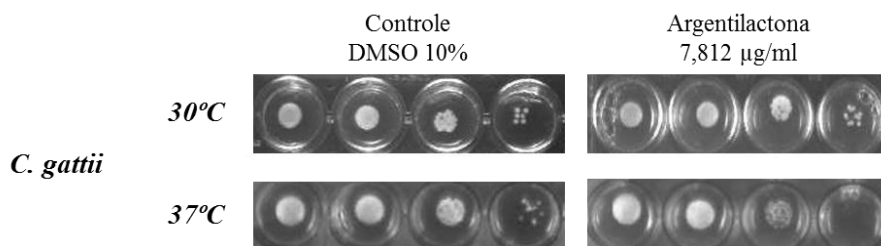


Figura 13: Desenvolvimento à 30° C e 37° C de *C. gattii*. Meio YPD sólido adicionado argentilactona 7,812 µg/ml ou controle DMSO 10%. Há uma leve diminuição no desenvolvimento à 37 °C em relação à 30 °C na presença de argentilactona.

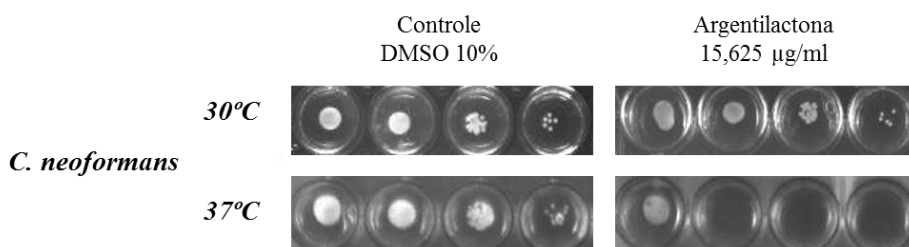


Figura 14: Desenvolvimento à 30° C e 37° C de *C. neoformans*. Meio YPD sólido adicionado argentilactona 15,625 µg/ml ou controle DMSO 10%. Há uma brusca diminuição no desenvolvimento à 37 °C em relação à 30 °C na presença de argentilactona.

Estudos prévios com ICL em *C. neoformans* mostraram uma diminuição da expressão da enzima à 37° C quando comparado à 30° C (Rude et al., 2002). Isto poderia indicar outro mecanismo de ação afetado pela argentilactona em *Cryptococcus spp.*, já que na sua presença em 37° C houve uma diminuição no desenvolvimento.

5.5 Desenvolvimento em meio com glicose ou acetato

Para avaliar se o mecanismo de ação da argentilactona de inibição da ICL em *C. gattii* e *C. neoformans* se mantinha, como descrito em *P. lutzii* por Prado e colaboradores (2014) o desenvolvimento de ambas as espécies em presença de argentilactona foi verificado em meios contendo glicose e acetato, pois acetato é um dos precursores do ciclo de glioxilato (Figura 15 e 16).

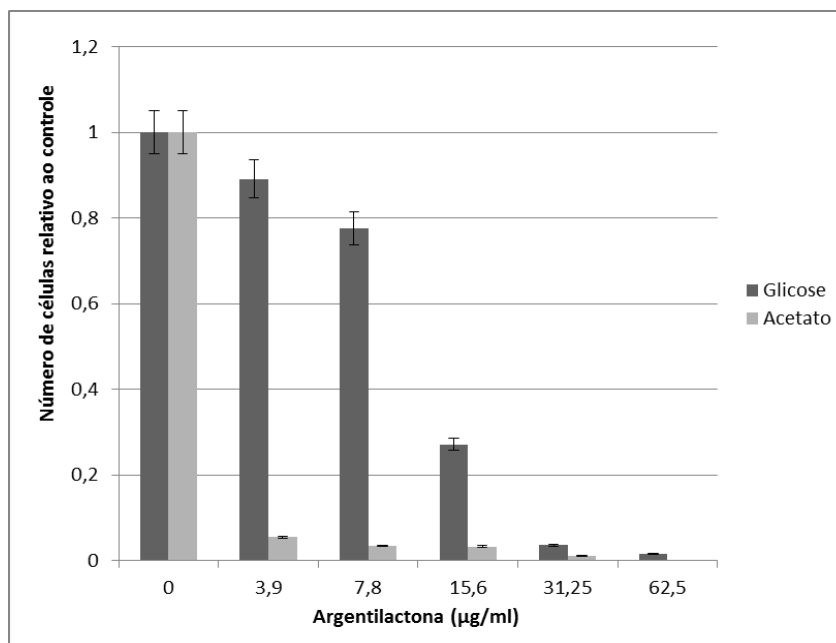


Figura 15: Verificação crescimento de *C. gattii* em meios com glicose e acetato adicionados de diferentes concentrações de argentilactona. Foram inoculadas $6,25 \times 10^4$ células/ml em meio mínimo contendo 0,11 M de glicose ou 0,28 M de acetato na presença de diferentes concentrações de argentilactona. Após 48 h as células em meio com glicose foram diluídas 10x e contadas em Câmara de Neubauer. As células em meio com acetato foram contadas em Câmara de Neubauer sem diluição. O controle do meio com glicose obteve uma média de triplicata de $32,5 \times 10^5$ células/ml e o controle do meio com acetato obteve uma média de triplicata de $26,28 \times 10^4$ células/ml. O gráfico mostra cada tratamento em relação com ao controle.

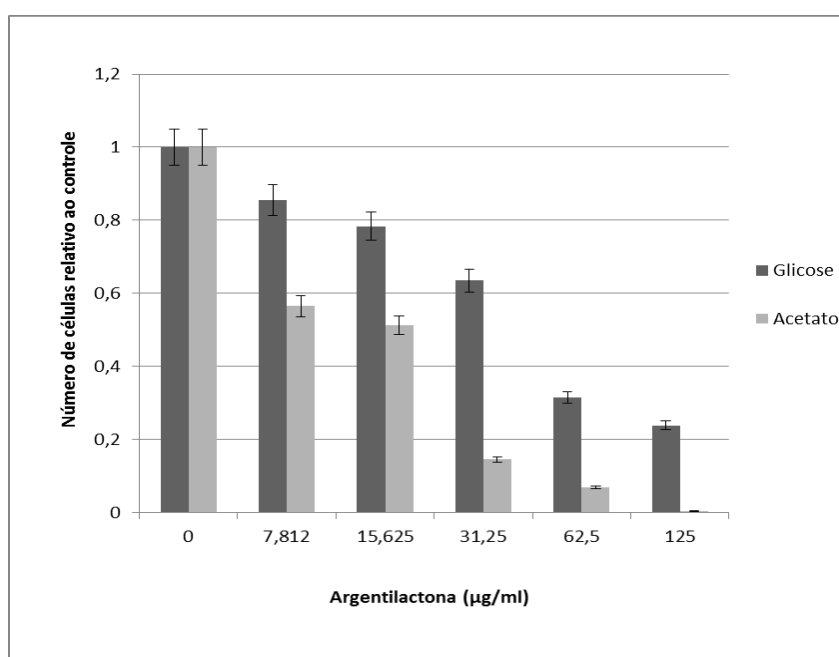


Figura 16: Verificação do crescimento de *C. neoformans* em meios contendo glicose e acetato adicionados de diferentes concentrações de argentilactona. Foram inoculadas $6,25$

x 10⁴ células/ml em meio mínimo contendo 0,11 M de glicose ou 0,28 M de acetato na presença de diferentes concentrações de arginilactona. Após 48 h as células em meio com glicose foram diluídas 100x e contadas em Câmara de Neubauer. As células em meio com acetato foram contadas em Câmara de Neubauer sem diluição. O controle do meio com glicose obteve uma média de triplicata de 31,65 x 10⁶ células/ml e o controle do meio com acetato obteve uma média de triplicata de 38,38 x 10⁴ células/ml. O gráfico mostra cada tratamento em relação com ao controle.

Observou-se uma diminuição mais brusca no desenvolvimento de *C. gattii*, comparado ao *C. neoformans*. Este dado sugere uma possível ação inibitória de arginilactona na enzima ICL, estando de acordo com o valor obtido no CIM, no qual demonstrou que *C. gattii* é mais sensível.

Após estes resultados partimos para a simulação da ICL com arginilactona para analisar a interação entre o ligante e a enzima.

5.6 Coordenadas e conformação das moléculas 3-NPA e arginilactona

As moléculas 3-NPA e arginilactona foram projetadas pelo programa Avogadro e otimizadas pelo programa GAMESS. A figura 17 mostra a sobreposição das moléculas após otimização.

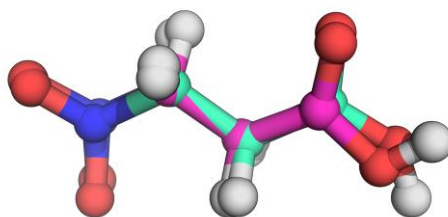


Figura 17: Representação tridimensional da molécula 3-NPA. Os carbonos em ciano mostram a molécula obtida pelo programa Avogadro, em rosa os carbonos da estrutura após minimização pelo programa GAMESS.

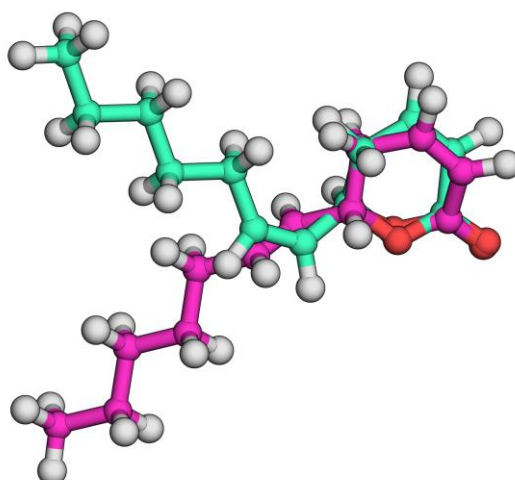


Figura 18: Representação tridimensional da molécula argentilactona. Os carbonos em ciano mostram a molécula obtida pelo programa Avogadro, em rosa os carbonos da estrutura após minimização pelo programa GAMESS.

A molécula 3-NPA sofreu pouca alteração durante a minimização do GAMESS (Gordon e Schmidt, 2005), em relação a estrutura desenhada no programa Avogadro (Hanwell et al., 2012). Já argentilactona apresentou uma alteração maior possivelmente devido à presença da ligação dupla. Ambas as moléculas otimizadas foram submetidas ao servidor ATB (Koziara et al., 2014) para a obtenção da topologia que foi utilizada no pacote GROMACS (Spoel, Van Der et al., 2005), os quais estão representadas no Apêndice 1.

5.7 Modelagem por homologia

Na busca pelo molde para a modelagem por homologia, utilizou-se o BlastP do NCBI, encontrando o PDB da enzima ICL de *A. nidulans* (PDB:1DQU), obtida experimentalmente por difração de raio-X com resolução de 2,8 Å. A identidade com o molde foi de 59,86% para *C. gattii* e 60,04% para *C. neoformans*, o alinhamento das sequências pelo ClustalW é demonstrado nas figuras 19 e 20.

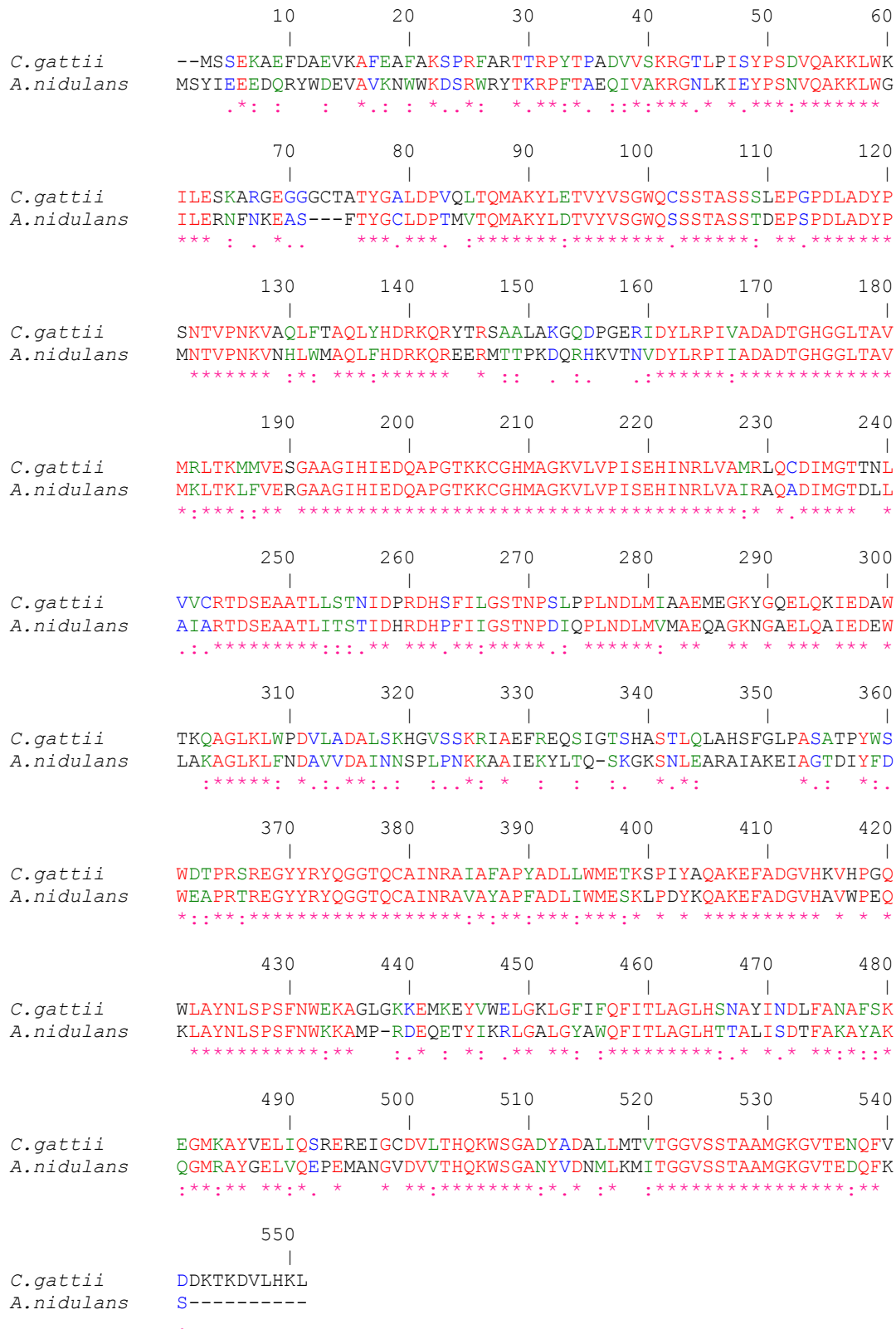


Figura 19: Alinhamento pelo ClustalW de *C. gattii* e de *A. nidulans*. O alinhamento demonstra uma identidade de 59.86% e similaridade de 21,25% com pequenos *gaps* ao longo da sequência, obtendo uma cobertura de 99%.

Os resultados dos alinhamentos são favoráveis para modelagem, pois de acordo com a literatura, para produzir uma modelagem de qualidade é necessário no mínimo 25% de identidade entre as sequências do molde e as do modelo a ser gerado (Eswar et al., 2006). Além disto, a conservação é demonstrada em toda sequência. Desta forma, seguiu-se para a modelagem pelo programa MODELLER.

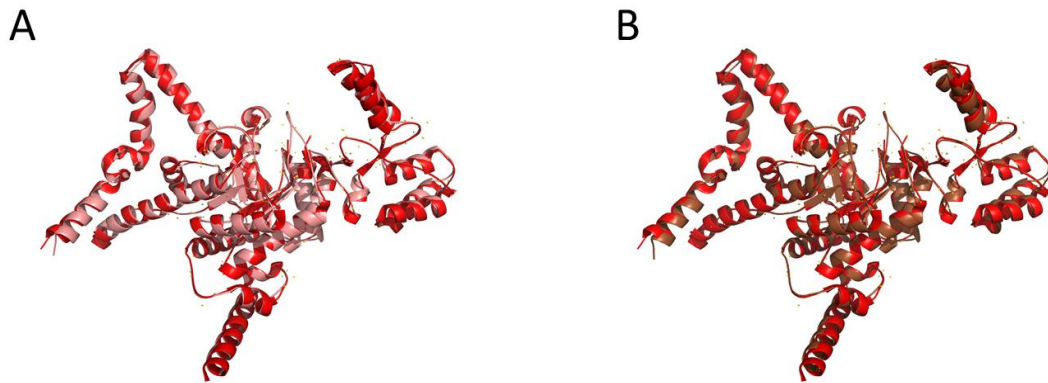


Figura 21: Imagens das estruturas tridimensionais do molde e modelo ICL sobrepostos. A) ICL de *A. nidulans* em vermelho e ICL de *C. gattii* em salmão. B) ICL de *A. nidulans* em vermelho e ICL de *C. neoformans* em marrom.

Para escolher os modelos que deram continuidade ao trabalho, foram analisados 5 modelos de cada espécie, pelo SWISS-MODEL e MOLPROBITY. As figuras 22, 23 e 24 demonstram as análises do modelo escolhido para *C. gattii*, as análises do modelo escolhido para *C. neoformans* estão no Apêndice 2.

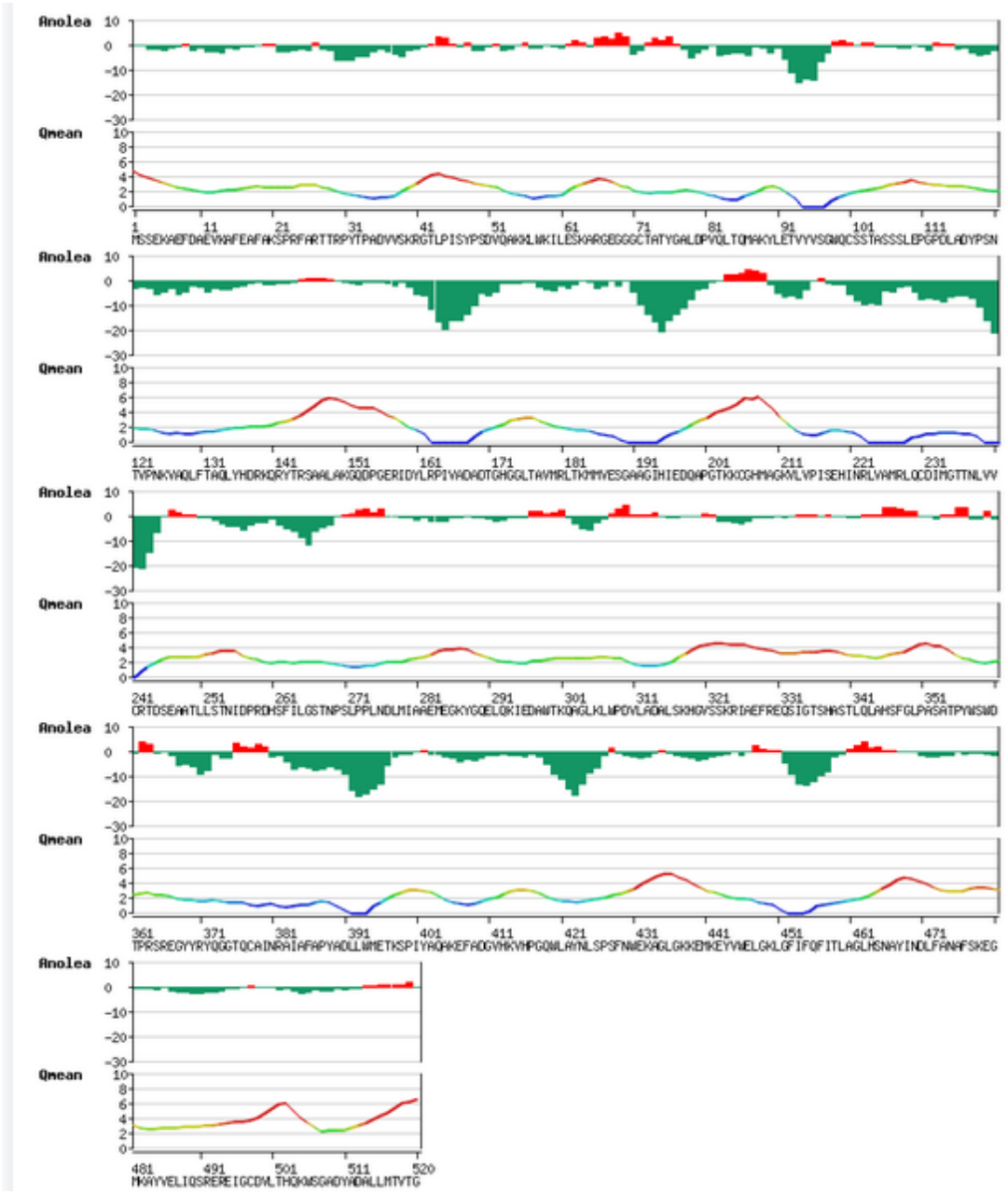


Figura 22: Gráfico de ANOLEA e QMEAN, fornecido pelo programa SWISS-MODEL.

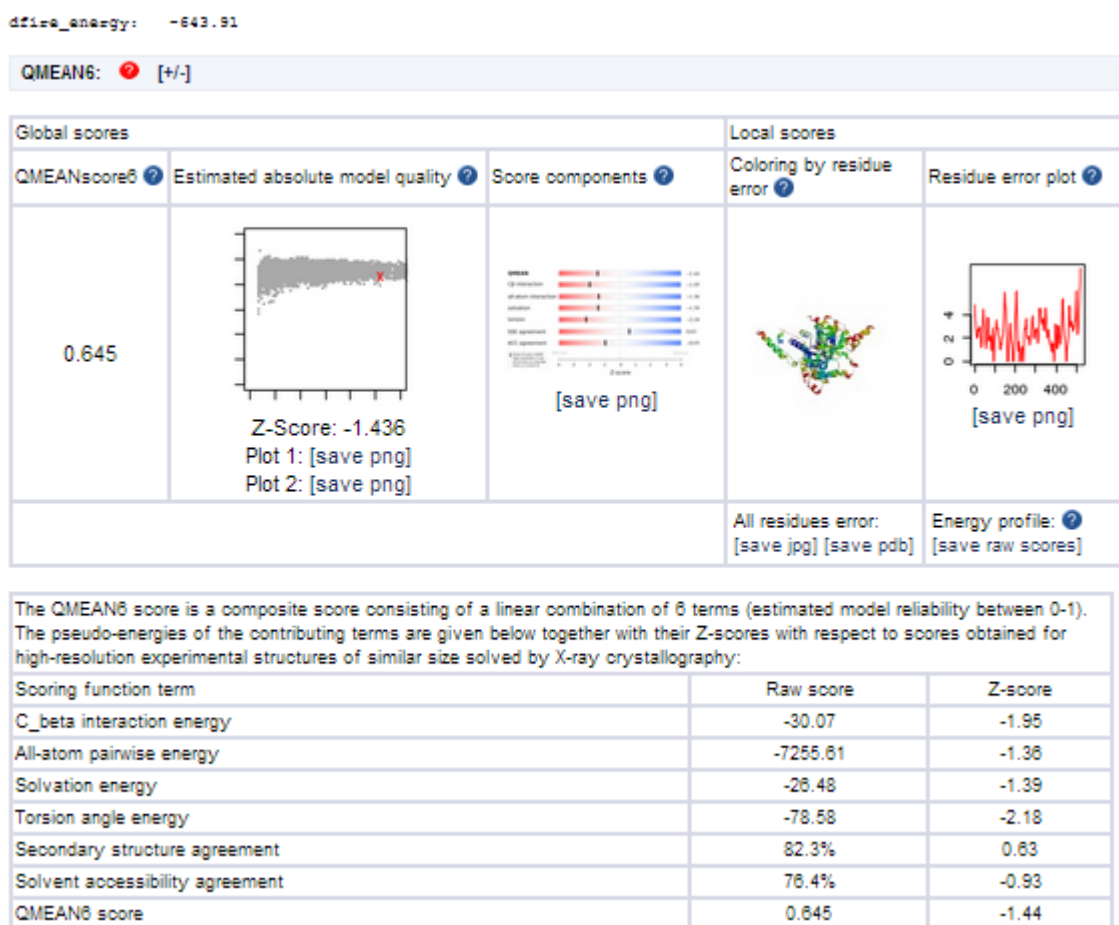


Figura 23: Resultados fornecidos do SWISS-MODEL. Valor de QMEAN e Z-score.

Poor rotamers	7	1.66%	Goal: <1%
Ramachandran outliers	8	1.54%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	502	96.72%	Goal: >98%
Cβ deviations >0.25Å	1	0.21%	Goal: 0
Bad backbone bonds:	0 / 4130	0.00%	Goal: 0%
Bad backbone angles:	73 / 5600	1.30%	Goal: <0.1%

Figura 24: Resultado fornecido pelo MOLPROBITY. Avaliação dos gráficos de Ramachandran, rotâmeros e distribuição dos ângulos.

De maneira geral, os resultados produzidos nas análises foram muito semelhantes e de boa qualidade como pode ser observado nas figuras 22, 23 e 24, sendo escolhidos os modelos que melhor satisfaziam o conjunto das análises.

5.8 *Docking* molecular

A partir dos dois modelos escolhidos na modelagem molecular, estes foram submetidos ao *docking* molecular tanto com a argenilactona como com o 3-NPA. Foram analisados os 50 melhores resultados de *docking* fornecidos pelo PatchDock de cada espécie e para cada ligante. Para a escolha foram levados em consideração a região de ligação, próxima aquela descrita por Prado e colaboradores (2014) em ICL de *P. lutzii* e a pontuação do programa. As posições de *docking* molecular que foram selecionadas para dinâmica molecular e a interação ao término da simulação estão demonstradas na figura 25.

A região de ligação do inibidor 3-NPA foi escolhida de acordo com a pontuação no programa associada com a posição da argenilactona, para comparar o padrão de ligação, interação e interferência na estrutura da molécula durante a dinâmica molecular.

5.9 *Dinâmica* molecular

Seguido da escolha dos modelos com os ligantes, partiu-se para a simulação de dinâmica molecular, verificando e comparando a estabilidade da interação. A avaliação foi comparativa entre a dinâmica da enzima sem ligante, com ligante argenilactona e com o ligante 3-NPA.

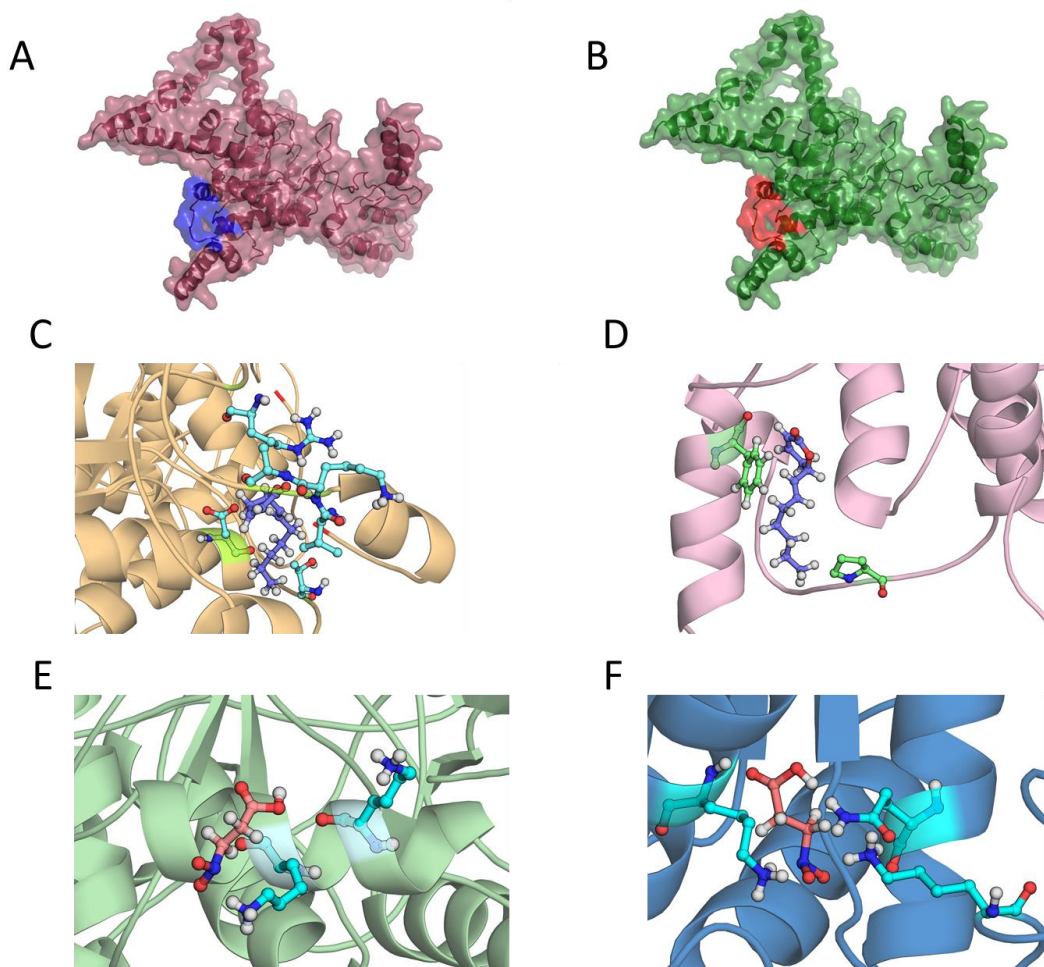


Figura 25: Representação do *docking* molecular. A) ICL de *C. gattii* em destaque (azul) região de interação selecionada no *docking* molecular. B) ICL de *C. neoformans* em destaque (vermelho) região de interação selecionada no *docking* molecular. Em destaque os aminoácidos que possuem maior interação ao longo da simulação (C, D, E e F). C) ICL de *C. gattii* (amarelo) com arginilactona (Val12, Lys13, Ala14, Arg23, Thr42, Asp231 em azul). D) ICL de *C. neoformans* (rosa) com arginilactona (Phe 18, Pro44 em azul). E) *C. gattii* (verde) com 3-NPA (Lys55, Lys58 em rosa). F) *C. neoformans* (azul) com 3-NPA (Lys39, Lys183, Gln229 em rosa).

A Figura 26 sugere uma discreta maior estabilidade da estrutura na presença dos ligantes em *C. gattii*.

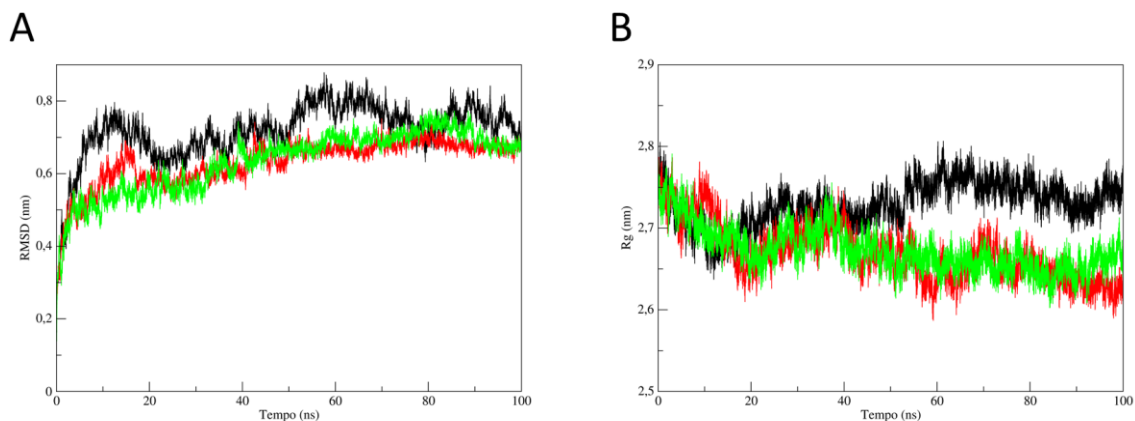


Figura 26: Análise comparativa dos gráficos de RMSD e raio de giro de *C. gattii*. Representado em preto a simulação da apoenzima, em vermelho a simulação da enzima com argentilactona e em verde a simulação da enzima com 3-NPA. A) Avaliação do RMSD – desvio médio quadrático. B) Avaliação do raio de giro.

Em *C. neoformans*, o RMSD mostra uma flexibilidade maior da estrutura, mesmo com a presença dos ligantes, o que pode ser justificado ao analisar a ligação mais instável dos ligantes com a *ICL*, em comparação com *C. gattii*, mostrados a seguir nas tabelas 2 e 3. Este resultado vem de encontro ao gerado na análise de desenvolvimento em meio com acetato, que mostrou que a presença de argentilactona diminui mais drasticamente o desenvolvimento de *C. gattii* do que *C. neoformans*, o que pode sugerir que a ligação da argentilactona com a *ICL* é mais forte em *C. gattii*.

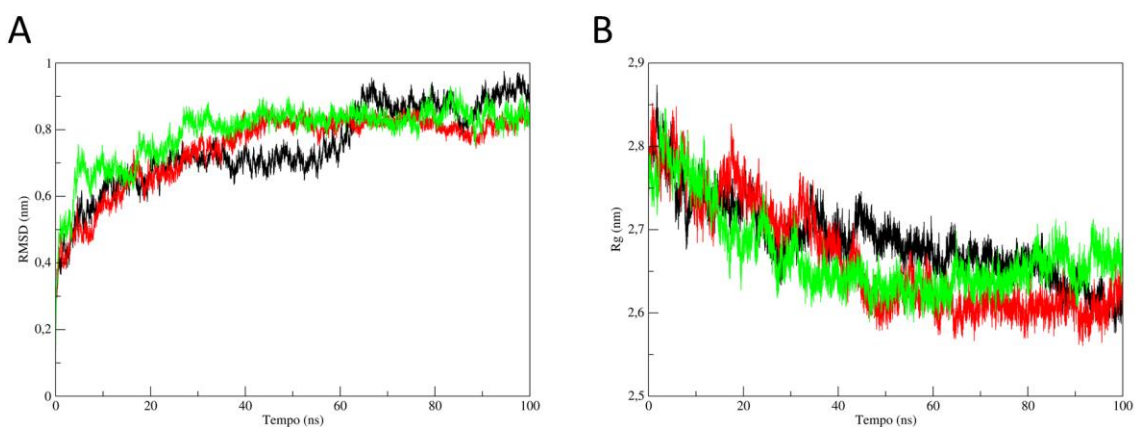


Figura 27: Análise comparativa dos gráficos de RMSD e raio de giro de *C. neoformans*. Representado em preto a simulação da enzima, em vermelho a simulação da enzima com

argentilactona e em verde a simulação da enzima com 3-NPA. A) Avaliação do RMSD – desvio médio quadrático. B) Avaliação do raio de giro.

O raio de giro de *C. neoformans* praticamente não sofre alteração na presença dos ligantes em relação a enzima sozinha, porém em todos os casos as simulações de *C. neoformans* mostram-se mais compactas do que em *C. gattii*. Esta diferença de compactação pode levar a uma alteração na funcionalidade da enzima.

Para analisar quais os aminoácidos envolvidos na interação dos ligantes com a enzima durante a simulação foi utilizado o programa LigPlot 4.5.3 (Laskowski e Swindells, 2011), os resultados obtidos no programa estão demonstrados nas tabelas 2 para argentilactona e 3 para 3-NPA.

Tabela 2: Interação de aminoácidos de *C. gattii* (preto) e *C. neoformans* (vermelho) com argentilactona durante a simulação. Os símbolos indicam o = ligação hidrofóbica e i = ligação hidrofílica.

Aa/tempo	00ns	20ns	40ns	60ns	80ns	100ns
Met1					o	
Glu11	o	o	o	o	o	o / o
Val12			o	o	o	o
Lys13			i	i	i	i
Ala14		o	i / o	i	i	i
Phe15		o		o		o
Phe18			o	o		o
Arg23			o	o	o	i
Phe24						o
Tyr31			o	o		o / o
Val36				o	o	o
Arg40	o	o				
Gly41		i				
Thr42	o	o	o	o	o	o
Leu43	o	o / o				
Pro44	o	o	o / o	o	o	o
Ile45	o		o			o
Ser46	i					
Tyr47	i					
Asp50	o					
Asp231		o	o	o	o	o / o
Ile232	o			o		o / o
Met233	o					
Gly234	o / o	o	o / o			
Thr235				o		
Thr236		o		o		

Tabela 3: Interação de aminoácidos de *C. gattii* (preto) e *C. neoformans* (vermelho) com 3-NPA durante a simulação. Os símbolos indicam o = ligação hidrofóbica e i = ligação hidrofílica.

Aa/tempo	00ns	20ns	40ns	60ns	80ns	100ns
Lys13	i					
Ala14	i					
Phe15	i					
Lys39		o	i	o	o	o
Arg40	o					
Gly41			i			
Pro44	o					
Ser46	o / o					
Asp50	o					
Lys54	i					
Lys55		o	o	o		
Lys58		o	o	o		o
Ile59		o	o	o		o
Met179				o		o
Arg180					o	o
Lys183		o	o		i	o
Ala225				o	i	
Gln229		o	i	o		o
Asp231				o		o
Ile232		o	o			o
Met233		o				
Gly234	o / o					
Thr235	o					
Thr236	o					

A tabela 2 mostra que a ligação da arginilactona com a enzima é dada de forma mais constante em *C. gattii*, possuindo inclusive ligações de hidrogênio da Lys13 e Ala14, que se fixam após 40 ns. Ao analisar o gráfico de raio de giro, podemos identificar uma estabilidade no enovelamento após este mesmo tempo. Já em *C. neoformans*, as ligações ficam oscilando entre aminoácidos, apenas em ligações hidrofóbicas, que também aparecem em *C. gattii*, os principais resíduos envolvidos nestas interações em *C. neoformans* são Phe18 e Pro44.

Na tabela 3, pode-se ver uma menor estabilidade de ligação. Apesar do 3-NPA permanecer em uma região similar durante a simulação em *C. gattii*, aos 80 ns não apresenta interação com os aminoácidos apenas com água, porém em 100 ns retorna a interagir com basicamente os mesmos resíduos (Lys55, Ly58 e Ile59) por ligações hidrofóbicas, distanciando-se da região inicial. Já em *C. neoformans*, vemos uma oscilação maior entre os

aminoácidos, os que possuem maior interação com o inibidor ao longo da dinâmica são Lys39 e Lys183. Mostrando uma grande diferença de interação com os ligantes e entre as espécies.

Com a similaridade entre as enzimas, as interações dos aminoácidos descritos por Prado et al., 2014 em *P. lutzii* Lys47, Asn53 e Gly235 foram conservadas na dinâmica desenvolvida para *Cryptococcus spp.* ao longo do 20 ns avaliados pelo grupo, porém se perdem durante o restante do tempo da dinâmica. Em *Cryptococcus spp.* estes aminoácidos seriam equivalentes a Asp50 e Gly234, na posição da Lys47 há uma troca de aminoácido em *Cryptococcus* por uma Prolina (Pro44), que mantém a interação ao longo das simulações embora possua características polares diferentes.

Com relação às energias entre as proteínas e os ligantes estudados nos sistemas, observou-se que, o 3-NPA possui uma energia de ligação com a ICL menor. Porém com uma variação muito maior. Enquanto isso, a argetilactona embora tenha uma energia de ligação de maior, a mesma tem uma oscilação menor durante a simulação mantendo-se mais estável. Entretanto nas ligações com a argetilactona observa-se uma energia consideravelmente mais favorável na ligação do ICL de *C. gattii* em relação à ICL de *C. neoformans*, mostrando que esta espécie é possivelmente mais afetada durante a interação.

Tabela 4: Tabela de energia das proteínas com os ligantes.

	<i>C. gattii</i>		<i>C. neoformans</i>	
	Energia (J)	Desvio-padrão	Energia (J)	Desvio-padrão
Argetilactona	-145,7	31,7	-90,7	22,2
3-NPA	-169,1	36,5	-201,2	58,3

Tendo em vista as análises de energia segue-se para a avaliação da posição dos aminoácidos ao longo da simulação, produzido pelo gráfico de RMSF.

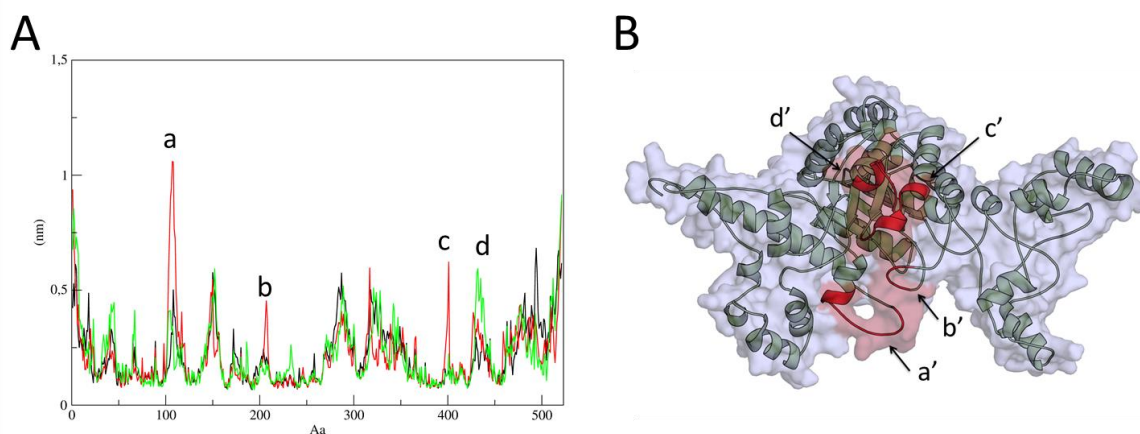


Figura 28: Gráfico de RMSF e ICL de *C. gattii*. A) RMSF representado em preto a simulação da enzima, em vermelho a simulação da enzima com arginilactona e em verde a simulação da enzima com 3-NPA. B) Proteína ICL de *C. gattii* demonstrando as regiões de oscilação indicadas no gráfico

O gráfico demonstra regiões de maior flexibilidade da simulação com arginilactona como a região dos aminoácidos 102-113 (a), 203-208 (b), que são regiões de alças que no sistema com arginilactona tornam-se mais flexíveis e 401 (c), além de uma região na qual há uma maior flexibilidade na simulação com 3-NPA, mas que também há um aumento na simulação com arginilactona comparada à simulação sem ligante, região dos resíduos 426-442 (d), nesta região podemos verificar uma desestruturação leve de parte uma hélice no decorrer da trajetória (Figura 30). As regiões citadas estão destacadas na figura 28B. Nenhuma destas regiões possui aminoácidos envolvidos nas interações proteína-ligante.

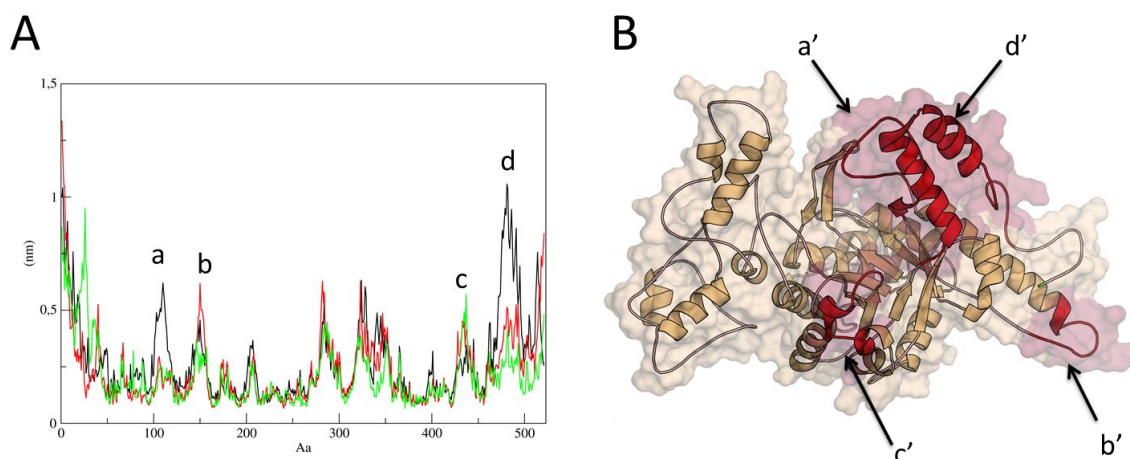


Figura 29: Gráfico de RMSF e ICL de *C. neoformans*. A) RMSF representado em preto a simulação da enzima, em vermelho a simulação da enzima com argenticlactona e em verde a simulação da enzima com 3-NPA. B) Proteína ICL de *C. neoformans* demonstrando as regiões de oscilação indicadas no gráfico.

O gráfico demonstra regiões de maior flexibilidade da simulação sem ligante, pois não conserva a hélice na ausência de ligante na região dos aminoácidos 97-120 (a) e formação de uma hélice contínua no local que havia uma alça intercalada na região de aminoácidos 459-508 (d). Além uma região na qual há uma maior flexibilidade na simulação com ligantes, região dos resíduos 425-439 (c), devido à formação de uma alça no local de uma hélice. Na região 143-156 (b) visualizamos uma flexibilidade maior na simulação com argenticlactona, possuindo menor oscilação na simulação com 3-NPA, região de alça que na presença do 3-NPA permanece mais estável. As regiões citadas estão destacadas na figura 29B e não estão envolvidas na ligação com os ligantes.

Para melhor avaliar estas regiões mais flexíveis foram gerados gráficos para analisar o comportamento da estrutura secundária, além da análise de estruturas secundárias durante as simulações através do algoritmo DSSP no Procheck (Laskowski et al., 1993) obtido pela análise das estruturas iniciais e finais no PDBsum (Laskowski, 2009).

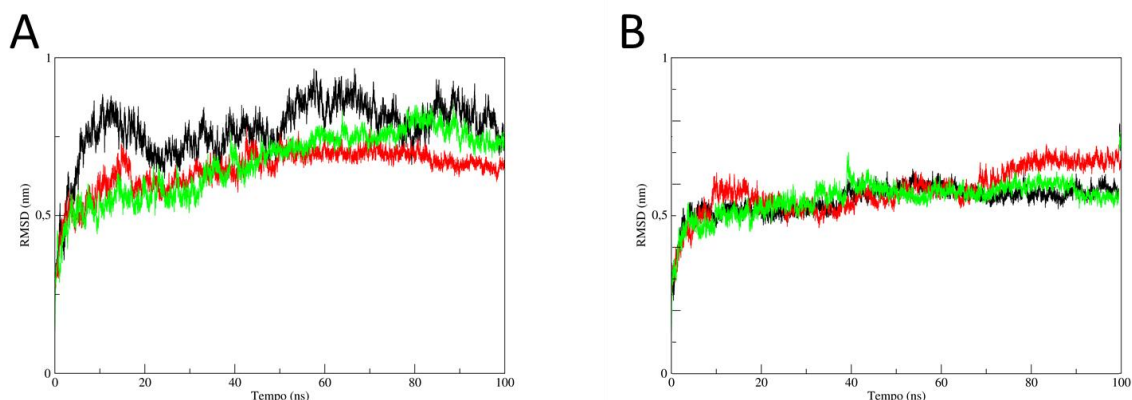


Figura 30: Gráfico de RSMD da estrutura secundária da ICL de *C. gattii*. Representando em preto a proteína sem ligante, em vermelho a proteína com arginilactona e em verde a proteína com 3-NPA. A) Estrutura secundária de α -hélices e β -folhas. B) Estrutura de alças.

Como visto no gráfico 28, as regiões de maior oscilação em ICL de *C. gattii* são caracterizadas por alças, o que podemos confirmar com o gráfico demonstrado na Figura 30B, uma grande flexibilidade das estruturas de alça na presença de arginilactona, conforme ilustrado na Figura 28 (a, b e c), na qual as alças em *C. gattii* na presença de arginilactona são mais flexíveis. Porém também podemos verificar estabilidade da estrutura secundária em todas as simulações. Cabendo ressaltar que os aminoácidos que interagem com a arginilactona de forma hidrofílica na simulação, demonstrado na tabela 2, apresentavam estrutura secundária no início da simulação que foi perdida durante a mesma, o que não acontece em *C. neoformans*, que mantém a hélice conforme modelo inicial (Figura 31 e 33).

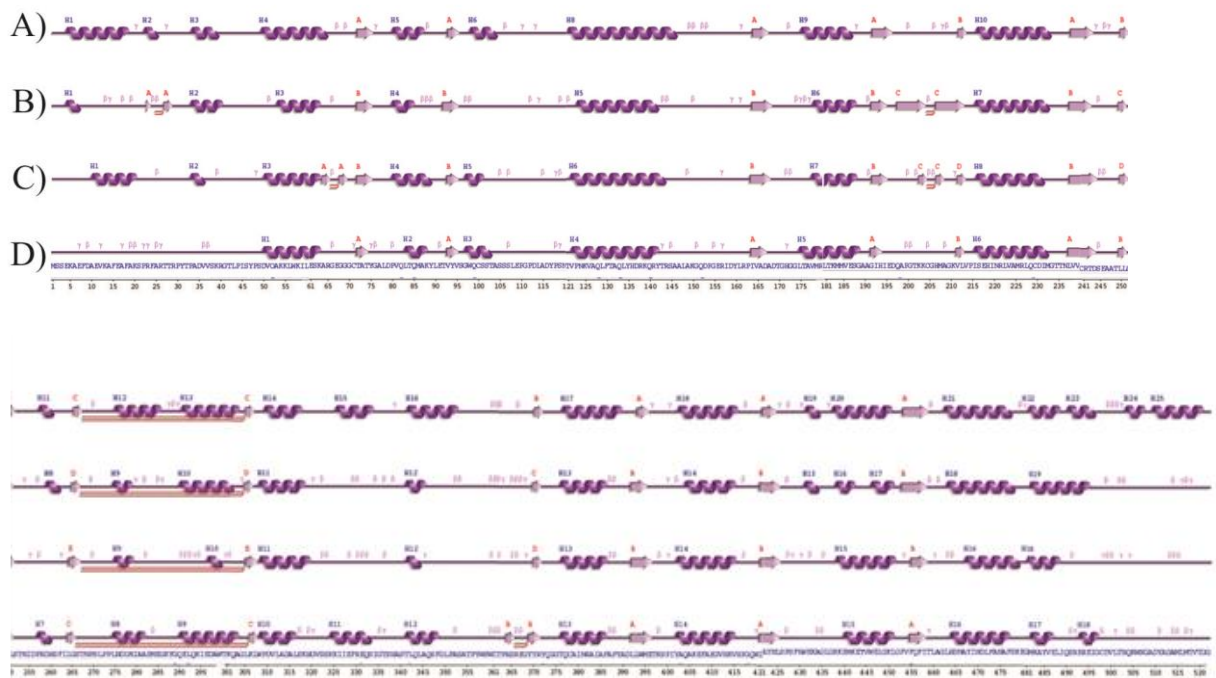


Figura 33: Estrutura secundária ICL de *C. neoformans*. A) Modelo da proteína obtido na modelagem. B) Proteína após simulação. C) Proteína simulada com arginilactona. D) Proteína simulada com 3-NPA.

Apesar da grande similaridade entre as sequências das espécies de *C. gattii* e *C. neoformans*, conforme demonstrado na Figura 34, podemos identificar importantes diferenças no comportamento da enzima *in silico*, seja na presença ou ausência do ligante, diferenças também visualizadas *in vitro*. Isto nos leva a crer que podem haver divergências na funcionalidade da enzima entre as espécies. Como não há estudos prévios com ICL de *C. gattii*, estes resultados podem trazer interesse na investigação desta enzima.

	10	20	30	40	50	60
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	MSSEKAEFD	AEVKA	FEAF	AKSP	RFART	TRPYTPAD
<i>C.neoformans</i>	MSSEKAEFD	AEVKA	FEAF	AKSP	RFART	TRPYTPAD
	VSVKRGTLPISYPSDVQAKKLWKIL					

	70	80	90	100	110	120
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	ESKARGEGGG	CTATY	GALDPV	QLTQ	MAKYLE	TVYVSGW
<i>C.neoformans</i>	ESKARGEGGG	CTATY	GALDPV	QLTQ	MAKYLE	TVYVSGW
	QCSSTASSSLEPGDLADYPSN					

	130	140	150	160	170	180
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	TVPNKVAQL	FTAQLY	HDRKQ	RYTR	SAALAK	QDPGERI
<i>C.neoformans</i>	TVPNKVAQL	FTAQLY	HDRKQ	RYTR	SAALAK	QDPGERI
	DYLRPIVADADTGHGGLTAVMR					

	190	200	210	220	230	240
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	LTKMMVES	GAAGI	HIEDQ	APGTT	KKCGH	MAGKVL
<i>C.neoformans</i>	LTKMMVES	GAAGI	HIEDQ	APGTT	KKCGH	MAGKVL
	VPISEHINRLVAMRLQCDIMGTTNLVV					

	250	260	270	280	290	300
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	CRTDSEA	ATLLS	TNIDP	RHDS	FILG	STNPSL
<i>C.neoformans</i>	CRTDSEA	ATLLS	TNIDP	RHDS	FILG	STNPSL
	PPLNNDLMIAAEMEGKYQELQKIEDAWTK					

	310	320	330	340	350	360
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	QAGLKLW	PDVL	ADALS	KHGV	SVKRI	AEFRE
<i>C.neoformans</i>	QAGLKLW	PDVL	ADALS	KHGV	SVKRI	AEFRE
	QSIGTSHASTLQLAHSFGLPASATPYWSWD					

	370	380	390	400	410	420
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	TPRSREG	YRYQ	GGTQ	CAIN	RAIA	FAPYAD
<i>C.neoformans</i>	TPRSREG	YRYQ	GGTQ	CAIN	RAIA	FAPYAD
	LLWMETKSPIYAQAKEFADGVHKVHPGQWL					

	430	440	450	460	470	480
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	AYNLS	SPSF	NWEK	AGL	GKKE	MKEYV
<i>C.neoformans</i>	AYNLS	SPSF	NWEK	AGL	GKKE	MKEYV
	WELGKLGFIQFITLAGLHSNAYINDLFANAFSKEG					

	490	500	510	520	530	540
<i>C.gattii</i>						
<i>C.gattii</i>	MKAYVELI	QSRERE	IGCD	VLTH	QKWS	GADYAD
<i>C.neoformans</i>	MKAYVELI	QSRERE	IGCD	VLTH	QKWS	GADYAD
	AMLMTVTGGVSSTAAMGKGV TENQFVDD					

	550					
<i>C.gattii</i>	KTKD	V	LHKL			
<i>C.neoformans</i>	KTKD	A	LHKL			

Figura 34: Alinhamento de *C. gattii* e *C. neoformans*. Apresentando identidade de 98,72% e similaridade de 1,09%, com cobertura de 100%.

Apesar da grande identidade entre as sequências, podemos visualizar uma alteração na estrutura das proteínas durante a dinâmica, visto no raio de giro (Figuras 26B e 27B), e que pode ser visto mais facilmente na Figura 35. Isto pode justificar as diferenças de ação do inibidor arginilactona em ambas as espécies de *Cryptococcus*.

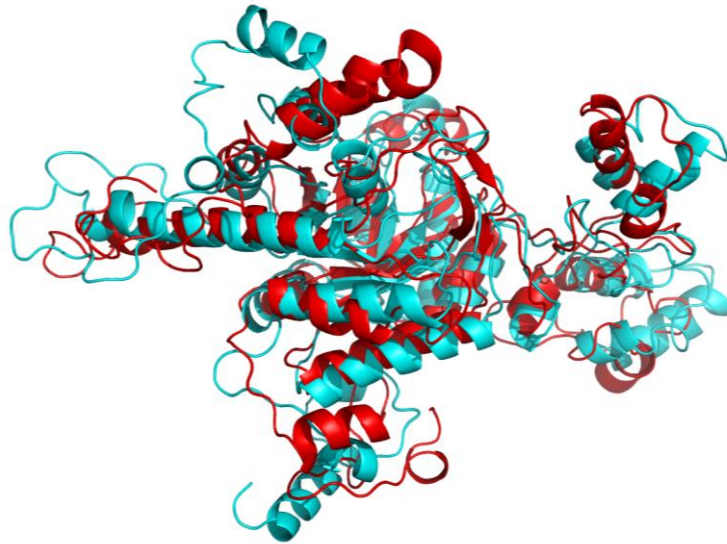


Figura 35: Imagens das estruturas sobrepostas de *C. gattii* e *C. neoformans* após a dinâmica de 100ns. ICL de *C. gattii* em azul, ICL de *C. neoformans* em vermelho.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho se demonstram promissores, pois apesar da literatura não apontar a ICL de *C. neoformans* como uma candidata a proteína-alvo para fármacos, não havia estudos em *C. gattii*. Na ausência de maiores informações sobre a ICL de *C. gattii*, os resultados apontaram um comportamento diferente entre as enzimas.

Nos testes *in vitro* na presença de argenilactona, obtivemos uma CIM em baixas concentrações da molécula, no qual a inibição foi mais acentuada em *C. gattii*. Também verificamos que há uma inibição na formação de cápsula, que pode estar relacionado com a deficiência na formação da parede celular, comportamento já apontado em *P. lutzii* (Prado et al., 2014). Pelo fato de *C. gattii* apresentar uma cápsula mais densa, podemos identificar uma forma mais acentuada da inibição esta espécie. No entanto, mais investigações devem ser feitas para avaliar esta inibição, como análise por microscopia de fluorescência, verificando assim, a presença e formato de parede celular e cápsula polissacarídica.

Além disto, podemos ver uma redução durante o desenvolvimento à 37 °C mais acentuada em *C. neoformans*, porém como já descrito por Rude et al., 2002, a ICL desta espécie apresenta uma redução da expressão nesta condição, assim a análise do padrão proteômico poderá trazer melhores informações sobre outras rotas afetadas no desenvolvimento à 37 °C. Já na produção de melanina não identificamos alterações na presença de argenilactona, o que indica que não houve interferência desta rota.

Outro dado obtido *in vitro* foi o desenvolvimento em diferentes fontes de carbono, além de glicose, em acetato que é precursor do ciclo do glioxilato, substrato da ICL. Vimos que a adição de argenilactona afeta mais o desenvolvimento em *C. gattii* do que em *C. neoformans*. Resultado também visto nas simulações *in silico*, durante a dinâmica molecular identificamos uma ligação mais estável da argenilactona em *C. gattii* do que em *C. neoformans*. Além disto, a estrutura mais compacta da ICL de *C. neoformans* demonstrada pelo raio de giro, sugere uma arcabouço estrutural diferente das enzimas entre as espécies, também verificada pela análise da estrutura secundária levemente diferente, na ausência de ligantes ou na presença de 3-NPA e argenilactona que apresenta em *C. gattii* uma maior flexibilidade em regiões de alças e voltas.

Embora a ICL das duas espécies tenham sequências muito semelhantes, as pequenas alterações levam-nas a comportamentos estruturais diferentes, o que pode indicar uma diversidade de função entre as enzimas.

Os aminoácidos envolvidos na interação da ICL de *P. lutzii* avaliados por Prado et al. (2014) durante 20 ns de dinâmica molecular, foram reproduzidos nas ligações da arginilactona durante este mesmo período, porém ao longo do restante de tempo das dinâmicas há um afastamento desta região. Este resultado pode ser devido ao acomodamento da estrutura na enzima ao longo do tempo que influenciou no posicionamento do ligante. Apesar disto, ele permaneceu próximo a esta região de forma estável, principalmente em *C. gattii* desenvolvendo novas interações ao longo da dinâmica, destacando-se os aminoácidos Lys13 e Ala14, devido as ligações hidrofílicas que surgiram devido a desestruturação de uma hélice nesta região, o que acontece apenas em *C. gattii*. As dinâmicas moleculares foram alongadas até atingirem uma maior estabilidade nas simulações.

Na ligação com o inibidor, vimos uma menor estabilidade de ligação, talvez devido seu tamanho reduzido, pequenas alterações na conformação da enzima já afetam nas interações feitas pelo 3-NPA, sendo modificado em cada ICL de cada espécie.

De maneira geral, podemos ver que a priori ICL de *C. gattii* possui várias diferenças estruturais comparado a *C. neoformans*, e sua aplicabilidade como potencial proteína-alvo para novos fármacos pode ser estudado na presença de arginilactona. Um teste preliminar que poderia contribuir com esta análise, a avaliação da fagocitose de macrófagos em *C. gattii* na presença da molécula, pois o mutante nulo de ICL de *C. neoformans* não sofreu alteração nesta condição, porém se o comportamento da ICL de *C. gattii* for diferente de *C. neoformans*, haverá um aumento das células fagocitadas e degradadas pelo macrófago. Assim, novas investigações são necessárias para melhor identificar o potencial desta como antifúngico para o tratamento de *C. gattii*.

7 BIBLIOGRAFIA

AHN, C. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Inhibition of *Candida albicans* isocitrate lyase activity by cadiolides and synoilides from the ascidian *Synoicum* sp . **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 14, p. 4099–4101, 2013.

ARAÚJO, F. S. **Efeitos da argenilactona sobre o perfil transcricional, parede celular e estress oxidativo de *Paracoccidioides* spp.** [s.l: s.n.].

BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 5, p. 459–469, 2009.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987.

BIASINI, M. et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 252–258, 2014.

BRITTON, K. et al. The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans*. **Structure (London, England : 1993)**, v. 8, n. 4, p. 349–362, 2000.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: American Society for Microbiology. 1998.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, ago. 2000.

CHANG, Y. C. Isolation of the Third Capsule-Associated Gene , CAP60 , Required for Virulence in *Cryptococcus neoformans* Isolation of the Third Capsule-Associated Gene , CAP60 , Required for Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2230–2236, 1998.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 18, p. 5636–5643, 1999.

CHANG, Y. C.; PENOYER, L. A.; KWON-CHUNG, K. J. The second capsule gene of *Cryptococcus neoformans*, CAP64, is essential for virulence. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 1977–1983, 1996.

CHEAH, H.; LIM, V.; SANDAI, D. Inhibitors of the Glyoxylate Cycle Enzyme ICL1 in *Candida albicans* for Potential Use as Antifungal Agents. v. 9, n. 4, 2014.

CHEN, Y. et al. Calcineurin Governs Thermotolerance and Virulence of *Cryptococcus gattii*. **G3**, v. 3, n. March, p. 527–539, 2013.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* : An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, 2013.

DATTA, K. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. **SYNOPSIS**, v. 15, n. 8, p. 1185–1191, 2009.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; MARR, K. A. *Cryptococcus gattii* : Emergence in Western North America : Exploitation of a Novel Ecological Niche. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, 2009.

DAVIS, I. W. et al. MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 375–383, 2007.

DUIN, D. VAN; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, 2012.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var . *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642–1644, 1990.

ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current protocols in Bioinformatics**, v. UNIT 5.6, p. 5.6.1–5.6.30, 2006.

FATIMA, A. DE et al. Enantioselective syntheses of (R)- and (S)-argentilactone and their cytotoxic activities against cancer cell lines. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 20, p. 5437–42, 15 out. 2004.

FEDER, V. et al. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. **FEBS Journal**, v. 282, n. 8, p. 1406–1418, 2015.

FISER, A; DO, R. K. G.; SALI, A. Modelling of loops in protein structures. **Protein Science**, v. 9, p. 1753–1773, 2000.

GONTIJO, F. A. DE et al. The role of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 70, p. 12–23, set. 2014.

GORDON, M. S.; SCHMIDT, M. W. Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later. **Theory and Applications of Computational Chemistry**, p. 1167–1189, 2005.

GROOT, B. L. DE; GRUBMÜLLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5550, p. 2353–2357, 2001.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, p. 1–17, 2012.

HAUTZEL, R.; ANKE, H.; SHELDRIK, W. S. Mycenon, a new metabolite from a *Mycena* species TA 87202 (basidiomycetes) as an inhibitor of isocitrate lyase. **The Journal of antibiotics**, v. 43, n. 10, p. 1240–1244, 1990.

HUMPHEY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33–38, 1996.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004.

KORNBERG, H. L.; MADSEN, N. B. The metabolism of C₂ compounds in microorganisms. **Biochemical Journal**, v. 68, n. 3, p. 535–542, 1957.

KOZIARA, K. B. et al. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: Prediction of hydration free enthalpies. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 28, n. 3, p. 221–233, 2014.

KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J. Advances in mycobacterial isocitrate lyase targeting and inhibitors. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 36, p. 6126–37, 2012.

KRAUS, P. R.; NICHOLS, C. B.; HEITMAN, J. Calcium- and Calcineurin-Independent Roles for Calmodulin in *Cryptococcus neoformans* Morphogenesis and High-Temperature Growth †. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 6, p. 1079–1087, 2005.

KRONSTAD, J. et al. Adaptation of *Cryptococcus neoformans* to Mammalian Hosts: Integrated Regulation of Metabolism and Virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 2, p. 109–118, 2012.

KRONSTAD, J.; JUNG, W. H.; HU, G. Beyond the big three: systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 4, p. 308–10, 16 out. 2008.

KUNZE, M. et al. A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1763, n. 12, p. 1441–52, dez. 2006.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Tremellomycetidae). **TAXON**, v. 51, n. 4, p. 804–806, 2002.

LANJEWAR, D. N. The Spectrum of Clinical and Pathological Manifestations of AIDS in a Consecutive Series of 236 Autopsied Cases in Mumbai, India. **Pathology Research International**, v. 2011, p. 12–29, 2011.

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

LASKOWSKI, R. A. PDBsum new things. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 355–359, 2009.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 105, p. 60:69, 2006.

LIU, L. et al. Laccase Protects *Cryptococcus neoformans* from Antifungal Activity of Alveolar Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6034–6039, 1999.

LIU, T.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3:2, p. 173–181, 2012.

LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 83–86, 5 jul. 2001.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Advances in applied microbiology**, v. 67, p. 131–90, jan. 2009.

MARTÍ-RENOM, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 291–325, 2000.

MCCUSKER, J. H. et al. *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42°C and form pseudohyphae. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5447–5455, 1994.

MELO, F.; FEYTMANS, E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. **Journal of molecular biology**, v. 277, n. 5, p. 1141–52, 17 abr. 1998.

MO, Y.; SONG, L.; LIN, Y. Block-localized wavefunction (BLW) method at the density functional theory (DFT) level. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 34, p. 8291–8301, 2007.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. **mBio**, v. 3, n. 3, p. 1–9, 2012.

NOGALES, J. et al. Functional analysis and regulation of the malate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta**, v. 219, n. 2, p. 325–331, 2004.

O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, jun. 2003.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 15 maio 1997.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV / AIDS. **AIDS**, v. 23, n. November 2008, p. 525–530, 2009.

POETA, M. DEL; CASADEVALL, A. NIH Public Access. **Mycopathologia**, v. 173, n. 0, p. 303–310, 2012.

POGER, D.; GUNSTEREN, W. F. VAN; MARK, A. E. A new force field for simulating phosphatidylcholine bilayers. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 16, p. 1117–1125, 2010.

POSTERARO, B. et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 357–371, 2003.

PRADO, R. S. et al. Inhibition of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 isocitrate lyase by the natural compound argentilactone and its semi-synthetic derivatives. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2014.

RIVERA, J. et al. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 10, p. 5027–5030, 1998.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 293–301, 1999.

RUDE, T. H. et al. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5684–5694, 2002.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779–815, 1993.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, fev. 2002.

SCHLOSS, J. V; CLELAND, W. W. Inhibition of isocitrate lyase by 3-nitropropionate, a reaction-intermediate analogue. **Biochemistry**, v. 21, n. 18, p. 4420–4427, 1982.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 363–367, 2005.

SCHRÖDINGER, L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4**, 2012.

SHARMA, V. et al. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature structural biology**, v. 7, n. 8, p. 663–668, 2000.

SPOEL, D. VAN DER et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TUSZYNSKI, J. A. et al. Mathematical and computational modeling in biology at multiple scales. **BioMed Central**, v. 11, p. 1–42, 2014.

UMEMURA, K. et al. Derepression of gene expression mediated by the 5' upstream region of the isocitrate lyase gene of *Candida tropicalis* is controlled by two distinct regulatory pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 243, n. 3, p. 748–752, 1997.

VERES, G. et al. Central nervous system-specific alterations in the tryptophan metabolism in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 132, p. 115–124, 13 mar. 2015.

VERLI, H.; GUIMARÃES, J. A. Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 281–290, jan. 2004.

VERMES, A; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 2000.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Farmacos e fitoterapicos: A necessidade do desenvolvimento da industria de fitoterapicos e fitofarmacos no Brasil. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 147–152, 2001.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 68, p. 133–216, jan. 2009.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological procedures online**, v. 6, n. 1, p. 10–15, 2004.

8 APÊNDICE 1

Topologia das moléculas estudadas:

```
[ moleculetype ]
; Name      nrexcl
ARG         3

[ atoms ]
;  nr      type      resnr      resid      atom      cgnr      charge      mass
total_charge
   1       HC      522       ARG        H2         1         0.066       1.0080
   2        C      522       ARG        C1         1        -0.290      12.0110
   3       HC      522       ARG        H1         1         0.066       1.0080
   4       HC      522       ARG        H3         1         0.066       1.0080
   5        C      522       ARG        C2         1         0.233      12.0110
   6       HC      522       ARG        H4         1        -0.038      1.0080
   7       HC      522       ARG        H5         1        -0.038      1.0080
   8        C      522       ARG        C3         1        -0.097      12.0110
   9       HC      522       ARG        H6         1         0.016       1.0080
  10       HC      522       ARG         H7         1         0.016       1.0080      ;
0.000
  11        C      522       ARG        C4         2         0.020      12.0110
  12       HC      522       ARG        H8         2        -0.010      1.0080
  13       HC      522       ARG         H9         2        -0.010      1.0080      ;
0.000
  14        C      522       ARG        C5         3         0.166      12.0110
  15       HC      522       ARG       H10         3        -0.004      1.0080
  16       HC      522       ARG       H11         3        -0.004      1.0080
  17        C      522       ARG        C6         3        -0.151      12.0110
  18       HC      522       ARG       H12         3         0.156      1.0080
  19        C      522       ARG        C7         3        -0.376      12.0110
  20       HC      522       ARG       H13         3         0.213      1.0080      ;
0.000
  21        C      522       ARG        C8         4         0.490      12.0110
  22       HC      522       ARG       H18         4         0.003      1.0080
  23       OE      522       ARG         O1         4        -0.493     15.9994      ;
0.000
  24        C      522       ARG        C9         5        -0.217      12.0110
  25       HC      522       ARG       H14         5         0.090      1.0080
  26       HC      522       ARG       H15         5         0.090      1.0080
  27        C      522       ARG       C10         5        -0.001      12.0110
  28       HC      522       ARG       H16         5         0.098      1.0080      ;
0.060
  29        C      522       ARG       C11         6        -0.482      12.0110
  30       HC      522       ARG       H17         6         0.193      1.0080
  31        C      522       ARG       C12         6         0.832      12.0110
```



```

32      0  522      ARG      O2      6      -0.603  15.9994      ;
-0.060
; total charge of the molecule:  -0.000
[ bonds ]
; ai  aj  funct    c0      c1
  1   2    2   0.1100   1.2100e+07
  2   3    2   0.1100   1.2100e+07
  2   4    2   0.1100   1.2100e+07
  2   5    2   0.1530   7.1500e+06
  5   6    2   0.1100   1.2100e+07
  5   7    2   0.1100   1.2100e+07
  5   8    2   0.1530   7.1500e+06
  8   9    2   0.1100   1.2100e+07
  8  10    2   0.1100   1.2100e+07
  8  11    2   0.1530   7.1500e+06
 11  12    2   0.1100   1.2100e+07
 11  13    2   0.1100   1.2100e+07
 11  14    2   0.1530   7.1500e+06
 14  15    2   0.1100   1.2100e+07
 14  16    2   0.1100   1.2100e+07
 14  17    2   0.1520   5.4300e+06
 17  18    2   0.1090   1.2300e+07
 17  19    2   0.1330   1.1800e+07
 19  20    2   0.1090   1.2300e+07
 19  21    2   0.1520   5.4300e+06
 21  22    2   0.1100   1.2100e+07
 21  23    2   0.1435   6.1000e+06
 21  24    2   0.1530   7.1500e+06
 23  31    2   0.1360   1.0200e+07
 24  25    2   0.1100   1.2100e+07
 24  26    2   0.1100   1.2100e+07
 24  27    2   0.1520   5.4300e+06
 27  28    2   0.1090   1.2300e+07
 27  29    2   0.1330   1.1800e+07
 29  30    2   0.1090   1.2300e+07
 29  31    2   0.1480   5.7300e+06
 31  32    2   0.1230   1.6600e+07
[ pairs ]
; ai  aj  funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in
GROMOS itp
  1   6    1
  1   7    1
  1   8    1
  2   9    1
  2  10    1
  2  11    1
  3   6    1
  3   7    1
  3   8    1
  4   6    1

```

4	7	1
4	8	1
5	12	1
5	13	1
5	14	1
6	9	1
6	10	1
6	11	1
7	9	1
7	10	1
7	11	1
8	15	1
8	16	1
8	17	1
9	12	1
9	13	1
9	14	1
10	12	1
10	13	1
10	14	1
11	18	1
11	19	1
12	15	1
12	16	1
12	17	1
13	15	1
13	16	1
13	17	1
14	20	1
14	21	1
15	18	1
15	19	1
16	18	1
16	19	1
17	22	1
17	23	1
17	24	1
18	20	1
18	21	1
19	25	1
19	26	1
19	27	1
19	31	1
20	22	1
20	23	1
20	24	1
21	28	1
21	29	1
21	32	1
22	25	1

22	26	1			
22	27	1			
22	31	1			
23	25	1			
23	26	1			
23	27	1			
23	30	1			
24	30	1			
24	31	1			
25	28	1			
25	29	1			
26	28	1			
26	29	1			
27	32	1			
28	30	1			
28	31	1			
30	32	1			
[angles]					
;	ai	aj	ak	funct	angle
	1	2	3	2	103.00
	1	2	4	2	107.60
	1	2	5	2	111.00
	3	2	4	2	108.53
	3	2	5	2	111.30
	4	2	5	2	111.00
	2	5	6	2	109.50
	2	5	7	2	109.50
	2	5	8	2	111.00
	6	5	7	2	106.75
	6	5	8	2	109.50
	7	5	8	2	106.00
	5	8	9	2	108.00
	5	8	10	2	109.50
	5	8	11	2	111.00
	9	8	10	2	106.75
	9	8	11	2	109.50
	10	8	11	2	109.50
	8	11	12	2	109.50
	8	11	13	2	109.50
	8	11	14	2	111.00
	12	11	13	2	106.75
	12	11	14	2	109.50
	13	11	14	2	108.00
	11	14	15	2	108.00
	11	14	16	2	109.50
	11	14	17	2	111.00
	15	14	16	2	106.75
	15	14	17	2	109.50
	16	14	17	2	109.60
	14	17	18	2	120.00
					505.00

14	17	19	2	126.00	640.00
18	17	19	2	120.00	505.00
17	19	20	2	120.00	505.00
17	19	21	2	120.00	560.00
20	19	21	2	120.00	505.00
19	21	22	2	110.30	524.00
19	21	23	2	109.50	320.00
19	21	24	2	111.00	530.00
22	21	23	2	109.50	618.00
22	21	24	2	108.00	740.00
23	21	24	2	110.30	524.00
21	23	31	2	120.00	1150.00
21	24	25	2	108.00	740.00
21	24	26	2	109.50	520.00
21	24	27	2	111.00	530.00
25	24	26	2	103.00	741.00
25	24	27	2	109.60	450.00
26	24	27	2	111.00	530.00
24	27	28	2	120.00	505.00
24	27	29	2	120.00	560.00
28	27	29	2	125.00	750.00
27	29	30	2	120.00	505.00
27	29	31	2	120.00	560.00
30	29	31	2	120.00	505.00
23	31	29	2	117.00	635.00
23	31	32	2	120.00	670.00
29	31	32	2	121.00	685.00

[dihedrals]

; GROMOS improper dihedrals

; ai	aj	ak	al	funct	angle	fc
17	14	18	19	2	0.00	167.36
19	17	20	21	2	0.00	167.36
27	24	28	29	2	0.00	167.36
29	27	30	31	2	0.00	167.36
31	23	29	32	2	0.00	167.36

[dihedrals]

; ai	aj	ak	al	funct	ph0	cp	mult
3	2	5	8	1	0.00	5.92	3
2	5	8	11	1	0.00	5.92	3
5	8	11	14	1	0.00	5.92	3
8	11	14	17	1	0.00	5.92	3
11	14	17	19	1	180.00	1.00	6
14	17	19	21	1	180.00	41.80	2
17	19	21	24	1	180.00	1.00	6
19	21	23	31	1	0.00	1.26	3
19	21	24	27	1	0.00	5.92	3
21	23	31	29	1	180.00	24.00	2
21	24	27	29	1	0.00	1.00	6
24	27	29	31	1	180.00	41.80	2
27	29	31	23	1	180.00	5.86	2

```

[ exclusions ]
; ai  aj  funct ; GROMOS 1-4 exclusions
:
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "argent-posre.itp"
#endif

[ moleculetype ]
; Name  nrexcl
3-NPA  3
[ atoms ]
; nr  type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass
total_charge
  01  H      1     3NPA  H5    1     0.200  1.0080
  02  OA     1     3NPA  O2    1    -0.316 15.9994
  03  C      1     3NPA  C1    1     0.300 12.0110
  04  O      1     3NPA  O1    1    -0.312 15.9994
  05  C      1     3NPA  C2    1    -0.131 12.0110
  06  HC     1     3NPA  H1    1     0.053  1.0080
  07  HC     1     3NPA  H2    1     0.053  1.0080
; -0.153
  08  C      1     3NPA  C3    2    -0.076 12.0110
  09  HC     1     3NPA  H3    2    -0.034  1.0080
  10  HC     1     3NPA  H4    2    -0.034  1.0080
  11  NT     1     3NPA  N1    2    -0.299 14.0067
  12  OM     1     3NPA  O3    2    -0.702 15.9994
  13  OM     1     3NPA  O4    2    -0.702 15.9994
; -1.847
; total charge of the molecule: -2.000
[ bonds ]
; ai  aj  funct  c0  c1
  1  2  2  0.1000  1.5700e+07
  2  3  2  0.1430  8.1800e+06
  3  4  2  0.1230  1.6600e+07
  3  5  2  0.1530  7.1500e+06
  5  6  2  0.1090  1.2300e+07
  5  7  2  0.1090  1.2300e+07
  5  8  2  0.1530  7.1500e+06
  8  9  2  0.1100  1.2100e+07
  8 10  2  0.1100  1.2100e+07
  8 11  2  0.1610  4.8400e+06
 11 12  2  0.1460  2.7500e+06
 11 13  2  0.1460  2.7500e+06
[ pairs ]
; ai  aj  funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in
GROMOS itp
  1  4  1
  1  5  1

```

```

2      6      1
2      7      1
2      8      1
3      9      1
3     10      1
3     11      1
4      6      1
4      7      1
4      8      1
5     12      1
5     13      1
6      9      1
6     10      1
6     11      1
7      9      1
7     10      1
7     11      1
9     12      1
9     13      1
10     12      1
10     13      1
[ angles ]
; ai  aj  ak  funct  angle  fc
  1   2   3    2   108.53  443.00
  2   3   4    2   124.00  730.00
  2   3   5    2   111.00  530.00
  4   3   5    2   126.00  640.00
  3   5   6    2   108.53  443.00
  3   5   7    2   106.75  503.00
  3   5   8    2   111.00  530.00
  6   5   7    2   106.75  503.00
  6   5   8    2   109.50  285.00
  7   5   8    2   110.30  524.00
  5   8   9    2   106.75  503.00
  5   8  10    2   107.00 1440.00
  5   8  11    2   111.00  530.00
  9   8  10    2   104.00  490.00
  9   8  11    2   109.50  285.00
 10   8  11    2   120.00  505.00
  8  11  12    2   108.53  443.00
  8  11  13    2   106.00  848.00
 12  11  13    2   111.40  532.00
[ dihedrals ]
; GROMOS improper dihedrals
; ai  aj  ak  al  funct  angle  fc
  3   2   4   5    2    0.00 167.36
[ dihedrals ]
; ai  aj  ak  al  funct  ph0  cp  mult
  1   2   3   5    1  180.00 16.70  2
  4   3   5   8    1  180.00  1.00  6

```

```

3      5      8      11     1      0.00     5.92     3
5      8      11     12     1      0.00     3.77     6
[ exclusions ]
; ai  aj  funct ; GROMOS 1-4 exclusions

```

9 APÊNDICE 2

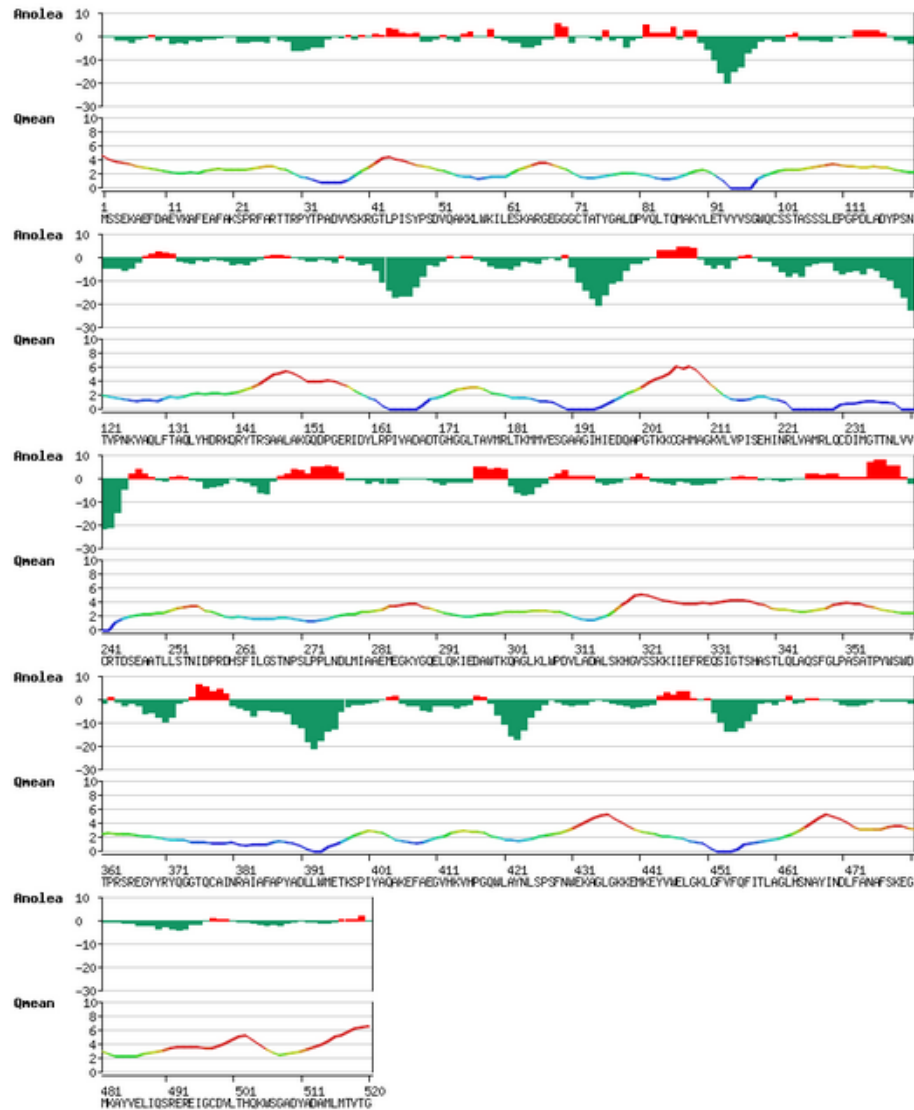



Gráfico de ANOLA e QMEAN, fornecido pelo programa SWISS-MODEL.

dfica_energy: -647.15

QMEAN6:  [+/-]



The QMEAN6 score is a composite score consisting of a linear combination of 6 terms (estimated model reliability between 0-1). The pseudo-energies of the contributing terms are given below together with their Z-scores with respect to scores obtained for high-resolution experimental structures of similar size solved by X-ray crystallography:

Scoring function term	Raw score	Z-score
C_beta interaction energy	-35.26	-1.87
All-atom pairwise energy	-7426.94	-1.31
Solvation energy	-26.75	-1.38
Torsion angle energy	-85.15	-1.96
Secondary structure agreement	81.6%	0.47
Solvent accessibility agreement	77.5%	-0.71
QMEAN6 score	0.666	-1.20

Resultados fornecidos do SWISS-MODEL. Valor de QMEAN e Z-score.

Poor rotamers	7	1.65%	Goal: <1%
Ramachandran outliers	7	1.35%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	497	95.76%	Goal: >98%
Cβ deviations >0.25Å	1	0.21%	Goal: 0
Bad backbone bonds:	0 / 4129	0.00%	Goal: 0%
Bad backbone angles:	68 / 5597	1.21%	Goal: <0.1%

Resultado fornecido pelo MOLPROBITY. Avaliação dos gráficos de Ramachandran, rotâmeros e distribuição dos ângulos.