

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - BIOINFORMÁTICA

***ANÁLISE IN SILICIO DA ATIVIDADE DO IRIDÓIDE
PLUMIERIDINA NOS FUNGOS *CRYPTOCOCCUS
NEOFORMANS* E *CRYPTOCOCCUS GATTII****

Trabalho de Conclusão de Curso

Renato Kulakowski Corá

Porto Alegre, Dezembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - BIOINFORMÁTICA

**Análise *in silicio* da atividade do iridóide plumieridina nos
fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***

Renato Kulakowski Corá

Monografia apresentada como requisito
parcial para obtenção do Grau de
Bacharel em Biotecnologia, ênfase em
Bioinformática.

Orientadora: Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Cláudia Lemelle Fernandes

Porto Alegre, Dezembro de 2016.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, e na Unidade de Biologia Teórica e Computacional, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
1. Introdução:	15
1.1. <i>Cryptococcus spp.</i> :.....	15
1.2. Criptococose:	16
1.3. Tratamentos:.....	21
1.4. Fármacos:.....	22
1.4.1. Anfotericina B:	22
1.4.2. Fluconazol:.....	23
1.4.3. Flucitosina:.....	24
1.5. Novos Fármacos:.....	27
1.6. A rota de pirimidinas:.....	28
1.6.1. Timidilato Sintase:	30
1.7. <i>Allamantha polyantha</i> e a Plumieridina:.....	35
1.8. Análises <i>in silicio</i> :	38
1.8.1. PharmMapper:.....	40
1.8.2. Modeller:	41
1.8.3. Atracamento (<i>Docking</i>) Molecular:.....	41
1.8.4. Dinâmica Molecular, GROMOS e o GROMACS:	44
2. Justificativa:.....	48
3. Objetivos:	49
4. Materiais e Métodos:	50
4.1. Desenho e minimização das estruturas tridimensionais:.....	50
4.2. Predição de alvos potenciais:.....	51
4.3. Modelagem comparativa:	51
4.4. <i>Docking</i> Molecular:	52
4.5. Dinâmica Molecular (DM):.....	52
4.6. Análises dos Dados:.....	54
5. Resultados e Discussão:	55

5.1.	Desenho e otimização da estrutura da plumieridina:	55
5.2.	Predição de potenciais alvos para a ação da plumieridina:.....	56
5.3.	Modelagem Molecular de potenciais alvos:.....	58
5.4.	<i>Docking</i> Molecular da plumieridina nos modelos:	61
5.5.	Simulação de DM:	63
6.	Conclusão e Perspectivas:	77
7.	Bibliografia:.....	79
APÊNDICE 1:.....		92
APÊNDICE 2:.....		94
APÊNDICE 3:.....		100
APÊNDICE 4:.....		101
APÊNDICE 5:.....		103
APÊNDICE 6:.....		106
APÊNDICE 7:.....		115

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC	5-fluorocitosina
5-FU	5-fluorouracil
ART	Antiretroviral therapy (terapia antiretroviral)
ATB	Automated Topology Builder (Construtor de topologias automatizado)
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DM	Dinâmica molecular
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dUTP	desoxiuridina trifosfato
FdUMP	5-fluorodesoxiuridina monofosfato
FUDP	5-fluorouridina difosfato
FUMP	5-fluorouridina monofosfato
FUTP	5-fluorouridina trifosfato
GalXM	Galactoxilomanana
GROMOS	GRoningen MAchine for Chemical Simulations – Máquina de Groningen para simulações químicas.
GXM	Gliconoxilomanana
HIV	Human immunodeficiency vírus (vírus da imunodeficiência humana)
MIC	Minimum Inhibitory Concentration (concentração inibitória mínima)
OMPD	Orotidina 5'-fosfato descarboxilase
PDB	Protein Data Bank (Banco de dados de proteínas)
RGIRO	Raio de giro
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
RMSD	Root-Mean-Square Deviation (desvio médio quadrático)
RMSF	Root-Mean-Square Fluctuation (flutuação média quadrática)
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC	Sistema Nervoso Central
SPC	Simple Point Charge (Carga Pontual Simples)
TS	Timidilato sintase
UFF	Universal Force Field (Campo de Força Universal)

RESUMO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras encapsuladas causadores da criptococose. O tratamento da doença apresenta elevada toxicidade, fazendo-se necessário o desenvolvimento de fármacos menos tóxicos e mais eficientes. Com esse propósito, nosso grupo de pesquisa identificou a presença de dois iridóides com ação antifúngica no extrato de sementes de *Allamanda polyantha*: a plumieridina e o plumierideo. Relatos anteriores demonstraram a conversão do plumierideo a plumieridina por hidrólise enzimática, entretanto, seu alvo molecular ainda não é conhecido. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo identificar, por métodos *in silicio*, possíveis proteínas alvo para a ação da plumieridina em *C. neoformans* e *C. gattii*. Para tanto, utilizamos o servidor do PharmMapper para predizer possíveis alvos protéicos desse ligante. Dentre esses, identificamos algumas enzimas da rota das pirimidinas, selecionando a timidilato sintase (TS), um dos alvos da ação do antifúngico flucitosina, para iniciar nossos estudos. As TSs das duas espécies foram modeladas, e o *docking* da molécula da plumieridina foi realizado nas estruturas resultantes. Alguns complexos TS-plumieridina foram selecionados e simulados por dinâmica molecular, assim como as TSs das duas espécies na ausência do ligante. A plumieridina, no entanto, permaneceu interagindo com a TS apenas nas simulações dos complexos onde ela se encontrava no sítio catalítico. Foi possível observar divergências entre as simulações das TSs das duas espécies com a plumieridina. A de *C. neoformans* demonstrou maiores modificações estruturais, tendo ocorrido o desenovelamento de estruturas secundárias porém, fora isto, a forma de interação da plumieridina com a TS apresentou pouca variação ao longo da simulação. Em contrapartida, em *C. gattii* foi observado grande conservação da estrutura secundária, assim como uma variação significativa na interação TS-plumieridina, ocorrendo um deslocamento do ligante no sítio catalítico. Apesar disso, em ambos os casos a plumieridina interagiu com regiões essenciais na catálise enzimática, indicando potencial para bloquear o sítio catalítico e impedir a ligação dos substratos, inviabilizando, dessa forma, o correto funcionamento da enzima.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans and *Cryptococcus gattii* are encapsulated yeast, and the main cause of cryptococcosis. Due to their high toxicity, it is necessary to develop more effective drugs to treat cryptococcosis. With this purpose, our group has identified the presence of two potential antifungal iridoids in seed extracts of *Allamanda polyantha*: the plumieridin and the plumieride. Previous reports demonstrate the conversion of plumieride to plumieridin, by enzymatic hydrolysis, however, its target is not yet known. Thus, this study aims to identify, by *in silico* methods, possible target proteins for the action of plumieridin in *C. neoformans* and *C. gattii*. For this, we used PharmMapper server to predict possible targets of this ligand. Among the results, we identified some enzymes from the pyrimidines pathway, selecting thymidylate synthase (TS), one of the targets of flucytosine action, in order to initiate our work. The enzymes from both species were modeled, and the docking of plumieridin's molecule was performed on the resulting structures. Some TS-plumieridin complexes were selected and simulated by molecular dynamics, as well as the TSs from the two species without ligand. The plumieridin, however, remained interacting with the TS only in the simulations where it was at the catalytic site. Divergences between the simulations of TSs from the two species with plumieridin were observed. *C. neoformans* demonstrated major structural changes, including the unfolding of some secondary structure. Furthermore, plumieridin interaction with TS showed little variation during the simulation. In contrast, for *C. gattii* there was an extensive conservation of secondary structure, as well as a significant variation in TS-plumieridin interaction with a displacement of the ligand in the catalytic site. Despite this, in both cases the plumieridin interacted with essential regions for enzyme catalysis, indicating a potential to block the catalytic site preventing binding of substrates and affect the correct function of the enzyme.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Relatos de Isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na América Central, e América do Sul.** Mais da metade dos relatos foram registrados no Brasil. Adaptado de Cogliati, 2013. 16
- Figura 2: Processo de infecção da criptococose.** Os propágulos são inalados pelo hospedeiro, colonizam o meio alveolar nos pulmões, podendo disseminar-se através do sistema circulatório, e chegar ao SNC, ao atravessar a barreira hematoencefálica. A imagem foi adaptada de Bielska & May, 2015. 19
- Figura 3: Representação de uma levedura do gênero *Cryptococcus*.** A célula é delimitada por uma cápsula polissacarídica, característica única entre os organismos eucarióticos. Imagem extraída de Secko, 2003. 21
- Figura 4: Estrutura molecular da anfotericina B.** A anfotericina B é um poliêno de estrutura macrocíclica. 23
- Figura 5: Estrutura molecular do fluconazol.** O fluconazol foi um dos primeiros triazóis descritos como antifúngicos. 24
- Figura 6: Moléculas da flucitosina e 5-fluorouracil.** A esquerda está representada a molécula da flucitosina, quase análoga à citosina, possuindo apenas um flúor a mais. A direita encontra-se a molécula do 5-fluorouracil, após a conversão pela citosina desaminase. 25
- Figura 7: Ação da flucitosina.** Abreviações: 5-FC, 5-fluorocitosina; 5-FU, 5-fluorouracil; FUMP, 5-fluorouridina monofosfato; FUDP, 5-fluorouridina difosfato; FUTP, 5-fluorouridina trifosfato; FdUMP, fluorodesoxiuridina monofosfato. Imagem baseada em Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000. 26
- Figura 8: Molécula da FdUMP.** A 5-FU é convertida por ação da uridina monofosfato pirofosforilase em FdUMP, um potente inibidor da enzima TS.... 26
- Figura 9: A rota das pirimidinas.** A rota das pirimidinas inclui subrotas e passos enzimáticos que vão desde a formação do carbamil fosfato (reação omitida na imagem) até a formação do dCTP e do dTTP. Essa subdivisão encontra-se representada pela variação na cor dos passos enzimáticos apresentados: em laranja, a rota de síntese de novo de pirimidinas; em vermelho, a conversão de Uridina trifosfato a dUTP; em roxo, a conversão de citidina trifosfato à dCTP; e em azul, os passos que levam a síntese do dTTP, incluindo a formação do dUMP e sua conversão a dTMP. 30
- Figura 10: Substratos da enzima TS.** A esquerda encontra-se a molécula do dUMP, e a direita a do folato. 31
- Figura 11: Representação da estrutura da TS de *C. neoformans*.** A) A proteína está colorida da extremidade amino-terminal, em azul, à extremidade carboxi-terminal, em vermelho. As α -hélices encontram-se legendadas em ordem alfabética, do amino ao carboxi-terminal, em letras maiúsculas, e as fitas- β em números romanos, em minúsculas (baseado nas legendas apresentadas em Finer-Moore et al., 2005). B) TS com as regiões das fitas- β de interação entre os dímeros destacadas. C) Em Azul, a α -hélice J. As demais estruturas em verde correspondem às regiões que envolvem a α -hélice J,

isolando-a do meio. D) Em amarelo, regiões que compoem a principal parte do sítio ativo.....	33
Figura 12: Unidade básica de um iridóide. Os iridóides são monoterpenoides baseados em um esqueleto ciclopentano-[C]-pirano, que geralmente possui de oito a 10 átomos de carbono (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001).	36
Figura 13: Moléculas da plumieridina e do plumierideo. Ambas moléculas são iridóides com potencial antifúngico, presentes no extrato aquoso de sementes de <i>Allamantha polyantha</i>	37
Figura 14: Fluxograma da metodologia empregada em nosso estudo.	50
Figura 15: Otimização da Estrutura da plumieridina. Em azul, a molécula desenhada no programa Avogadro. Em amarelo, a molécula após otimização com GAMESS. O RMSD entre os átomos da estrutura inicial e final apresentou valor de 0.514 Å.	55
Figura 16: Alinhamento das sequências das TS de <i>C. neoformans</i> H99 e <i>C. gattii</i> R265 com a da estrutura molde. As sequências apresentaram alta identidade, uma vez que o molde se trata de uma TS de <i>C. neoformans</i>	60
Figura 17: Modelagem das TSs de <i>C. neoformans</i> H99 e <i>C. gattii</i> R265. A) Estrutura molde com dUMP e CB3717 no sítio catalítico (PDBID: 2AAZ). B) Estrutura do molde utilizado na modelagem sobreposta com os melhores modelos gerados para <i>C. neoformans</i> H99 e <i>C. gattii</i> R265.....	61
Figura 18: Docking molecular da plumieridina na TS. Os números correspondem às posições de <i>docking</i> preditas, e estão em acordo com os apresentados na Tabela 3.....	62
Figura 19: Posições de docking simuladas. Representantes dos agrupamentos 1, 2 e 3 foram escolhidos e simulados junto a TS.....	64
Figura 20: Análises da simulação de <i>C. neoformans</i> H99. A esquerda encontra-se o gráfico de RMSD da estrutura total da TS. Ao lado deste está disposto o gráfico do RMSD desmembrado nas estruturas da proteína. A direita encontra-se graficado o raio de giro das TSs ao longo das simulações.	66
Figura 21: Análises da simulação de <i>C. gattii</i> R265. A esquerda encontra-se o gráfico de RMSD da estrutura total da TS. Ao lado está disposto o gráfico do RMSD das estruturas da proteína. A direita localiza-se o raio de giro das TSs ao longo das simulações.....	67
Figura 22: Variação na forma de interação da plumieridina com a TS. A) Complexo TS-plumieridina de <i>C. neoformans</i> H99 no início da simulação. B) Complexo TS-plumieridina de <i>C. neoformans</i> H99 aos 100 ns de simulação. C) Complexo TS-plumieridina de <i>C. gattii</i> R265 no início da simulação. D) Complexo TS-plumieridina de <i>C. gattii</i> R265 aos 100 ns de simulação.....	68
Figura 23: Regiões de importância na interação da TS com o dUMP e o folato. A esquerda o complexo TS-dUMP-folato. A direita o complexo TS-plumieridina. As regiões de importância encontram-se destacadas com cores, segundo a legenda.....	69
Figura 24: Gráfico de RMSF da TS. Acima localiza-se o gráfico de RMSF para as simulações de <i>C. neoformans</i> H99, e abaixo o para <i>C. gattii</i> R265.	

Encontram-se indicados nos gráficos as principais regiões de interação da TS com o dUMP e o folato.....	71
Figura 25: RMSF para a TS de <i>C. gattii</i> R265 no tempo anterior ao deslocamento da plumieridina (30ns aos 50ns). Em rosa no gráfico pode ser visto o RMSF para a TS simulada com a plumieridina, analisada dos 65 ns aos 100 ns, e mostrada previamente na Figura 24. Encontram-se, novamente, indicados as regiões destacadas para a discussão. Além disso, uma região R2 está demarcada, para facilitar a discussão.	73
Figura 26: Estrutura secundária das TSs simuladas. A estrutura foi predita pelo PDBsum. Em ROSA e AZUL encontram-se as estruturas iniciais da TS. Em PRETO , as estruturas finais das TSs simuladas sem plumieridina, e em VERMELHO as simuladas com plumieridina. A predição da estrutura de forma contínua foi realizada utilizando o DSSP através da ferramenta do_dssp do GROMACS. Os resultados deste estão disponíveis no apêndice 7.....	76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Estruturas preditas pelo servidor do PharmMapper.** Nas duas últimas colunas, os “X” indicam a presença da proteína em mamíferos ou fungos. Os “-“ indicam ausência ou inaplicabilidade. Encontram-se destacadas (**negrito**) as proteínas pertencentes à rota das pirimidinas. 56
- Tabela 2: Resultados do Blast.** A tabela apresenta os resultados obtidos através do Blast das sequências das proteínas da rota das pirimidinas de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 contra o PDB. 59
- Tabela 3: Agrupamentos de posições de docking.** A primeira coluna para cada servidor corresponde ao número absoluto de posições preditas naquele grupo, e a segunda corresponde à quantidade relativa, em função de todas predições do dado servidor na dada linhagem. As tabelas resultantes dos programas pode ser encontrada no Apêndice 6. 62
- Tabela 4: Interações da molécula Plumieridina com os resíduos de aminoácido da TS ao longo da simulação.** (O) Representa interações hidrofóbicas, e (I) interações hidrofílicas. O **VERMELHO** representa interações observadas na TS de *C. neoformans* H99, e o **AZUL** na TS de *C. gattii* R265. 70

1. Introdução:

1.1. *Cryptococcus* spp.:

O gênero *Cryptococcus* engloba 37 espécies diferentes de leveduras, sendo a maioria delas de vida livre e não patogênicas. Duas das espécies desse gênero, no entanto, já foram largamente descritas como patogênicas: *Cryptococcus neoformans*, e *Cryptococcus gattii*; apesar de outras espécies, como *Cryptococcus laurentii*, haverem sido relacionadas à infecção em indivíduos extremamente debilitados (Cheng et al., 2001; Khawcharoenporn; Apisarmtharak; Mundy, 2007).

Os primeiros relatos de leveduras do gênero *Cryptococcus* ocorreram em 1894 quando Sanfelice isolou, a partir de suco de pêssego, exemplares da espécie *C. neoformans*. No mesmo ano, Busse realizou a primeira descrição de criptococose, a infecção causada por fungos deste gênero, ao identificar a presença da levedura em uma lesão na tíbia de uma jovem (Kwon-Chung et al., 2014).

Inicialmente acreditou-se que a única espécie desse gênero que poderia infectar ao ser humano seria *C. neoformans*, que estaria dividido em duas variedades, *C. neoformans* var *neoformans* e *C. neoformans* var *gattii* (Benham, 1935, 1950). Estes ainda apresentariam teleomorfos, formas fúngicas capazes de se reproduzir sexualmente, que eram classificados no gênero *Filobasidiella* (Kwon-Chung, 1975, 1976).

Atualmente, entretanto, a nomenclatura para os teleomorfos foi abandonada, sendo a espécie conhecida apenas pelo nome antigamente associado a sua forma anamórfica (assexuada). Estudos moleculares demonstraram, ainda, a existência da variedade *C. neoformans* var *grubii*, que era erroneamente classificada junto a *C. neoformans* var *neoformans* (Franzot, Salkin & Casadevall, 1999); e elevaram a variedade *C. neoformans* var *gattii* a espécie, sendo nomeada, então, *C. gattii* (Kwon-Chung et al., 2002).

C. neoformans e *C. gattii* diferem bastante em sua distribuição ambiental. O primeiro é comumente relacionado a fezes de pombas, sendo encontrado, por exemplo, em solos contaminados, ou, ainda, em amostras isoladas dessas fezes (Ellabib et al., 2016). Já *C. gattii* é geralmente encontrado em árvores de

eucaliptos, assim como em troncos ocos em decomposição (Callejas et al., 1998; Chakrabarti et al., 1997; Lazéra et al., 1998).

Em relação à epidemiologia, tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* possuem distribuição global, sendo isolados em diferentes regiões do mundo, tanto do ambiente quanto em pacientes. Entre os casos relatados na América Central e América do Sul, mais da metade estão localizados no Brasil (Figura 1) (Cogliati, 2013). Ainda de acordo com a distribuição nacional, a incidência das espécies no Brasil varia segundo a região, no norte, existe maior incidência de *C. gattii*, enquanto no sul e no sudeste, a maior parte dos isolados corresponde a *C. neoformans* (Nishikawa et al., 2003).

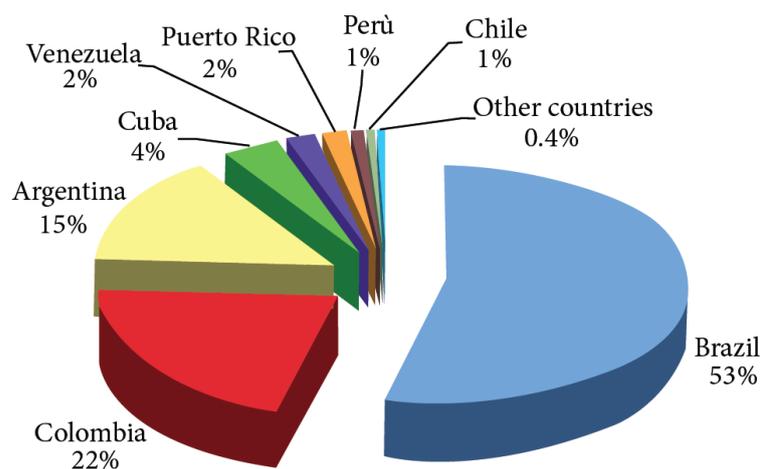


Figura 1: Relatos de Isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na América Central, e América do Sul. Mais da metade dos relatos foram registrados no Brasil. Adaptado de Cogliati, 2013.

1.2. Criptococose:

A partir da presença ambiental de *C. neoformans* ou de *C. gattii*, a inalação de propágulos das leveduras pode ocorrer, levando possivelmente à infecção que caracterizará a doença denominada como criptococose. Esta infecção pode ocorrer inicialmente no sistema respiratório, de onde pode partir para colonizar também o sistema nervoso central (SNC). Dessa forma, casos de criptococose podem ser encontrados ao redor do mundo, seguindo o padrão de distribuição de seus agentes etiológicos (Kwon-Chung et al., 2014).

A doença está geralmente associada a indivíduos imunocomprometidos, como recém-transplantados, que passaram por tratamentos de imunossupressão, e pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência

Adquirida). A criptococose é a infecção fúngica mais comum no SNC, e a terceira complicação neurológica mais frequente em portadores de HIV sintomáticos. A estimativa é que um milhão de casos de criptococose associada a SIDA ocorrem no mundo por ano, sendo 720 mil na África subsaariana, onde o tratamento com antiretrovirais (ART) para SIDA, e os medicamentos para o combate à criptococose, praticamente não estão disponíveis. Mais da metade dessas infecções resultam na morte do indivíduo, sendo 625 mil no mundo por ano, ou 500 mil somente nessa região da África (Cogliati, 2013; Park et al., 2009; Speed & Dunt, 1995).

Indivíduos imunocompetentes também podem, menos frequentemente, ser acometidos pela criptococose. Neste caso, a doença geralmente está relacionada à infecção por *C. gattii*, apesar de também estarem descritos casos desse tipo onde o agente da infecção é o *C. neoformans* (Kaur et al., 2015; MacDougall et al., 2011).

A criptococose foi considerada, até cerca de 15 anos atrás, uma doença causada, majoritariamente, por *C. neoformans*, sobre o qual se desenvolvia a maior parte da pesquisa acadêmica. Em 1999, no entanto, um surto de criptococose em Vancouver mudou consideravelmente os conhecimentos que possuíamos sobre essa doença. A espécie responsável pelo surto, *C. gattii*, havia sido caracterizado, até então, presente apenas em zonas tropicais e subtropicais. Além disso, a infecção por esta espécie havia sido pouco estudada, e aparentava ser uma espécie secundária na incidência da criptococose. Após o surto, demonstrou-se, no entanto, que a espécie estava presente também em zonas temperadas, além de se tornar evidente sua capacidade de acometer humanos saudáveis, imunocompetentes, assim como outros animais, terrestres e aquáticos. As linhagens decorrentes desse surto se mostraram, todavia, mais virulentas, e menos suscetíveis a ação de fármacos que as não relacionadas ao surto (Bielska & May, 2016).

O processo de infecção por esses fungos ocorre pela inalação dos propágulos infecciosos da levedura: os basidiósporos ou a levedura dessecada. Estes chegam aos pulmões, e por seu diminuto tamanho, alcançam as vias aéreas distais, colonizando os alvéolos. Nesta região, as partículas infecciosas entram em contato com macrófagos alveolares, que desencadeiam uma série de respostas à infecção, recrutando fatores e

proteínas que agem no combate imunológico. Nos sítios infectados, inflamações geralmente ocorrem em decorrência desse combate, sendo gerados granulomas. Muitas vezes, o sistema imunitário consegue eliminar a infecção. Em contrapartida, quando isso não ocorre, a infecção pode continuar se disseminando, alcançando outras regiões do corpo, ou pode ainda, entrar em um estado de latência (Kwon-Chung et al., 2015).

Para isso, as leveduras patogênicas conseguem se estabelecer, de forma dormente, em linfonodos torácicos e granulomas pulmonares. Assim, a infecção pode permanecer assintomática por anos, até que a imunidade do hospedeiro seja, por algum motivo, suprimida. Quando isso ocorre, as leveduras se difundem para fora desses nódulos e granulomas, direcionando a infecção ao seu estado ativo (Maziarz & Perfect, 2016).

De ambas maneiras, quando a infecção já está bem disseminada nos pulmões, os fungos conseguem migrar, por meio do sistema circulatório, para outras partes do corpo, entre as quais se destaca o cérebro. Neste, as leveduras livres, ou em macrófagos, conseguem transpassar a barreira hematoencefálica, alcançando o SNC. O desenvolvimento, e o alastramento das leveduras no SNC, causam a forma mais grave da infecção, a meningoencefalite (Figura 2) (Chang et al., 2004).

Geralmente é outorgada uma maior virulência a *C. gattii*, em razão da sua frequente presença na infecção de imunocompetentes. Este fungo, porém, está geralmente associado à alta formação de granulomas pulmonares, se contrapondo a ação de *C. neoformans*, que consegue, mais facilmente, alcançar e colonizar o SNC (Krockenberger et al., 2010; Maziarz & Perfect, 2016).

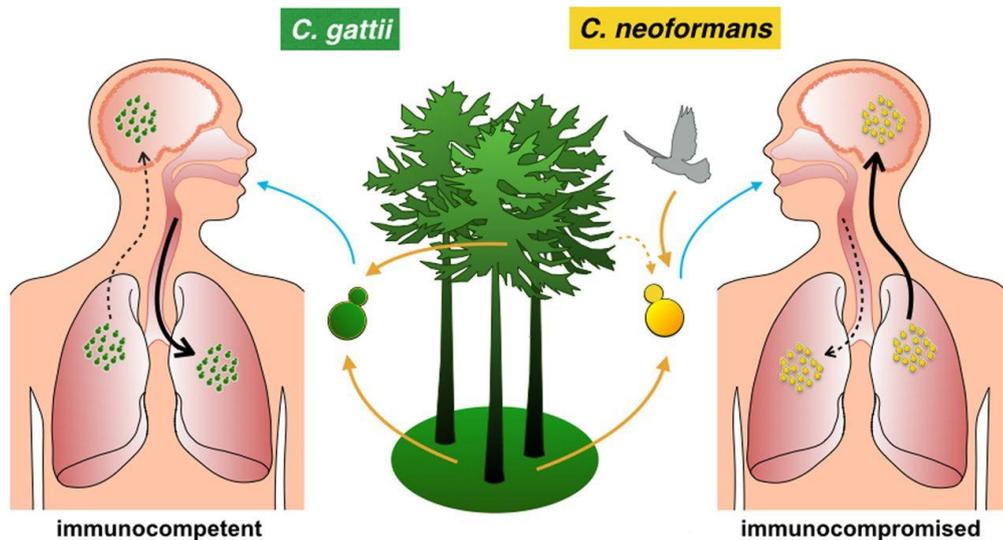


Figura 2: Processo de infecção da criptococose. Os propágulos são inalados pelo hospedeiro, colonizam o meio alveolar nos pulmões, podendo disseminar-se através do sistema circulatório, e chegar ao SNC, ao atravessar a barreira hematoencefálica. A imagem foi adaptada de Bielska & May, 2015.

C. neoformans e *C. gattii* apresentam alguns fatores essenciais para sua virulência, que determinam a capacidade desses fungos de infectar e se desenvolver em humanos (Kwon-Chung et al., 2014). Desses, os principais são:

- O desenvolvimento a 37 °C;
- A formação de melanina;
- A presença de cápsula.

A habilidade de se desenvolver a 37 °C, a temperatura fisiológica de humanos, é determinante na patogenicidade de *C. neoformans* e *C. gattii*. O desenvolvimento do fungo nessa temperatura depende da presença de diversos genes, que são superexpressos nessa condição, e cujas funções incluem, por exemplo: montagem da parede celular, sinalização de estresses, integridade da membrana, metabolismo basal, *splicing* de pré-mRNAs, remodelamento da cromatina, entre outras (Kwon-Chung et al., 2014).

Além do desenvolvimento a 37 °C, outro importante fator de virulência é a produção de melanina. Essa característica reside na presença da enzima lacase, que possui a capacidade de converter compostos fenólicos em

pigmentos similares à melanina, que são incorporados à parede celular do fungo (Gilchrist & Petri, 1999).

Estudos realizados com linhagens do fungo que apresentavam deficiência na produção de melanina associaram a baixa melanização à diminuição na letalidade e na difusão da levedura para o SNC (Kwon-Chung & Rhodes, 1986). Somado a isso, a presença de melanização nesses fungos também já foi relacionada ao aumento na resistência a luz ultravioleta, diminuição na suscetibilidade a anfotericina B, aumento na resistência a agentes oxidantes, e a uma diminuição na suscetibilidade a ação de macrófagos (Rodrigues, Alviano & Travassos, 1999; Wang & Casadevall, 1994a, 1994b).

Por fim, a presença de uma cápsula polissacarídica (Figura 3) diferencia os fungos do gênero *Cryptococcus* de todos outros organismos eucarióticos conhecidos. Essa característica foi o primeiro fator de virulência a ser definido como essencial no desenvolvimento da criptococose, sendo demonstrado que mutantes do fungo que não apresentavam a cápsula polissacarídica, não possuíam virulência, voltando, entretanto, a infectar camundongos quando a mutação era revertida, restaurando a produção da cápsula (Bulmer, Sans & Gunn, 1968). Além disso, também foi demonstrado que os constituintes dessa cápsula inibem a fagocitose do fungo. Quando as leveduras, não encapsuladas, eram expostas a fagócitos, elas eram rapidamente ingeridas por eles. Quando incubadas junto ao purificado da cápsula polissacarídica, no entanto, as mesmas leveduras não encapsuladas apresentavam resistência à fagocitose. Dessa forma, a presença da cápsula nesses fungos é de vital importância para o sucesso da infecção (Bulmer, Sans & Gunn, 1968)

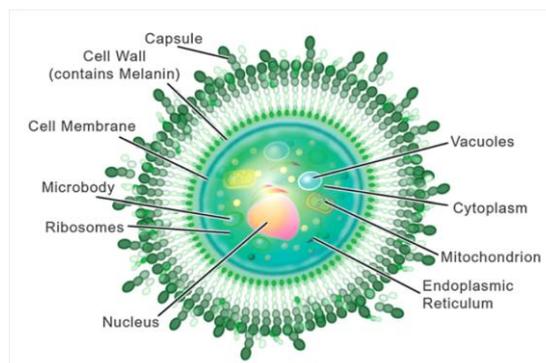


Figura 3: Representação de uma levedura do gênero *Cryptococcus*. A célula é delimitada por uma cápsula polissacarídica, característica única entre os organismos eucarióticos. Imagem extraída de Secko, 2003.

As infecções fúngicas, como a criptococose, representam enfermidades que apresentam grande complexidade no seu tratamento, uma vez que os medicamentos tem como alvo uma célula eucariótica, muito similar em vários aspectos a célula humana. Isso geralmente resulta em tratamentos mais demorados, e que muitas vezes apresentam toxicidade ao paciente (Carrillo-Muñoz et al., 2006).

1.3. Tratamentos:

Atualmente, diferentes estratégias são empregadas no tratamento da criptococose no mundo. As mais comuns envolvem três medicamentos: a anfotericina B, o fluconazol, e a flucitosina. No Brasil, entretanto, a flucitosina não se encontra disponível, tendo sido retirada do mercado brasileiro pelo fabricante há mais de 20 anos, e posteriormente removida da relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) em 2006 (RENAME 5ª edição, 2007; Perfect et al., 2010).

De maneira geral, o tratamento da criptococose está dividido em três estágios: terapia de indução, terapia de consolidação, e terapia de manutenção. O primeiro estágio do tratamento se configura pelo verdadeiro ataque aos agentes patogênicos, e tem duração de algumas poucas semanas. O objetivo é reduzir efetivamente a carga fúngica nos tecidos infectados. Já a terapia de consolidação, que tem duração de cerca de dois meses, tem como objetivo garantir a negatividade da presença fúngica, e proporcionar condições

para a melhora do paciente. O último estágio, a terapia de manutenção, geralmente só é aplicada em indivíduos imunocomprometidos, e dura ao menos um ano. O objetivo é certificar que não haverá uma recaída do paciente, com uma retomada da infecção por leveduras residuais (Perfect et al., 2010).

Para a terapia de indução, a estratégia mais eficaz descrita até o momento é a administração de anfotericina B em conjunto com flucitosina. Nos casos onde esta combinação não pode ser utilizada, por sua alta toxicidade, ou pela indisponibilidade de flucitosina, como é o caso do Brasil, indica-se o uso individual da anfotericina B (Kon et al., 2008).

Em certas ocasiões, tanto anfotericina B quanto flucitosina não podem ser utilizadas. Na África o acesso a esses medicamentos é limitado, tanto por disponibilidade, quanto por custo. Como alternativa, a terapia de indução é realizada com altas doses de fluconazol, por um período de tempo mais extenso (Rajasingham et al., 2012).

Já na terapia de consolidação, o fluconazol é, frequentemente, empregado com o objetivo de minimizar a toxicidade à qual o paciente é exposto na primeira etapa do tratamento. Da mesma forma, a terapia de manutenção é realizada através de doses brandas de fluconazol ou itraconazol, por longos prazos de tempo. A constante exposição das leveduras ao fluconazol, entretanto, pode ter como consequência o surgimento de resistência nos fungos, já que o fluconazol apresenta caráter fungistático, e não fungicida (Bicanic et al., 2006; Kon et al., 2008).

1.4. Fármacos:

Apesar de outros antifúngicos também serem utilizados no tratamento da criptococose, os três apresentados anteriormente são os mais comuns. Os mecanismos de ação deles são bem variados, possuindo diferentes alvos nas células fúngicas (Martines, 2006).

1.4.1. Anfotericina B:

Os primeiros relatos do potencial antifúngico da anfotericina B (Figura 4) foram realizados há mais de 50 anos (Jambo, Steinberg & Suydam, 1956). Esse fármaco pertence à classe dos polienos antimicóticos, juntamente com

outras moléculas antifúngicas como a nistatina e a natamicina (Hamilton-Miller, 1973), e apresenta uma estrutura macrocíclica.

Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação da molécula de anfotericina B no ergosterol presente na membrana celular da levedura. A ligação causa uma variação na permeabilidade da membrana, permitindo que constituintes intracelulares sejam extravasados e perdidos (Odds, Brown & Gow, 2003). Somado a isso, este fármaco provoca lesões oxidativas causando uma série de modificações metabólicas que tem como consequência a morte da célula (Martines, 2006).

Em relação à toxicidade, a anfotericina B causa, principalmente, dano renal, caracterizando-se, por tanto, como nefrotóxica (Burgess & Birchall, 1972). Outras reações menos expressivas causadas pelo uso da anfotericina B incluem alterações na temperatura corporal (Gigliotti et al., 1987), diminuição nas concentrações de hemoglobina (Miller & Bates, 1969), tromboflebite (Maddux & Barriere, 1980), entre outras (Gallis, Drew & Pickard, 1990).

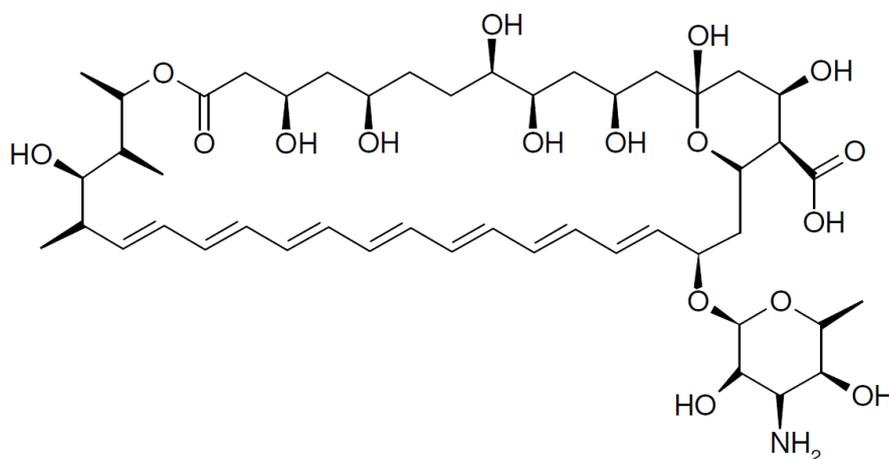


Figura 4: Estrutura molecular da anfotericina B. A anfotericina B é um poliêno de estrutura macrocíclica.

1.4.2. Fluconazol:

O fluconazol (Figura 5) foi desenvolvido bem mais recentemente, quando comparado com a anfotericina B. As primeiras descrições dessa molécula como antifúngico ocorreram em 1985 (Richardson et al. 1985), quando foi testada contra candidíase e dermatofitose. O fluconazol, tal como o itraconazol e o cetoconazol, é caracterizado como um composto azólico (Saag & Dismukes, 1988).

O mecanismo de ação deste antifúngico resume-se ao bloqueio da biossíntese de ergosterol, através da inibição do citocromo P-450. Este citocromo é essencial na fase de conversão do lanosterol ao ergosterol. O fluconazol se liga ao citocromo, e inibe sua atividade. Como consequência, o ergosterol não é produzido, e a permeabilidade das membranas celulares do fungo é alterada, impedindo a viabilidade da célula (Carrillo-Muñoz et al., 2006).

Apesar do efeito do fluconazol sobre a permeabilidade da membrana celular da levedura ser semelhante ao da anfotericina B, o fluconazol não apresenta níveis significantes de toxicidade. Isso faz com que ele seja muito utilizado nas fases mais extensas do tratamento da criptococose, além de tornar o fluconazol uma alternativa para os casos onde a toxicidade dos demais fármacos não é suportada (Saag & Dismukes, 1988). A longa exposição do fungo a esse medicamento, no entanto, torna comum o surgimento de linhagens resistentes da levedura (Bianic et al., 2006).

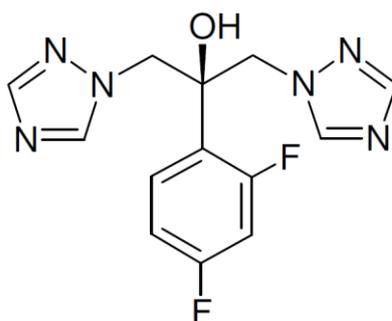


Figura 5: Estrutura molecular do fluconazol. O fluconazol foi um dos primeiros triazóis descritos como antifúngicos.

1.4.3. Flucitosina:

A flucitosina, ou 5-fluorocitosina, (Figura 6) é um análogo fluorado da citosina. Ela foi originalmente sintetizada em 1957 como um potencial agente antitumoral (Duschinsky, Plevin & Heidelberger, 1957). Em 1968, começou a ser testada contra criptococose em humanos, demonstrando potencial nessa função (Tassel, 1968). Seu uso combinado com a anfotericina B demonstrou

ser o tratamento mais eficaz contra criptococose na atualidade (Kon et al., 2008).

A flucitosina praticamente não possui atividade antifúngica por si só. Ela é transportada para as células pela enzima citosina permease, que originalmente é responsável pelo transporte de adeninas e citosinas. Uma vez dentro da célula, a flucitosina sofre ação da citosina desaminase, sendo convertida a 5-fluorouracil (5-FU) (Figura 6). O uso direto de 5-FU, como antifúngico, não é possível, já que ele é extremamente tóxico para células de mamíferos, além de não ser importado pelas células fúngicas em quantidades significantes (Carrillo-Muñoz et al., 2006; Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000).

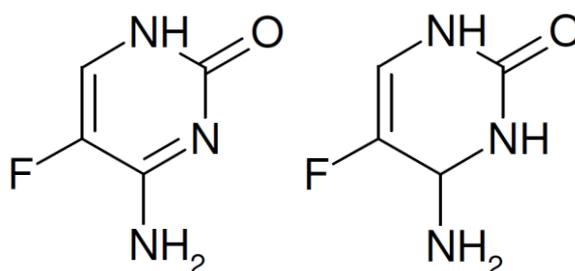


Figura 6: Moléculas da flucitosina e 5-fluorouracil. A esquerda está representada a molécula da flucitosina, quase análoga à citosina, possuindo apenas um flúor a mais. A direita encontra-se a molécula do 5-fluorouracil, após a conversão pela citosina desaminase.

Após a conversão da flucitosina para 5-FU, dois processos podem ocorrer (Figura 7), resultando na capacidade antifúngica. No primeiro a molécula do 5-FU é fosfatada três vezes, resultando em uma 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). Esta é incorporada em moléculas de RNA, o que causa a inibição da síntese de proteínas (Carrillo-Muñoz et al., 2006; Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000).

Já no segundo caso, a molécula de 5-FU sofre a ação da enzima uridina monofosfato pirofosforilase, sendo gerada uma molécula de 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP) (Figura 8). A FdUMP é uma importante inibidora da enzima TS, fonte essencial de timidina, e por tanto, enzima chave na síntese do DNA (Carrillo-Muñoz et al., 2006; Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000).

Em relação à toxicidade, a 5-FC possui grande hepatotoxicidade, além de causar a depressão da medula óssea. Além disso, sua toxicidade é ainda mais agravada quando administrada junto com anfotericina B, e para indivíduos com

SIDA, fazendo com que ela não possa ser utilizada em diversos casos. Além da toxicidade, é comum o desenvolvimento de resistência do fungo a 5-FC, principalmente quando aplicada individualmente, sem anfotericina B (Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000). A alta toxicidade aliada a fácil aquisição de resistência faz com que a flucitosina não esteja disponível atualmente no Brasil.

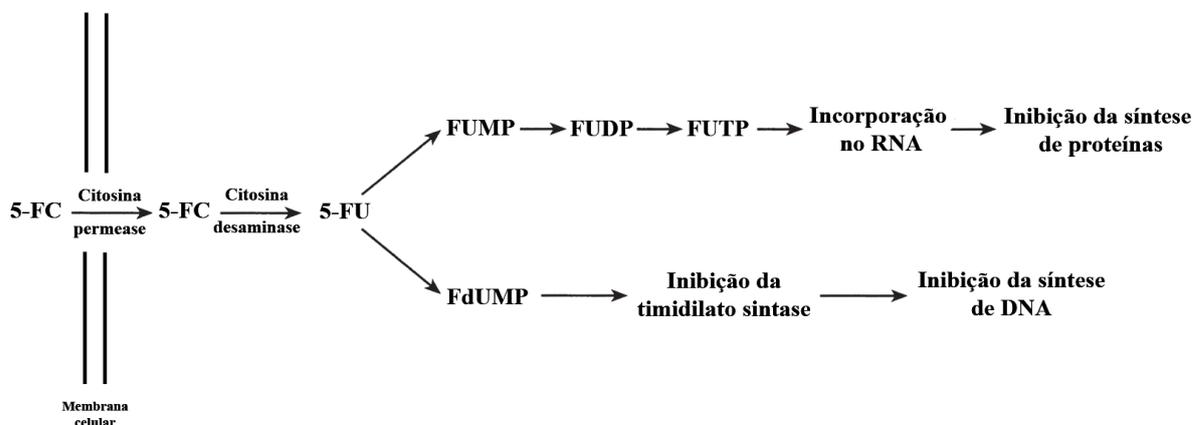


Figura 7: Ação da flucitosina. Abreviações: 5-FC, 5-fluorocitosina; 5-FU, 5-fluorouracil; FUMP, 5-fluorouridina monofosfato; FUDP, 5-fluorouridina difosfato; FUTP, 5-fluorouridina trifosfato; FdUMP, fluorodesoxiuridina monofosfato. Imagem baseada em Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000.

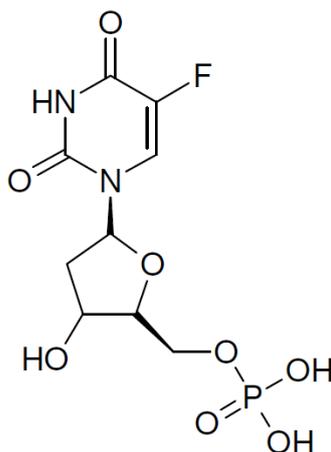


Figura 8: Molécula da FdUMP. A 5-FU é convertida por ação da uridina monofosfato pirofosforilase em FdUMP, um potente inibidor da enzima TS.

Os principais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose nem sempre podem ser administrados aos pacientes. Isso pode ocorrer pela intolerância ao medicamento (Kon et al., 2008; Martinez, 2006; Maziarz &

Perfect, 2016; Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000), falta da disponibilidade (Park et al., 2009; Rajasingham et al., 2012), presença de resistência no fungo (Gullo et al., 2013; Xie et al., 2014), alta toxicidade do medicamento (Krysan, 2015; Yao et al., 2014) e pelo alto custo que os medicamentos podem ter em regiões subdesenvolvidas (Rajasingham et al., 2012). Assim, se faz necessário o desenvolvimento de novos antifúngicos, que ampliem o leque de possibilidades de fármacos contra criptococose, trazendo, se possível, vantagens, e facilitando o tratamento da doença.

1.5. Novos Fármacos:

Nesse contexto, Paul Ehrlich a mais de 100 anos propôs o conceito de *magic bullets*, que corresponderiam a substâncias tóxicas para um organismo infeccioso, mas não para o seu organismo hospedeiro. Dessa forma, a pesquisa por novos medicamentos deveria basear-se na busca de moléculas ativas nas células das leveduras, cujos alvos moleculares fossem, de certa forma, distintos ou ausentes nas células humanas. Sendo assim, se uma molécula possuísse uma afinidade específica pelo alvo no fungo, e não apresentasse efeitos sobre as células humanas, ela possuiria potencial como medicamento.

Estudos recentes mostraram que defeitos na rota de síntese *de novo* de purinas resultam em problemas no crescimento, e atenuação da virulência em *C. neoformans*. Também foi localizada uma proteína envolvida na síntese de guanina, com características muito destoantes entre fungos e mamíferos. Isto outorga às rotas de síntese de ácidos nucleicos um interessante potencial no estudo de novos fármacos no combate a criptococose (Gontijo et al., 2014).

Além disso, diversos estudos já foram realizados demonstrando que a rota das pirimidinas cumpre um importante papel na virulência de micro-organismos patogênicos, incluindo *C. neoformans*, o que pode sugerir que as proteínas desta rota sejam potenciais alvos para ação de antifúngicos. A inibição da TS efetuada pela flucitosina caracteriza um claro exemplo disso. Também já foi evidenciado que linhagens de *C. neoformans* com defeitos na rota das pirimidinas adquirem variações nos principais fatores de virulência da criptococose, possuindo menor capacidade de sobreviver a 37 °C, demorando mais tempo para atingir níveis adequados de melanização, e produzindo uma

cápsula polissacarídica de menor tamanho. Dessa forma, a inibição da rota das pirimidinas apresenta potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos no combate a criptococose (Gontijo et al., 2014).

1.6. A rota de pirimidinas:

A rota das pirimidinas, de forma ampla, inclui subrotas e etapas metabólicas que vão desde a formação dos precursores dos compostos pirimidínicos, até a formação da desoxicitidina trifosfato (dCTP) e da desoxitimidina trifosfato (dTTP), os desoxirribonucleotídeos que serão incorporados ao DNA (Figura 9). Primeiramente, ocorre a formação de carbamil fosfato, a partir de CO_2 e NH_4 , em uma reação catalisada pela enzima carbamil fosfato sintetase, que configura o primeiro passo na rota de síntese *de novo* de pirimidinas. Essa rota inclui mais cinco passos enzimáticos, resultando, por fim, na formação de uridina monofosfato (Cox & Nelson, 2005; Kilstrup et al., 2005).

A partir dela, é formada a uridina trifosfatada, pela ação de quinases, que poderá ser convertida a dUTP pela ação da enzima ribonucleotídeo redutase. Alternativamente, a uridina trifosfato pode ser utilizada na reação catalisada pela citidina trifosfato sintase, formando a citidina trifosfato, que também será convertida, pela ribonucleotídeo redutase, em dCTP, um dos produtos finais da rota das pirimidinas (Cox & Nelson, 2005; Kilstrup et al., 2005).

A partir deste ponto, ocorre um conjunto de reações que resultam na formação do segundo produto da rota, o dTTP. Para isso, inicialmente, o dUMP precisa ser formado. Sua formação pode ocorrer tanto a partir do dUTP, por ação da enzima dUTPase, como a partir do dCTP, que é convertido a dCMP, pela dCTPase, e posteriormente ao dUMP, pela dCMP desaminase. Finalmente, o dUMP é convertido, pela ação da timidilato sintase (TS), à desoxitimidina monofosfato (dTMP), que sofrerá a ação de cinases resultando no dTTP (Cox & Nelson, 2005; Kilstrup et al., 2005).

Dentre as proteínas da rota das pirimidinas, algumas já foram descritas como potenciais alvos para a ação de fármacos, uma vez que o correto funcionamento da rota é essencial na divisão celular. A DHODH, por exemplo, que catalisa o quarto passo da rota de síntese *de novo* de pirimidinas, ao reduzir o diidroorotato a orotato (Kilstrup et al., 2005), é um conhecido alvo

para medicamentos utilizados no tratamento de artrite reumatoide (Fox, 1999) e esclerose múltipla (Palmer, 2010). Além disso já foi também descrita como um alvo promissor no tratamento da malária (Philips & Rathod, 2010).

Já a OMPD é responsável pelo sexto, e último, passo dessa rota, onde promove a conversão de orotato monofosfato a uridina monofosfato. A enzima é essencial nesta rota de síntese, e também já foi estudada como um possível alvo para medicamentos no combate a malária e ao câncer (Bello et al., 2007, 2009).

A TS, por sua vez, é uma enzima essencial da rota das pirimidinas que cataliza a conversão de dUMP à dTMP, proporcionando a única fonte *de novo* de dTMP para a célula. Por esse motivo, se tornou um alvo extensamente estudado no desenvolvimento de quimioterápicos e drogas contra doenças infecciosas, sendo um dos alvos moleculares da ação da flucitosina, um fármaco já estabelecido para o tratamento de criptococose (Berger & Berger, 2006; Costi et al., 2002; Finer-Moore et al., 2005).

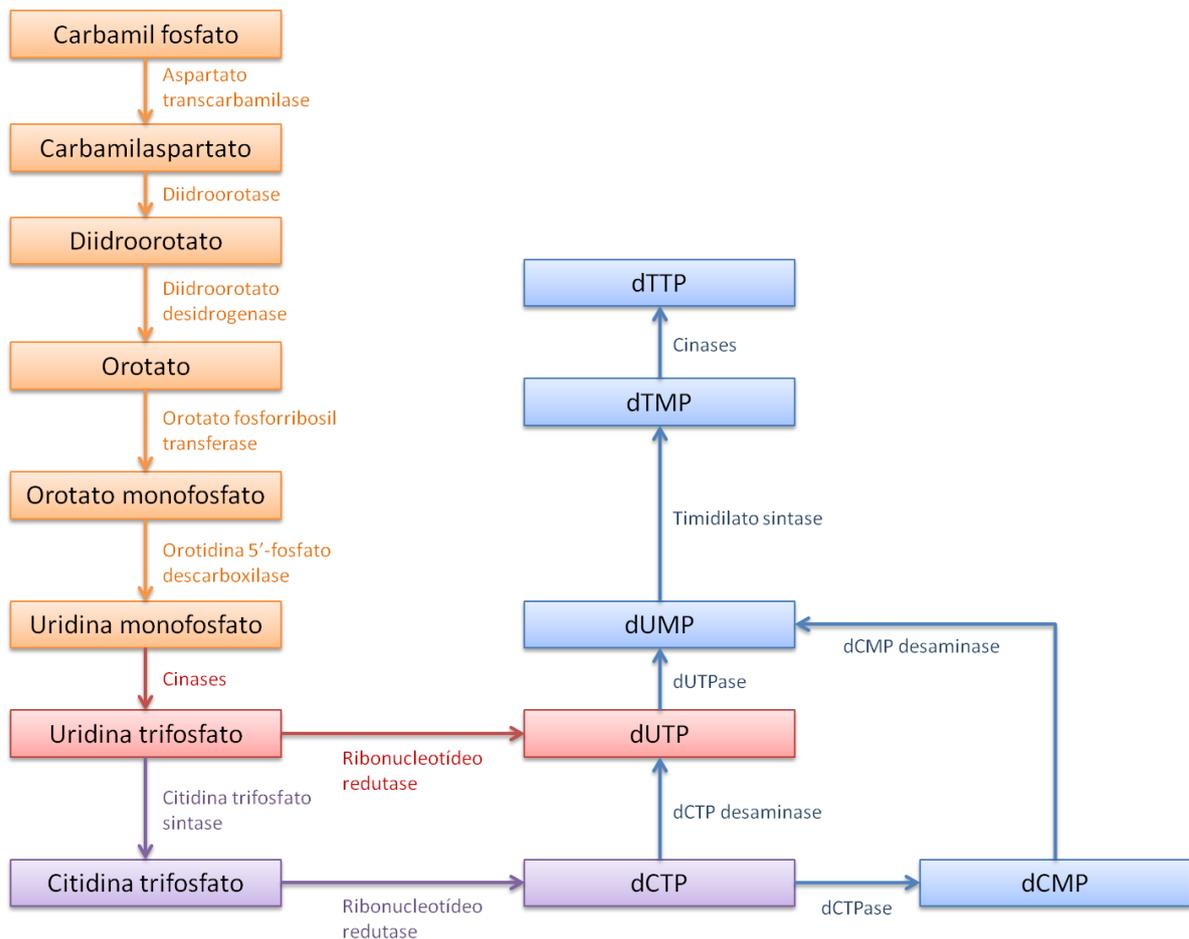


Figura 9: A rota das pirimidinas. A rota das pirimidinas inclui subrotas e passos enzimáticos que vão desde a formação do carbamil fosfato (reação omitida na imagem) até a formação do dCTP e do dTTP. Essa subdivisão encontra-se representada pela variação na cor dos passos enzimáticos apresentados: em laranja, a rota de síntese *de novo* de pirimidinas; em vermelho, a conversão de Uridina trifosfato a dUTP; em roxo, a conversão de citidina trifosfato à dCTP; e em azul, os passos que levam a síntese do dTTP, incluindo a formação do dUMP e sua conversão a dTMP.

1.6.1. Timidilato Sintase:

A TS é a enzima que realiza a conversão do dUMP ao dTMP, caracterizando a única fonte *de novo* desta molécula. Para que a reação ocorra, além do dUMP, é necessária, também, uma molécula de metilenotetrahydrofolato (folato) (Figura 10). O dTMP produzido por essa catálise é convertido na forma trifosfatada, o dTTP, que será introduzido no DNA pela DNA polimerase. Isto faz da TS um ótimo alvo no tratamento do câncer, assim como de doenças infecciosas. Diversos inibidores da enzima já foram descritos, sendo

geralmente análogos do dUMP ou do folato, os substratos da enzima. A inibição da TS faz com que os níveis celulares de dTTP caiam, criando um desequilíbrio entre o dTTP e o dUTP. Como consequência, a DNA polimerase passa a incorporar dUTP no DNA, no lugar de dTTP. A maquinaria da célula reconhece o erro no DNA, e realiza a excisão do dUTP, para que o erro possa ser corrigido. Se o desequilíbrio nos níveis de dTTP e dUTP persiste, no entanto, o dUTP volta a ser incorporado nesse sítio, levando a célula a um ciclo de correções e incorporações erradas do dUTP. O ciclo persiste até que a célula reconhece o dano ao DNA, e encaminha, finalmente, a mesma para a apoptose (Ackland, et al., 2002).

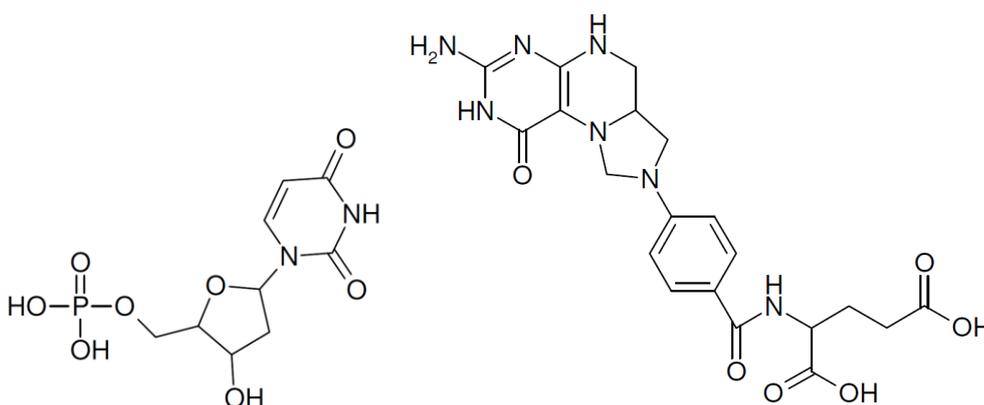


Figura 10: Substratos da enzima TS. A esquerda encontra-se a molécula do dUMP, e a direita a do folato.

A TS de *Lactobacillus casei* foi a primeira a ter sua estrutura cristalográfica determinada (Hardy et al., 1987). Desde então, diversas outras também foram descritas (Apêndice 1), tanto na ausência de ligantes, como complexadas com nucleotídeos, folatos, análogos de folatos ou inibidores (Carreras & Santi, 1995). Mais recentemente, a estrutura cristalográfica da TS de *C. neoformans* (Figura 11) foi, também, determinada, complexada ao dUMP e ao antifolato CB3717 (PDBID: 2AAZ) (Finer-Moore et al., 2005).

A estrutura da TS é conhecidamente conservada mesmo entre procariotos e eucariotos, podendo apresentar pequenas inserções em algumas espécies. De maneira geral, ela se apresenta na forma de um homodímero, com a interface entre seus monômeros formada por uma folha de cinco fitas- β , predominantemente antiparalelas (Figura 11a - i, ii, iii, iv, v; e Figura 11b – Vermelho) (Montfort, Finer-Moore, Maley, 1990).

Uma longa α -hélice com caráter hidrofóbico (Figura 11a – J; Figura 11c – Azul) constitui um núcleo sobre o qual grande parte da proteína se enovela, tornando a maior parte da α -hélice inacessível a água. Ela é envolvida pela folha da interface dos dímeros, por um lado; por duas α -hélices anfipáticas (Figura 11a – A, H; Figura 11c – Verde), dispostas em suas extremidades; e por uma última α -hélice, localizada na face oposta às fitas- β (Figura 11a – B; Figura 11c – Verde). O sítio catalítico está contido em uma cavidade que é delimitada à esquerda pelas regiões carboxi-terminais das fitas- β **ii** e **iii**, e pela alça entre a α -hélice A e a fita- β **i**; à direita pela fita- β **iv**; e acima por resíduos da região amino-terminal da α -hélice J (Figura 11d – Amarelo) (Hardy et al., 1987).

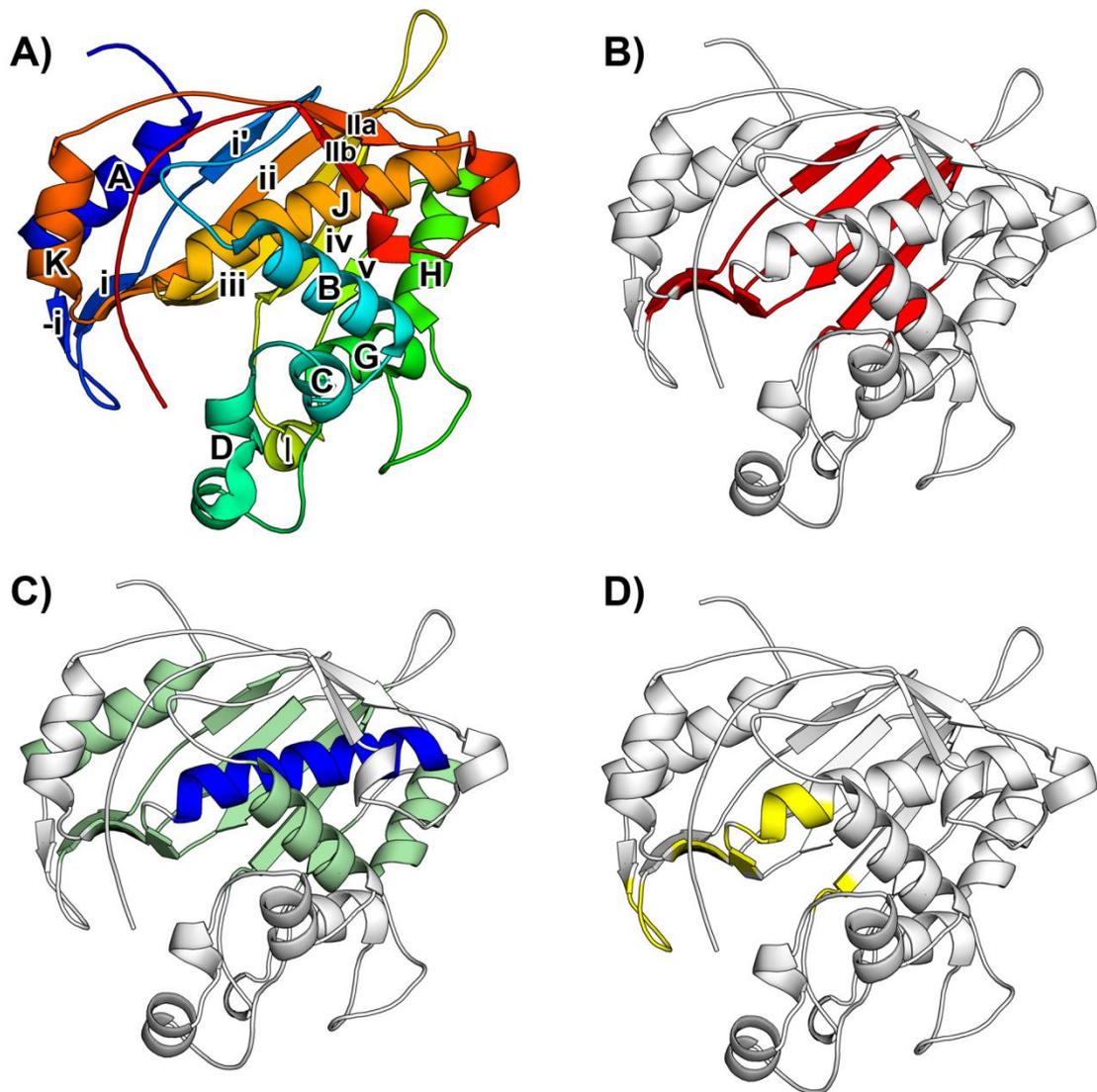


Figura 11: Representação da estrutura da TS de *C. neoformans*. A) A proteína está colorida da extremidade amino-terminal, em azul, à extremidade carboxi-terminal, em vermelho. As α -hélices encontram-se legendadas em ordem alfabética, do amino ao carboxi-terminal, em letras maiúsculas, e as fitas- β em números romanos, em minúsculas (baseado nas legendas apresentadas em Finer-Moore et al., 2005). B) TS com as regiões das fitas- β de interação entre os dímeros destacadas. C) Em Azul, a α -hélice J. As demais estruturas em verde correspondem às regiões que envolvem a α -hélice J, isolando-a do meio. D) Em amarelo, regiões que compoem a principal parte do sítio ativo.

A ligação dos substratos à proteína geralmente ocorrem de forma ordenada. Inicialmente, ocorre a ligação do dUMP, que não proporciona mudanças conformacionais na TS, fazendo com que ela permaneça semelhante à condição sem o ligante. O dUMP, entretanto, serve de base para a ligação do

CH₂H₄-folato, que, por sua vez, induz as mudanças na proteína necessárias para a reação. Alguns experimentos demonstraram, contudo, que folatos poliglutamilados apresentam uma afinidade muito maior pela TS (Lu, Aiello, Matthews, 1984), indicando que existe uma maior tendência à ligação de moléculas carregadas, o que permite, em alguns casos, que a ordem de ligação seja invertida (Stroud & Finer-Moore, 1993).

O complexo TS-dUMP-CH₂H₄-folato mostra uma proteína com significantes mudanças conformacionais, que ocorrem no sentido de sequestrar, no sítio catalítico, o dUMP e o CH₂H₄-folato junto com algumas moléculas de água, isolando-as do meio externo. Essas mudanças conformacionais caracterizam-se pelo movimento de diversas alças e estruturas secundárias em direção ao sítio catalítico, ao que se nomeia acomodação segmental. Estas diferem do observado para a maioria das proteínas, onde, após um estímulo, um grande domínio se movimenta como um único elemento. No caso da TS, a ligação do folato faz com que a porção amino-terminal da α -hélice J se desloque 0,5 Å na direção do sítio catalítico, assim como a α -hélice K, que se desloca 1 Å, também nessa direção. A região amino-terminal da fita- β iv, que contém a Cys187 que se liga ao dUMP dando início a catálise, se move levemente em direção aos ligantes, permitindo que o aminoácido se ligue ao dUMP. A extremidade carboxi-terminal da proteína realiza o maior deslocamento, e cobre o sítio catalítico ao mover-se 4.0 Å na direção deste (Montfort, Finer-Moore, Maley, 1990).

A partir de estruturas cristalográficas já determinadas é possível identificar as principais interações existentes entre uma proteína e seu substrato. A estrutura da TS de *Escherichia coli* cristalizada na presença do dUMP e do CB3717, análogo do folato, será utilizada para tanto (Montfort, Finer-Moore, Maley, 1990). Para facilitar o entendimento, a numeração dos resíduos de aminoácidos será convertida para a de *C. neoformans* e *C. gattii* (linhagens H99 e R265, respectivamente).

Dessa maneira, foi possível identificar diversas interações com o anel pirimidina do dUMP. A Asn227 e o Asp219 interagem diretamente com este anel. Já as interações que o Glu79 e a His188 realizam com esta região do dUMP são mediadas por moléculas de água. Essas interações indiretas, envolvendo moléculas de água, são observadas também entre o Glu79 e o

Trp101; o Glu79 e a Asn227; e entre a His188 e a Asn227 (Montfort, Finer-Moore, Maley, 1990).

O mesmo cristal indica, também, interações com a desoxirribose do dUMP, realizadas tanto pela Tyr259, como pela His257. Além disso, o fosfato do dUMP interage com a Ser217, e apresenta interações com quatro argininas: a Arg40, a Arg216, a Arg167' e a Arg168'; sendo as duas últimas pertencentes à segunda subunidade da TS. Dessas, a Arg167' realiza interações também com a Tyr259; assim como a Arg216 com a Pro185 (Montfort, Finer-Moore, Maley, 1990).

O CB3717, presente no cristal, é muito semelhante ao folato, substrato da enzima, possuindo um anel PABA e um resíduo de glutamato. Elas diferem pela substituição do anel pterina, do folato, pelo anel quinazolina, no CB3717. Uma região próxima a esse anel contém, no folato, o grupo metileno, que é transferido ao dUMP durante a catálise da reação. Este grupo, no entanto, está ausente no CB3717 (Carreras & Santi, 1995).

As principais interações que envolvem o análogo do folato ocorrem com o anel quinazolina. Esse anel interage diretamente com resíduos do entorno, como o Trp101, o resíduo 104 (que em *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 é uma asparagina, mas na estrutura original do cristal seria um triptofano), a Leu184, o Asp219, a Gly223 e com o resíduo 316 (que em *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 é uma serina, mas na estrutura original é uma alanina). O Trp101, complementarmente, realiza uma ponte de hidrogênio com a Arg40. Já o motivo PABA interage, por fim, com as cadeias laterais da Ile170, Leu222, e da Phe226 (Montfort, Finer-Moore, Maley, 1990).

O conhecimento estrutural da TS é determinante para o entendimento da sua inibição. Apesar de diversos inibidores gerais, como o próprio CB3717, existirem, a ocorrência de moléculas que possuam a capacidade de inibir essa enzima de forma seletiva, apenas em *C. neoformans* e *C. gattii*, pré-estabelece uma base para o desenvolvimento de novos fármacos auxiliares no tratamento da criptococose.

1.7. *Allamantha polyantha* e a Plumieridina:

Entre as drogas aprovadas para uso e comercialização anualmente, a grande maioria consiste em moléculas naturais, descobertas no estudo de

metabólitos de organismos. Estas, em certas ocasiões, são produzidas para comercialização por síntese, quando a extração da natureza não é viável, também podendo ser modificadas com o intuito de potencializar suas funções como fármacos. Ainda assim, estes medicamentos são aprovados em proporção muito maior aos completamente sintéticos (Newman & Cragg, 2012).

A planta *Allamancha polyantha* (Alamanda-de-cerca) possui, entre seus metabólitos secundários, diversos iridóides (Figura 12), moléculas da classe dos terpenos, que são amplamente encontrados em membros do gênero *Allamancha*. Eles têm sabores amargos, servindo como meio de defesa a predadores (Bresciani, 2013).

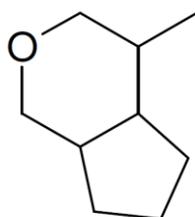


Figura 12: Unidade básica de um iridóide. Os iridóides são monoterpénoides baseados em um esqueleto ciclopentano-[C]-pirano, que geralmente possui de oito a 10 átomos de carbono (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001).

Os iridóides tem sido relacionados a diferentes potenciais bioativos, como hepatoprotetor, anti-diabético, anti-inflamatório, antitumoral, antiviral, antialérgico, antiartrítico, antibacteriano, e neuroprotetor, entre outros. Já foram descritos, também, mais especificamente para os iridóides encontrados em *Allamancha*, potencial algicida, antidermatofídico, antileucêmico e antifúngico (Bresciani, 2013; Fakhrudin et al., 2014; Xu et al., 2011).

Neste âmbito, em estudos anteriores no nosso grupo de pesquisa, foi identificada e caracterizada a atividade antifúngica no extrato aquoso de sementes de *A. polyantha*, contra *C. neoformans* e *C. gattii*. Através de cromatografia, e ressonância magnética nuclear de próton e carbono, as moléculas responsáveis por essa atividade puderam ser determinadas, correspondendo a plumieridina e o plumierideo (Figura 13) (Bresciani, 2013).

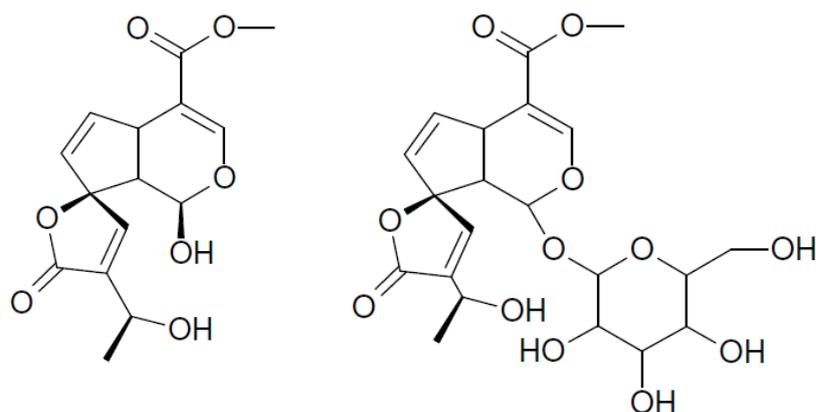


Figura 13: Moléculas da plumieridina e do plumierideo. Ambas moléculas são iridóides com potencial antifúngico, presentes no extrato aquoso de sementes de *Allamantia polyantha*.

Ambas moléculas já haviam sido, anteriormente, descritas, já sendo apontadas como moléculas ativas. O plumierideo era mais amplamente conhecido, e já possuía ação descrita como um antioxidante e antifúngico (Mone et al., 2014; Singh et al., 2014; Tiwari, Pandey & Dubey, 2002). A plumieridina, por outro lado, havia sido proposta, em um estudo, como anti-inflamatório, mas acabou não demonstrando atividade. Apesar disso, a plumericina, uma molécula muito similar a plumieridina, demonstrou este efeito, ao inibir a rota do fator nuclear kappa B (NF-κB) (Fakhrudin et al., 2014)

As duas moléculas são iridóides, sendo a plumieridina a forma aglicona do plumierideo, ou seja, trata-se da mesma estrutura, mas sem a molécula de glicose. Ambas apresentaram atividade antifúngica contra *C. neoformans* e *C. gattii*. A concentração inibitória mínima (MIC) dessas moléculas foi testada, evidenciando-se que a ação delas contra *C. gattii* é duas vezes menos efetiva que contra *C. neoformans* (Corrêa, 2016). Além disso, as duas espécies demonstraram ser menos suscetíveis a ação do plumierideo que da plumieridina (Bresciani, 2013).

Nos testes realizados, os fatores de virulência dos fungos foram atenuados pela ação dessas moléculas. Pode ser constatada uma diminuição na sua cápsula polissacarídica, e incapacidade de crescer na temperatura fisiológica dos mamíferos, quando um regime mínimo de nutrientes era aplicado (Corrêa, 2016).

Apesar dos resultados obtidos para o plumierideo, um antigo estudo já havia demonstrado a conversão dele a plumieridina por meio de hidrólise enzimática com celulasas. Isso cria a hipótese de que sua ação pode provir de uma porção convertida a plumieridina, o que corrobora com os dados obtidos nos testes, onde a concentração de plumierideo necessária para mimetizar a atividade da plumieridina, era sempre maior que a concentração desta última (Schliemann & Adam, 1982). Por este motivo, somado a abundância de plumieridina, em relação ao plumierideo, no extrato de sementes, foram definidos como prioridade os estudos que envolviam a primeira.

As principais informações obtidas no nosso grupo de pesquisa, até o momento, se limitavam a descrever a capacidade da plumieridina como um antifúngico contra *C. neoformans* e *C. gattii*. Assim, eram necessários estudos mais aprofundados, com o intuito de caracterizar o mecanismo de ação dela. Essa tarefa apresentava um alto nível de complexidade, já que não havia indícios de alvos celulares sobre os quais a plumieridina poderia estar atuando.

Tendo isto em vista, nosso grupo trabalhou no desenvolvimento de pesquisas que pudessem fornecer vislumbres deste mecanismo, para, no futuro, ter a capacidade de propor um modelo para a atividade da molécula. Nesse contexto, foi realizada a avaliação de uma biblioteca de mutantes com a plumieridina, com a finalidade de identificar mutantes com sensibilidade e resistência a ela, o que traria evidências de possíveis alvos celulares para a ação da molécula (Corrêa, 2016).

1.8. Análises *in silicio*:

De forma paralela a esse estudo, surgiu a proposta de utilizar métodos *in silicio* para predizer potenciais alvos para ação da plumieridina. Diversos estudos computacionais vêm sendo realizados na análise da ação de ligantes em proteínas (Durdagi et al., 2008; Kalathiya, Padariya & Baginski, 2015; Lu et al., 2010; Talele & McLaughlin, 2008).

Os métodos mais comuns nos estudos *in silicio* que envolvem fármacos se baseiam na técnica de *drug design* (desenho racional de fármacos). Essa técnica consiste, basicamente, em procurar uma molécula que possua a capacidade de agir sobre uma proteína de interesse. Para isso, diversas estratégias podem ser usadas. Quando o objetivo é inibir uma enzima, por

exemplo, pode-se partir dos substratos naturais da proteína, que seriam modificados com o intuito de gerar moléculas que interajam no sítio catalítico da enzima, mas não permitam a reação enzimática ocorrer. Outra opção, ainda, seria partir de inibidores já conhecidos, modificando sua estrutura com o objetivo de melhorar sua capacidade de inibição, ou permitir que ele cumpra papéis que não conseguia naturalmente, como por exemplo, aumentar a hidrofobicidade de um fármaco, com o objetivo de tentar facilitar sua passagem pela barreira hematoencefálica. Em todas situações, no entanto, o processo acaba formando um ciclo, onde a molécula é modificada, analisada computacionalmente e testada, voltando a ser modificada quando não apresenta bons resultados, seja na análise computacional, ou nos testes práticos da ação da molécula (Anderson, 2003).

Para nós, entretanto, o processo inverso parece mais interessante. Em alguns casos, ao invés de ter uma estrutura proteica que se deseja inibir, temos uma molécula para a qual desejamos prever potenciais alvos. Isso é útil em uma série de processos, como na predição de possíveis efeitos secundários de drogas, no reposicionamento de fármacos, ou no estudo da ação de moléculas naturais, para as quais se conhece o efeito, mas não se conhece o mecanismo que leva a ele. Neste sentido, programas como PharmMapper são aplicados. O objetivo é realizar a busca de possíveis proteínas alvos para a ação de um ligante, baseando-se nas características químicas que o ligante apresenta (Liu et al., 2010).

A partir da informação de uma possível proteína alvo para a ação da molécula de interesse, o objetivo passa a ser: verificar se a interação entre as duas moléculas pode efetivamente ocorrer. A técnica de *docking* (atracamento) molecular pode prover parte dessa informação, sendo possível, com ela, prever a existência de possíveis interações entre o ligante e a proteína, determinando a região onde elas ocorrem, e a conformação que o complexo formado apresenta. Somado a isto, a técnica de Dinâmica Molecular (DM) pode acrescentar informações temporais a esses dados, mostrando mudanças conformacionais da proteína ao longo do tempo, durante a interação com o ligante, além de mudanças na própria interação entre a proteína e o ligante. Assim é possível utilizar DM para refinar e otimizar os resultados obtidos no *docking* (Alonso, Bliznyuk & Gready, 2006).

Nem sempre, entretanto, a estrutura da proteína indicada como alvo está disponível, e determiná-la experimentalmente pode ser muito trabalhoso e honeroso. O Modeller, então, é capaz de criar modelos para a estrutura tridimensional de uma proteína, com base em uma estrutura conhecida de uma proteína homóloga, com alta identidade de sequência com a primeira, possibilitando esse tipo de estudo (Fiser & Sali, 2003; Liu et al., 2010; Sali & Blundell, 1993).

1.8.1. PharmMapper:

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa determinaram duas moléculas com atividade sobre *C. neoformans* e *C. gattii*. O alvo molecular delas, no entanto, não é conhecido, havendo a necessidade do uso de ferramentas como o PharmMapper, que consiste em um servidor que identifica potenciais candidatos a alvos para ação de pequenas moléculas, através do método de mapeamento dos seus farmacóforos. Para isso, ele se baseia em um banco de dados próprio, chamado PharmTargetDB, que foi criado através do processamento dos bancos de dados DrugBank (Wishart et al., 2007), BindingDB (Liu et al., 2007), PDBind (Wang et al., 2004) e PDDT (Gao et al., 2008), que contém informações sobre o modo de ligação entre proteínas e seus ligantes. Destes bancos foram obtidas as proteínas que possuíam estruturas no Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000). Posteriormente, a partir dessas proteínas, foram extraídas as informações relativas aos farmacóforos da molécula na interação com a proteína, os quais foram utilizados na construção de modelos de farmacóforos (Liu et al., 2010).

O uso do servidor se baseia em uma molécula inicial, de pequeno tamanho, que é submetida como entrada do algoritmo. A partir desta molécula, uma técnica de mapeamento reverso de farmacóforos é aplicada, onde a molécula é alinhada, de forma flexível, aos modelos de farmacóforos presentes no banco de dados. Cada alinhamento recebe um valor de pontuação, pelo qual os resultados são ordenados. Como resultado, o servidor proporciona como resposta, após um tempo que varia de uma a duas horas, uma tabela contendo os dados das estruturas apontadas como potenciais alvos, assim como o acesso a informações em diferentes bancos de dados (Liu et al., 2010).

1.8.2. Modeller:

O Modeller é um programa utilizado na modelagem comparativa de proteínas. Para realizar a modelagem é necessário disponibilizar ao programa uma estrutura tridimensional conhecida de uma ou mais proteínas a serem utilizadas como moldes, assim como o alinhamento das sequências de aminoácidos dos moldes com a sequência que se deseja modelar. Para garantir a qualidade do modelo produzido, o alinhamento necessita apresentar uma identidade de pelo menos 30% distribuída em toda a sequência (Fiser & Sali, 2003).

A metodologia empregada pelo Modeller é chamada de modelagem comparativa por satisfação de restrições espaciais. Este método consiste em obter, da estrutura molde fornecida, as restrições das distâncias e dos ângulos diedros da sequência alvo, para o qual se leva em conta a identidade entre as proteínas, verificada no alinhamento (Fiser & Sali, 2003).

Além disso, as restrições estereoquímicas, como os comprimentos das ligações, e os ângulos das ligações, são obtidas do campo de força CHARMM-22 (Mackerell et al., 1998). Também são importadas restrições relativas à preferência estatística dos ângulos de diedro, e distâncias atômicas de átomos não ligados, que são retirados de um conjunto representativo de todas as estruturas protéicas conhecidas. Tendo adquiridas todas as informações necessárias, o modelo é calculado por um método de otimização baseado em gradiente conjugado e Dinâmica Molecular, de maneira a minimizar as violações nas restrições espaciais definidas (Fiser & Sali, 2003).

As alças da proteína ausentes no molde são modeladas com uma abordagem diferente do restante da estrutura tridimensional. O método aplicado, neste caso, é a modelagem *ab initio*, com uma busca conformacional entre as possíveis conformações, que é guiada por pontuações baseadas em uma pseudo-função de energia. Esta pseudo-função corresponde à soma de alguns termos do campo de força CHARMM-22, junto a restrições espaciais baseadas nas distribuições de distâncias e de ângulos diedros, presentes em estruturas conhecidas de proteínas (Fiser & Sali, 2003).

1.8.3. Atracamento (*Docking*) Molecular:

O *docking* molecular é uma técnica utilizada na predição da interação entre duas moléculas, podendo ser, por exemplo, um ligante e uma proteína, ou duas proteínas. Diversos programas de *docking* encontram-se disponíveis hoje, entre os quais muitos são servidores *online* (Vaqué et al., 2008).

Cada programa possui sua própria metodologia para *docking*, mas em geral todas podem ser divididas em duas etapas: a primeira, onde é realizada a busca de uma possível conformação ligante-receptor; e a segunda, onde a conformação é pontuada, com o objetivo de ordenar os melhores resultados e guiar a busca por conformações (Vaqué et al., 2008).

Com objetivo de diminuir o custo computacional relacionado com o cálculo dos termos de interação ligante-receptor, geralmente é implementado o uso de malhas, ou grades, de potenciais. Nestas, o espaço que pode ser ocupado pelo ligante é convertido em uma malha de pontos tridimensionais. Cada ponto possui, pré-calculado, os termos da função utilizada na pontuação das conformações de *docking*. Assim, definem-se as células da malha, que correspondem aos cubos formados por oito destes pontos. Quando um átomo encontra-se presente em uma célula da malha, a pontuação relativa a ele é calculada pela interpolação dos valores armazenados nos oito pontos que constituem a célula. Como consequência, torna-se desnecessário recalculá-los os termos da função de pontuação toda vez que uma nova conformação de interação é gerada, o que corresponderia a calcular os termos da função para cada átomo do ligante, em relação a todos os átomos da proteína, gerando um grande custo computacional (Guedes, Magalhães & Dardenne, 2014).

Existem diversas possíveis variações encontradas entre os programas que realizam o *docking* molecular. Alguns permitem flexibilidades na proteína. Esses, contudo, são bem mais raros, e geralmente não são projetados para serem disponibilizados como ferramentas *online*, em função de seu alto custo computacional (Morris et al., 2009). Neste trabalho utilizamos dois servidores *online* de *docking* que consideram o receptor uma molécula rígida: o SwissDock (Grosveldier, Zoete & Michielin, 2011a, 2011b), e o PatchDock (Schneidman-Duhovny et al., 2005).

Programas, como PatchDock, realizam o *docking* considerando que tanto ligante quanto a proteína são moléculas rígidas, resumindo a técnica a encontrar a melhor orientação do ligante em relação à proteína. Esta foi a

metodologia empregada nos primeiros programas de *docking* realizados, já que, como os graus de liberdade da busca se resumem aos de translação, e rotação, do ligante, o custo computacional é extremamente baixo (Duhovny, Nussinov & Wolfson, 2002; Taylor, Jewsbury & Essex, 2002; Vaqué et al., 2008).

Por outro lado, quando se considera para o *docking* a flexibilidade, o custo computacional associado passa a ser maior, aumentando proporcionalmente ao número de ligações flexíveis presentes no ligante. Esta técnica, porém, é a mais encontrada entre os atuais programas de *docking*, pois, ao flexibilizar o ligante, consegue representar melhor as possibilidades reais do atracamento da molécula, aumentando a precisão do resultado obtido. Esta é a abordagem aplicada pelo SwissDock (Grosdidier, Zoete & Michielin, 2011; Taylor, Jewsbury & Essex, 2002; Vaqué et al., 2008).

Somado a característica de flexibilidade do ligante, os programas podem variar, também, no método de busca das conformações ligante-receptor. No caso dos programas utilizados, as técnicas empregadas são a complementaridade de forma, pelo PatchDock, e um método baseado em algoritmo evolutivo multiobjetivo, pelo SwissDock (Duhovny, Nussinov & Wolfson, 2002; Grosdidier, Zoete & Michielin, 2011; Vaqué et al., 2008).

No caso do PatchDock, de maneira geral, tanto a proteína quanto o ligante são mapeados, definindo formas locais ao longo das moléculas, que podem ser côncavas, convexas, ou planas. Assim, a busca por locais de interação é simplificada, já que são apenas consideradas as regiões de formatos complementares. Isto significa, por exemplo, que regiões côncavas do ligante apenas serão ancoradas em regiões convexas ou planas da proteína, e vice-versa (Duhovny, Nussinov & Wolfson, 2002).

Já no caso do SwissDock, a proteína é primeiramente mapeada, gerando-se uma malha tridimensional. Após isso, as cavidades encontradas nessa malha são analisadas. Se o número de possíveis átomos que podem ser acomodados em uma cavidade é menor que metade do número de átomos do solvente, ela é descartada. Em seguida as cavidades são filtradas, eliminando-se as que estão muito próximas uma da outra (Grosdidier, Zoete & Michielin, 2011b).

O método para a geração dos modos de ligação é então aplicado. A molécula é posicionada próxima a uma cavidade, e seus átomos centrais são

definidos. Os grupos ao redor deste são rotados de forma a eliminar colisões com os átomos da proteína, o que é repetido até que nenhuma colisão seja evidenciada (Grosdidier, Zoete & Michielin, 2011b)

Em ambos programas os resultados são pontuados por métodos próprios, que visam discriminar as qualidades das interações geradas. Esta pontuação é utilizada para ordenar a apresentação dos possíveis modos de interação entre o ligante e a proteína, que geralmente são agrupados com o objetivo de eliminar resultados muito similares (Duhovny, Nussinov & Wolfson, 2002; Grosdidier, Zoete & Michielin, 2011b).

1.8.4. Dinâmica Molecular, GROMOS e o GROMACS:

A DM consiste em um método computacional onde forças instantâneas presentes em um sistema molecular mecânico, assim como os movimentos derivados do sistema e das forças, são calculados repetidas vezes, numa série de iterações tempo-dependentes. O sistema molecular mecânico consiste em um conjunto de partículas que se movem devido às interações que ocorrem entre si, e de acordo com as equações de movimento newtonianas, da mecânica clássica (Adcock & Mccammon, 2006).

Cada partícula representa um átomo, ou um conjunto de átomos, e é tomada como um ponto de massa no espaço cartesiano. Assim, não são considerados todos os fatores físicos, ou quânticos, do sistema. Para um átomo i , com massa m_i , e posição indicada por um vetor tridimensional r_i , a relação entre a velocidade do átomo e seu momentum p_i é:

$$\frac{dr_i}{dt} = \frac{p_i}{m_i} \quad (1)$$

Considerando um tempo específico t e um curto intervalo finito Δt a posição do átomo i será dada por:

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \frac{dr_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{d^2r_i(t)}{dt^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (2)$$

Para resolução da equação de movimento, os primeiros três termos da equação podem ser considerados suficientes, onde $r_i(t)$ representa a posição inicial, $\frac{dr_i(t)}{dt}$ a velocidade, e $\frac{d^2r_i(t)}{dt^2}$ a aceleração. A solução desta equação para todos os átomos do sistema, nos diversos passos de integração, durante o tempo de simulação, corresponderá ao conjunto temporal de coordenadas

cartesianas que compõem a trajetória do sistema. A aceleração ainda pode ser substituída, de acordo com a segunda lei de Newton, por:

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i}{m} \quad (3)$$

Onde F_i é a força nesta sobre o átomo i (Adcock & Mccammon, 2006).

Assim, para que seja calculada a próxima localização do átomo i , será necessário determinar o módulo e a direção de F_i , que pode ser definida como:

$$F_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} V(r_1, r_2, r_3, \dots, r_n) \quad (4)$$

$V(r)$ é a energia potencial em respeito aos átomos (1, 2, 3, ..., n). O cálculo da energia potencial varia segundo o campo de força, sendo composto por diferentes parâmetros. Neste estudo utilizamos o campo GROMOS 53A6 (Oostenbrink et al., 2004). Discriminaremos a seguir os parâmetros específicos utilizados no cálculo da energia potencial deste campo de força. A energia potencial na coordenada r é composta por uma componente que representa interações atômicas físicas, e outra que corresponde a interações não físicas, como restrições espaciais (Oostenbrink et al., 2004):

$$V(r) = V^{fis}(r) + V^{nfis}(r) \quad (5)$$

Expandindo o termo que considera interações físicas, obteremos:

$$V^{fis}(r) = V^{ilig}(r) + V^{inilig}(r) \quad (6)$$

$V^{ilig}(r)$ representa a energia potencial de todas as interações de ligação, e $V^{inilig}(r)$ de todas não associadas à ligação. São elas:

$$V^{ilig}(r) = V^{lig}(r) + V^{ang}(r) + V^{idia}(r) + V^{tdia}(r) \quad (7)$$

$$V^{inilig}(i, j) = \sum_{\text{pares}} \left[\frac{C_{12}(i, j)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(i, j)}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}} \right] \quad (8)$$

Onde ij são pares de átomos, C_{12} e C_6 dependem do tipo de átomo e do caráter da interação, assim como ϵ_0 e ϵ_r representam a permissividade dielétrica no vácuo, e no meio de simulação, respectivamente. Tomando cada termo de $V^{ilig}(r)$ separadamente, temos inicialmente $V^{lig}(r)$, que representa o potencial de energia causado por ligações covalentes, e pode ser calculado como:

$$V^{lig}(r) = \sum_{\text{ligação}} \frac{1}{4} K_b [b^2 - b_0^2]^2 \quad (9)$$

Já $V^{ang}(r)$ corresponde à energia potencial nos ângulos das ligações covalentes:

$$V^{ang}(r) = \sum_{\hat{angulo}} \frac{1}{2} K_{\theta} [\cos \theta - \cos \theta_0]^2 \quad (10)$$

Nessas duas equações, (9) e (10) os parâmetros K_b e K_{θ} foram derivados experimentalmente de espectroscopia, assim como b e θ de difração de raios-X (Oostenbrink et al., 2004).

O terceiro termo da energia potencial das interações de ligação é o potencial devido a diedros impróprios:

$$V^{idia}(r) = \sum_{\substack{diedros \\ impr\u00f3rios}} \frac{1}{2} K_{\xi} [\xi - \xi_0]^2 \quad (11)$$

Onde K_{ξ} e ξ são definidos sobre tipos de ângulos diedros predefinidos. Por fim, o último termo dessa equação representa a energia potencial devido a torções de diedros próprios:

$$V^{tdia}(r) = \sum_{diedros} K_{\varphi} [1 + \cos(\delta) \cos(n\varphi)] \quad (12)$$

Nesta equação, o parâmetro δ representa o deslocamento de fase, podendo ser 0 ou π , n é a multiplicidade do ângulo diedro de torção e φ é o próprio ângulo φ . A variável r foi utilizada em todas as equações anteriores de maneira a simplificar sua representação, podendo assumir os valores das coordenadas de dois ou mais átomos, dependendo da equação (Oostenbrink et al., 2004).

O GROMACS (GRoningen Machine for Chemical Simulations – Máquina de Groningen para simulações químicas) consiste em um pacote de programas destinado a execução, manuseio e análise de simulações de DM. Baseado em um programa anterior, do mesmo grupo, o campo de força GROMOS, foi originalmente destinado a simulações de bio-macro-moléculas, como proteínas, lipídeos, e DNAs. O programa se destacou, desde o início, pela otimização de seus algoritmos, que torna o programa um dos mais rápidos para a realização de simulações por DM, permitindo, como consequência, a simulação de grandes sistemas, e de sistemas solvatados, o que inicialmente representava um importante diferencial do programa. Sua rápida velocidade, o fato do programa ser disponibilizado em código aberto, os vários *scripts* integrados ao programa para manuseio e análise dos seus dados, a vasta gama de campos de força oferecidos nativamente por ele, a facilidade da edição dos parâmetros usados nesses campos, entre outros fatores, tornaram o GROMACS um dos

pacotes de simulação mais populares destinado a DM no mundo (Van der Spoel et al., 2005; Kutzner et al., 2007).

2. Justificativa:

A criptococose, atualmente, é uma das principais infecções fúngicas em humanos, e está entre as principais causas de mortalidade nos pacientes acometidos com SIDA (Krysan, 2015). Estima-se que os fungos causadores desta patologia são responsáveis por 13-44% dos óbitos dos pacientes portadores do HIV, totalizando mais de meio milhão de pessoas por ano (Park et al., 2009).

Em regiões onde o acesso aos ARTs é limitado, e o tratamento da SIDA é precário, como na África subsaariana, as mortes ocorridas em por causa da criptococose atingem números mais elevados que as causadas pela tuberculose. Essa conta também se aproxima ao número de mortes em decorrência de diarreia, malária e a soma das mortes decorrentes de doenças infantis, como poliomielite, difteria, tétano, coqueluche e rubéola (Park et al., 2009).

Além disso, os tratamentos disponíveis estão geralmente associados a efeitos secundários, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Yao et al., 2014). Também se encontra descrita, nos fungos, a aquisição de resistência aos principais medicamentos usados nestes tratamentos (Gullo et al., 2013; Xie et al., 2014). Agravando ainda mais a situação, o custo associado aos métodos de tratamento mais eficazes é elevado, sendo muitas vezes necessário recorrer a opções mais baratas e menos eficientes (Rajasingham, 2012). Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento da criptococose.

3. Objetivos:

Ante o exposto, o objetivo deste trabalho consiste em identificar, por métodos *in silicio*, possíveis proteínas alvos para a molécula da plumieridina, um potencial antifúngico com atividade em *C. neoformans* e *C. gattii*, a fim de guiar sua caracterização experimental *in vitro*, e facilitar a determinação do seu mecanismo de ação. Para tanto, teremos como ponto de partida a estrutura bidimensional da molécula da plumieridina.

Assim, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- 3.1. Desenhar a estrutura tridimensional da molécula da plumieridina;
- 3.2. Otimizar a estrutura obtida, através da minimização de sua energia;
- 3.3. Predizer as possíveis proteínas alvos da molécula plumieridina, utilizando o servidor PharmMapper;
- 3.4. Realizar a modelagem comparativa das proteínas alvos, para a obtenção de seus modelos em *C. neoformans* e *C. gattii*;
- 3.5. Realizar o *docking* molecular com a plumieridina nas proteínas previstas como alvo, verificando seus possíveis locais de interação;
- 3.6. Efetuar e analisar a Dinâmica Molecular (DM) com os resultados do *docking*, visando caracterizar a interação ligante-receptor.

4. Materiais e Métodos:

A Figura 14 apresenta um fluxograma que resume a metodologia empregada em nosso estudo, que será descrita em detalhes a seguir.

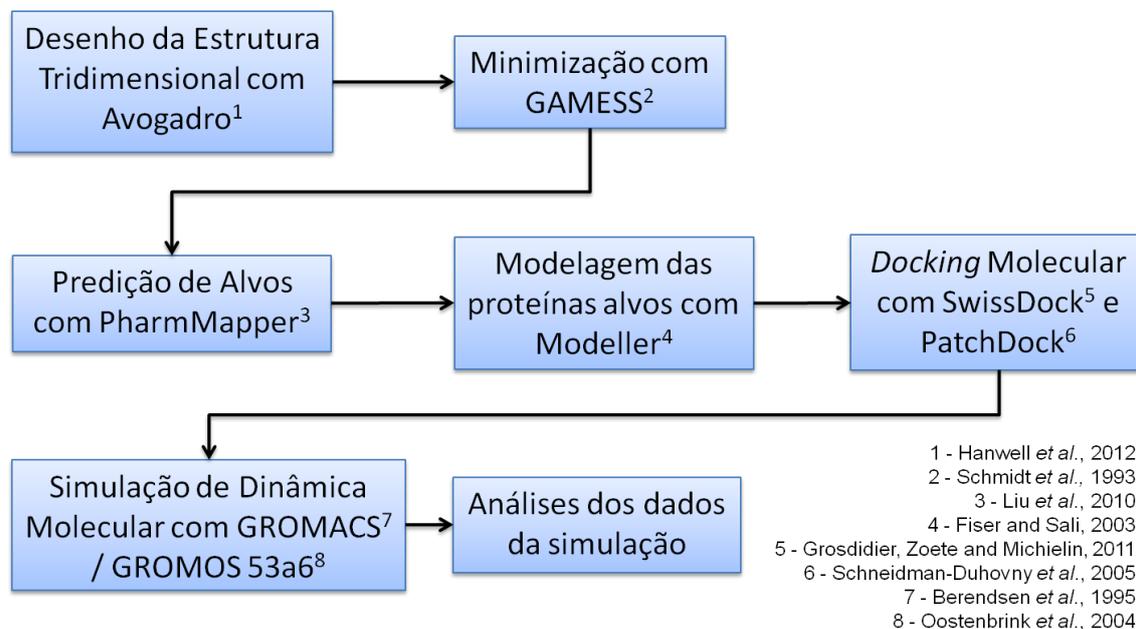


Figura 14: Fluxograma da metodologia empregada em nosso estudo.

4.1. Desenho e minimização das estruturas tridimensionais:

A partir da forma estrutural plana da molécula da plumieridina, sua estrutura tridimensional foi desenhada, usando o programa Avogadro, uma avançada plataforma para edição, construção, visualização e análise de moléculas (Hanwell *et al.*, 2012). Com o mesmo programa, preliminarmente, o desenho da molécula foi otimizado, através da minimização de sua energia. Esta foi realizada com o campo de força UFF (Rappe *et al.*, 1992), usando o algoritmo *steepest descent*.

Feito isto, em colaboração com o professor Mendeli Vainstein (Instituto de Física, UFRGS), a minimização da estrutura com o pacote de programas GAMESS (Schmidt *et al.*, 1993) foi utilizado no intuito de refinar, de maneira robusta, a estrutura desenhada para a plumieridina. Para tanto, a otimização foi efetuada usando o método de Hartree-Fock, com a base de cálculo quântico 3-21G de dupla precisão. A molécula resultante desta primeira otimização foi utilizada em um novo refinamento, com o mesmo método, mas desta vez com a base 6-31G, também de dupla precisão. Após a otimização da estrutura, o

servidor ATB (Malde et al., 2011) foi usado para obter os parâmetros de topologia do ligante (Apêndice 2), que foram usados posteriormente na DM.

4.2. Predição de alvos potenciais:

A estrutura final da plumieridina, após todos os refinamentos, foi submetida para o servidor PharmMapper, para a predição de possíveis estruturas alvos para sua ação. Para tanto, foi utilizada a geração de confôrmeros, com um número máximo de 300 conformações, e a busca foi realizada com base nos alvos de todos os organismos do banco de dados. As 50 melhores estruturas apontadas pelo PharmMapper foram selecionadas para as etapas seguintes do trabalho. Dentre elas, verificamos as que estavam presentes em fungos, e que possuíam homólogos em *C. neoformans* e *C. gattii*, descartando todas as que não cumprissem algum desses critérios. Posteriormente, foi realizado um levantamento de informações da literatura, para definir quais seriam estudadas pelos métodos subsequentes.

4.3. Modelagem comparativa:

Desta maneira, foi possível identificar três proteínas, entre as indicadas como alvos para a ação da plumieridina. Destas, todas pertenciam à rota das Pirimidinas. Entre elas, a que possuía a melhor avaliação foi a TS e por isso foi selecionada como foco inicial de nosso estudo. A sequência FASTA da TS foi obtida no banco de dados de proteínas do NCBI para *C. neoformans* (XP_012052150.1) e *C. gattii* (KGB75127.1). Em seguida, estas sequências foram utilizadas como entrada no blastp do NCBI (Johnson et al., 2008), limitando a busca a estruturas descritas no PDB, com o objetivo de obter proteínas moldes que possibilitassem a modelagem.

Dentre os possíveis moldes, foram selecionados os que apresentavam, além de fortes indicativos homologia, uma melhor relação entre identidade e cobertura de sequência. Assim, foi escolhida a estrutura tridimensional de uma timidilato sintase de *C. neoformans*, identificada pela técnica de difração de raio-X, com resolução de 2,08 Å. Esta foi utilizada tanto para modelagem de *C. neoformans* quanto para de *C. gattii*. As sequências de aminoácidos das

proteínas dos fungos foram, então, alinhadas com a da proteína molde, utilizando-se para isso o CLUSTAL W com a matriz de pesos BLOSUM (Henikoff & Henikoff, 1992), penalidade de abertura de gap de 10.0, e de extensão de 0.1 (Thompson, Higgins, Gibson & 1994).

Tendo este alinhamento em mãos, junto à estrutura da proteína molde, foram realizadas as modelagens com o programa Modeller 9.15 (Sali & Blundell, 1993). Neste processo foi aplicado um refinamento com DM lenta, e o ciclo de otimização foi repetido duas vezes, com um *cutoff* de 1E6. Cinco proteínas foram geradas para cada modelo, sendo, então, analisadas com os programas MolProbity (Davis et al., 2007) e Swiss-Model (Arnold et al., 2006), com o objetivo de determinar a qualidade dos modelos a partir da estereoquímica e de uma análise teórica, como preconizado pelos idealizadores do Modeller.

4.4. *Docking* Molecular:

O *docking* molecular foi, portanto, realizado com o melhor modelo de cada proteína, no qual foi atracada a molécula tridimensional, devidamente refinada, da plumieridina. Dois servidores *online* de *docking* foram usados inicialmente, o SwissDock e o PatchDock. O SwissDock foi realizado utilizando o tipo de *docking* “preciso”, e sem flexibilidade nas cadeias laterais da proteína. Já o PatchDock utilizou um RMSD de 4.0 Å para o agrupamento, e o tipo do complexo “padrão”. Dessa maneira, quatro atracamentos foram realizados, um para proteína de cada organismo, em ambos servidores.

Posteriormente, as posições de interação previstas em cada servidor foram comparadas, sobrepondo visualmente os resultados. Para posições de interações semelhantes entre os servidores foram criados conjuntos conformacionais, e três delas foram escolhidas para o passo seguinte do estudo. A escolha das posições se baseou tanto na abundância de predições para certos locais da proteína, quanto em informações previamente obtidas na literatura, como a localização do sítio catalítico.

4.5. Dinâmica Molecular (DM):

Após ter escolhido as três diferentes posições de interação entre a plumieridina e a timidilato sintase, as simulações de DM foram preparadas. Foi

realizada uma DM para cada uma das três posições de interação na proteína de cada fungo, totalizando seis DMs. Também foi simulada uma proteína, na ausência de ligantes, para cada organismo, somando mais duas a esse total.

Para isto, o pacote de programas GROMACS 4.5.7 (Berendsen, Spoel & Drunen, 1995) foi utilizado para a realização das DMs, com o campo de força GROMOS 53a6 (Oostenbrink et al., 2004). A TS, na presença ou ausência do ligante, passou inicialmente por uma minimização de energia sem água, pelo método de gradiente conjugado, seguido de uma nova minimização, pelo método de “descida oblíqua” ou *steepest descent*. Posteriormente, o complexo foi solvatado em água, representada pelo modelo *Simple Point Charge* (SPC) (Berendsen, Grigera & Straatsma, 1987), em uma caixa de simulação triclínica, com tamanho estipulado de um nanômetro entre a proteína e os limites da caixa, utilizando condições periódicas de contorno. Em seguida, moléculas do solvente foram substituídas por contra íons Na^+ nas quantidades necessárias para que as cargas totais dos sistemas fossem neutralizadas. Por fim, foram aplicadas novamente as minimizações com gradiente conjugado e *steepest descent*.

A seguir, foi efetuada a termalização do complexo. Esta consistiu em sete passos: um passo inicial de um picosegundo, onde a temperatura foi inicializada em 50 K, e os átomos estavam sob restrição espacial; seguida de um passo de nove picosegundos, onde a restrição espacial foi retirada, e a temperatura mantida constante; e mais cinco passos de cinco picosegundos, onde a temperatura foi elevada gradativamente em 50 K por passo, até alcançar 300 K.

Após a etapa de termalização, seguiu-se o alongamento da DM. Devido às condições de cultivo do fungo, a temperatura foi elevada a 310 K (37° C), e mantida constante, assim como a pressão, por meio de constantes de acoplamento de $\tau = 0.1$ e $\tau = 0.5$ ps, respectivamente. O método de LINCS (Hess et al., 1997) foi utilizado na restrição de ligações covalentes, e o cálculo das interações eletrostáticas foi realizado com o modelo Particle Mesh Ewald (Darden, York & Pedersen, 1993). A constante dielétrica para o meio foi definida como $\epsilon = 1$, e os raios de cortes de Coulomb e van der Waals foram de 9 Å. O arquivo com todos os parâmetros encontra-se exposto no apêndice 3.

Todas as simulações deveriam ser alongadas até 100 ns, em etapas formados por 500 mil passos, com tempo de integração de dois femtossegundo, configurando 100 passos de um nanosegundo. Entretanto, o progresso das DMs foi condicionado ao estado de interação da plumieridina à TS, sendo abortadas todas as simulações onde ela deixasse de ocorrer. Ocasionalmente, no intuito de acomodar proteína e ligante, foi necessário realizar passos com um milhão de *steps*, e tempo de integração de um femtossegundo, uma vez que a rigidez do ligante causava um grande distanciamento de átomos ligados que por vezes ultrapassava os limites estabelecidos no programa, fazendo-se necessário utilizar passos de simulação menores.

4.6. Análises dos Dados:

Ao final dos 100 ns de cada simulação, foram realizadas análises sobre os dados gerados. De forma geral, foram analisados: o desvio médio quadrático dos átomos da proteína (RMSD), a flutuação média quadrática dos resíduos de aminoácido da proteína (RMSF), o raio de giro da proteína (RGIRO), e a energia de interação ligante-receptor entre a plumieridina e a proteína; todos por intermédio de programas do próprio pacote GROMACS 4.5.7.

Durante o decurso da simulação, também foram analisadas: a conservação da estrutura secundária das proteínas, utilizando, para tanto, o servidor PDBSum (Laskowski et al., 1997) e o programa DSSP (Kabsh & Sander, 1983); e as interações entre os átomos da plumieridina e da proteína, mediante análises do LigPlot (Wallace, Laskowski & Thornton, 1996).

5. Resultados e Discussão:

5.1. Desenho e otimização da estrutura da plumieridina:

Inicialmente a estrutura tridimensional da plumieridina foi desenhada, a partir da fórmula estrutural, com o programa Avogadro, e otimizada com o programa GAMESS (Figura 15). Após os dois ciclos de otimização podemos observar uma sutil variação na estrutura após a otimização, que gerou um RMSD de 0.514 Å. Grande parte da variação observada esteve centrada na ramificação ligada ao anel iridóide da molécula, como pode ser observado na sobreposição das moléculas na Figura 15.

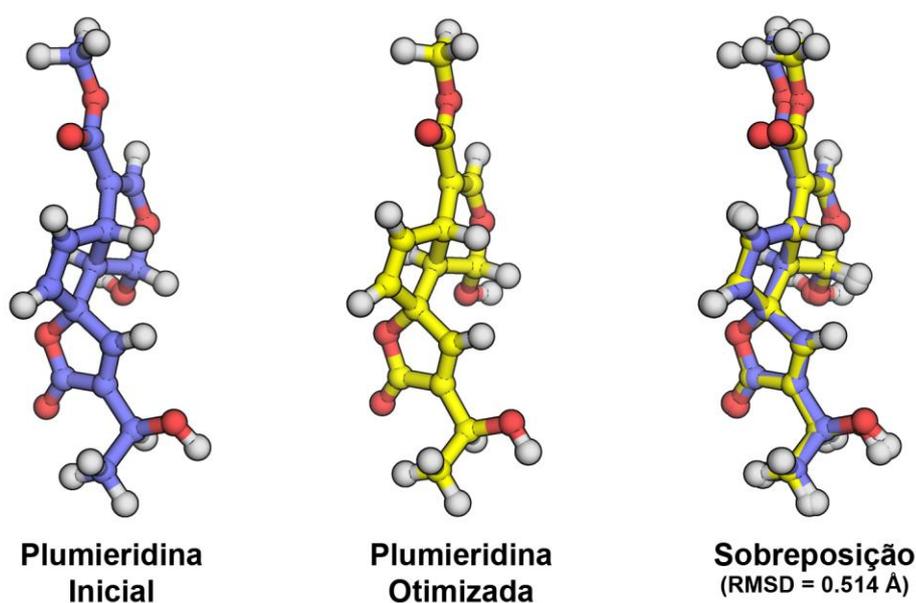


Figura 15: Otimização da Estrutura da plumieridina. Em azul, a molécula desenhada no programa Avogadro. Em amarelo, a molécula após otimização com GAMESS. O RMSD entre os átomos da estrutura inicial e final apresentou valor de 0.514 Å.

A pequena variação observada na molécula indica que a otimização prévia, realizada no Avogadro com o campo de força UFF, conseguiu, satisfatoriamente, aproximar a molécula de sua conformação de menor energia. Este dado condiz com o estudo realizado sobre a aplicabilidade do campo de força UFF em moléculas orgânicas, onde se demonstrou sua efetividade nas ocasiões em que forças eletrostáticas não são de suma importância para a conformação da molécula (Rappe et al., 1992), apesar do

método quântico haver se mostrado ainda mais eficaz, realizando pequenas correções na estrutura da plumieridina.

5.2. Predição de potenciais alvos para a ação da plumieridina:

A estrutura otimizada da plumieridina foi então submetida ao servidor do PharmMapper, para a predição de potenciais estruturas alvos para a sua ação. Tabelas ordenadas por diferentes parâmetros foram geradas, e os 50 melhores resultados foram avaliados (Tabela 1 e Apêndice 4), checando sua presença em fungos e em mamíferos.

Tabela 1: Estruturas preditas pelo servidor do PharmMapper. Nas duas últimas colunas, os “X” indicam a presença da proteína em mamíferos ou fungos. Os “-“ indicam ausência ou inaplicabilidade. Encontram-se destacadas (**negrito**) as proteínas pertencentes à rota das pirimidinas.

Nº	Proteína Alvo	Fit Score	Mamíferos	Fungos
1	Não identificada *	4,873	-	-
2	Timidilato sintase thyX	4,857	X	X
3	Proteína periplasmática ligadora de maltose	4,854	X	X
4	Congerina-1	4,408	-	-
5	Aspartato aminotransferase	4,364	X	X
6	Streptavidina	4,200	-	-
7	Streptavidina	4,097	-	-
8	Streptavidina	3,971	-	-
9	Histona acetiltransferase ESA1	3,904	X	X
10	Hipoxantina fosforribosil transferase	3,870	X	X
11	Família sulfotransferase citosólica 2B membro 1	3,870	X	-
12	Streptavidina	3,821	-	-
13	2,2-dialquila-glicina descarboxilase	3,806	-	X
14	Lectina B4	3,805	-	-
15	Timidilato sintase	3,781	X	X
16	Urocanato hidratase	3,759	X	X
17	Ciclomaltodextrina glucanotransferase	3,750	-	-
18	Fucoatina	3,750	-	-
19	Não identificada *	3,745	-	-
20	Poliproteína gag-pol	3,741	X	X
21	Diidroorotate desidrogenase A	3,735	X	X
22	Orotidina 5'-fosfato descarboxilase	3,734	X	X
23	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase	3,710	X	X
24	Ribonuclease T1 guanil específica	3,671	-	X
25	Ribonucleosideo-trifosfato redutase anaeróbica	3,665	X	X

26	Adenilosuccinato sintetase isoenzima 1	3,653	X	-
27	Lectina fucose específica	3,650	-	X
28	Fosfopanteteína adenililtransferase	3,644	X	X
29	Não identificada *	3,636	-	-
30	Inosina-5-monofosfate desidrogenase	3,628	-	-
31	Streptavidina	3,625	-	-
32	Polipeptídeo pentafuncional AROM	3,621	-	-
33	Lectina Manose/glicose específica Cramoll	3,606	-	-
34	Inosina-5-monofosfate desidrogenase	3,587	-	-
35	Provavel galactose-1-fosfato uridil transferase	3,576	-	-
36	Fenilalanina-4-hidroxilase	3,574	-	-
37	1-desoxi-D-xilulose 5-fosfate redutoisomerase	3,568	-	-
38	Não identificada *	3,547	-	-
39	Endo-1,4-beta-xilanase	3,536	-	-
40	Poliproteína gag-pol	3,535	X	X
41	Streptavidina	3,524	-	-
42	Ribonuclease pancreática	3,524	-	-
43	Poliproteína gag-pol	3,519	X	X
44	PTPN1	3,515	-	-
45	Streptavidina	3,510	-	-
46	Glutaciona S-transferase Mu 2	3,485	-	-
47	Poliproteína gag-pol	3,474	X	X
48	Streptavidina	3,474	-	-
49	Streptavidina	3,448	-	-
50	HINT1	3,413	-	-

(*) Corresponde a estruturas que não possuem identificação, mas foram preditas pelo servidor como potencial alvo para a molécula.

Dentre os resultados, procuramos inicialmente por proteínas que estivessem presentes apenas em fungos, não ocorrendo, em mamíferos, indicando potenciais alvos para ação de fármacos, segundo o conceito de Paul Ehrlich. Dessa maneira encontramos três enzimas: a ribonuclease T1 guanil específica, a lectina fucose específica, e a 2,2-dialquila-glicina descarboxilase. Entretanto, em uma busca refinada, visando encontrar as mesmas em nossas espécies de interesse, as duas primeiras não apresentaram possíveis homólogos, quando comparadas ao genoma de *C. neoformans* e *C. gattii*. Encontramos, entretanto, no genoma de *C. neoformans* H99, uma proteína que apresentava aproximadamente 30% de identidade com a sequência da 2,2-dialquila-glicina descarboxilase de outros fungos. Esta, contudo, não encontrava-se anotada, não nos permitindo garantir sua homologia.

Analisamos, portanto, as proteínas que estavam presentes tanto em fungos, como em mamíferos. Desta forma, encontramos 12 diferentes enzimas. Procuramos, novamente, por homólogos nas linhagens estudadas, não sendo possível encontrá-los para sete dessas proteínas: a proteína periplasmática ligadora de maltose, a hipoxantina fosforribosil transferase, a urocanato hidratase, a poliproteína gag-pol, a hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, a ribonucleosídeo trifosfato redutase anaeróbica, e a fosfopanteteína adeniltransferase.

Dentre as cinco proteínas que apresentaram homólogos em *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265, encontravam-se a aspartato aminotransferase, a histona acetiltransferase, e três proteínas pertencentes à rota de síntese de nucleotídeos pirimidínicos: a orotidina 5'-fosfato descarboxilase (OMPD) e a diidroorotato desidrogenase A (DHODH), pertencentes à rota de síntese de novo de pirimidinas, e a timidilato sintase (TS), enzima chave na síntese de novo de dTTP, que, além de ser a melhor colocada entre as proteínas preditas, apresentou duas variedades entre os resultados.

A implementação do PharmMapper compara os farmacóforos de uma molécula submetida, aos farmacóforos de ligantes de proteínas, indicando as proteínas desses ligantes como possíveis alvos, quando identifica similaridade entre ambos farmacóforos (Liu et al., 2010). Tendo isso em vista, a presença de três proteínas da rota das pirimidinas entre os resultados do servidor parece ser um indicativo de que a estrutura da molécula da plumieridina deve ser semelhante às principais estruturas das diversas moléculas intermediárias na rota das pirimidinas. Este é um forte indício da possibilidade de uma das três proteínas preditas pelo servidor ser, efetivamente, o alvo da ação da plumieridina nas leveduras estudadas. Frente ao exposto, e levando em consideração que uma destas enzimas já é alvo molecular de um fármaco usado no tratamento da criptococose, decidimos seguir o estudo baseando-se nas proteínas presentes nessa rota.

5.3. Modelagem Molecular de potenciais alvos:

As três proteínas da rota das pirimidinas preditas pelo PharmMapper apresentaram homólogos nas linhagens estudadas. A TS e a OMPD apresentaram, também, possíveis estruturas moldes no PDB, com identidade e

cobertura de sequência adequadas para ambas linhagens, possibilitando sua modelagem (Tabela 2). Já a DHODH apresentou estrutura molde adequada apenas para *C. gattii* R265, não possuindo nenhuma estrutura molde com cobertura de sequência adequada para *C. neoformans* H99, o que inviabilizou a modelagem por homologia da proteína dessa linhagem.

Tabela 2: Resultados do Blast. A tabela apresenta os resultados obtidos através do Blast das sequências das proteínas da rota das pirimidinas de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 contra o PDB.

Proteínas	H99		R265	
	Identidade	Cobertura	Identidade	Cobertura
TS	97%	100%	96%	100%
OMPD	52%	97%	51%	92%
DHODH	49%	67%	48%	92%

A TS aparece em duas variedades entre os resultados, estando, em ambos casos, melhor posicionada que as demais proteínas da rota das pirimidinas. Essa enzima é um dos alvos no mecanismo de ação da flucitosina, antifúngico eficaz contra criptococose, sendo inibida por uma molécula derivada deste fármaco (Vermes, Guchelaar & Dankert, 2000). Além disso, a estrutura molde encontrada para modelagem da TS (PDBID 2AAZ) corresponde a uma TS de *C. neoformans*, que apresenta alta similaridade de sequência com as TSs de *C. neoformans* H99 (97,16% de identidade) e *C. gattii* R265 (95,58% de identidade), as linhagens utilizadas neste estudo (Figura 16).

Dessa forma, decidimos começar nosso estudo por essa enzima. As TSs de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 foram modeladas com o programa Modeller, utilizando como molde a TS de *C. neoformans* citada. Essa estrutura, obtida do PDB, foi determinada por difração de raio-X com resolução de 2.08 Å, e corresponde a estrutura funcional da TS, um dímero complexado com as moléculas do dUMP, um de seus substratos, e do CB3717, um antifolato, análogo ao outro substrato da enzima (Figura 17a) (Finer-Moore et al., 2005).

A partir da modelagem, cinco modelos foram gerados para cada linhagem. Estes modelos foram analisados com o MolProbity e com o Swiss-Model

(Apêndice 5), e o melhor de cada linhagem foi escolhido para os passos subsequentes de nosso estudo (Figura 17b).

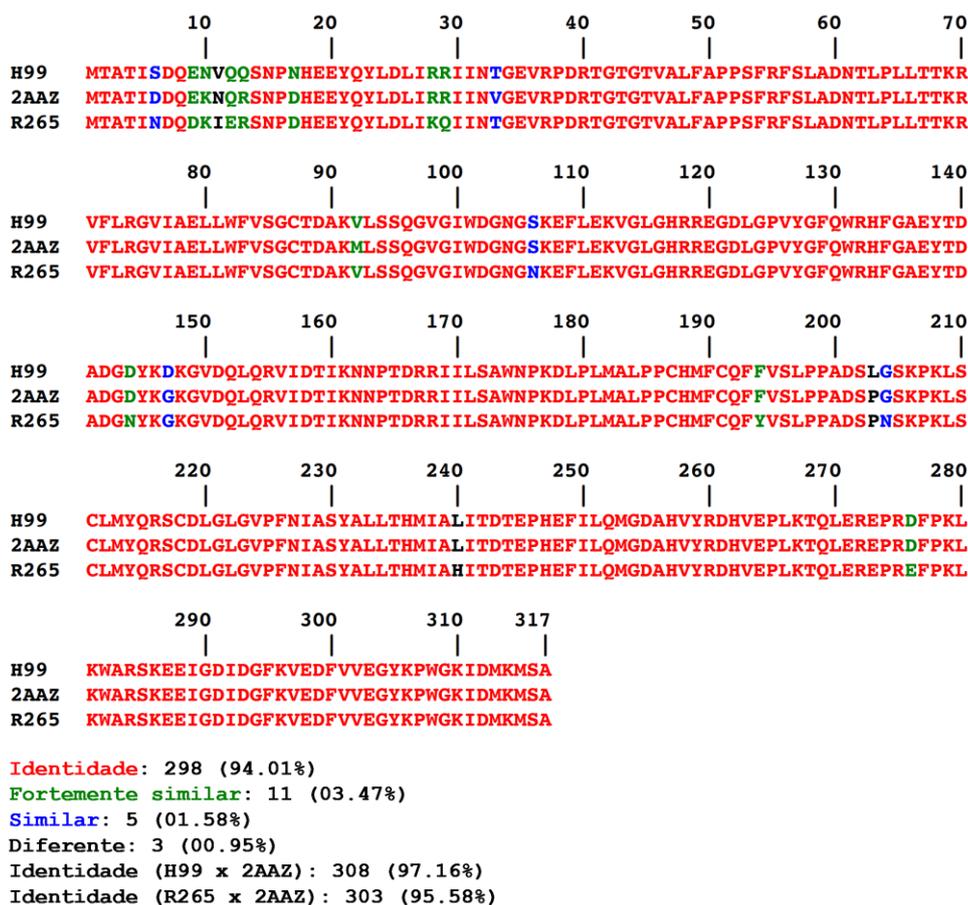


Figura 16: Alinhamento das sequências das TS de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 com a da estrutura molde. As sequências apresentaram alta identidade, uma vez que o molde se trata de uma TS de *C. neoformans*.

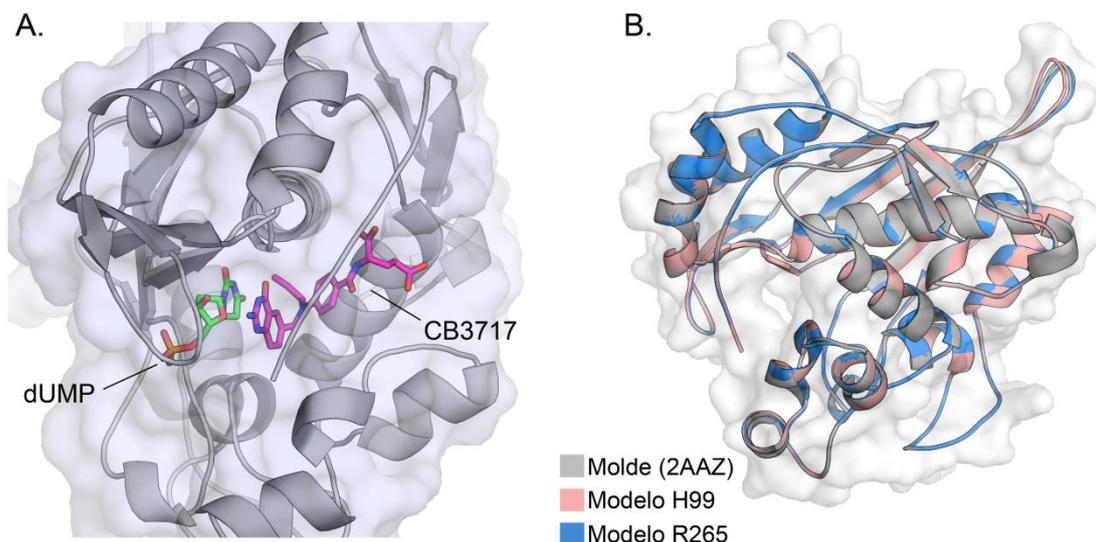


Figura 17: Modelagem das TSs de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. A) Estrutura molde com dUMP e CB3717 no sítio catalítico (PDBID: 2AAZ). B) Estrutura do molde utilizado na modelagem sobreposta com os melhores modelos gerados para *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265.

Os modelos gerados apresentaram alta qualidade, como pode ser visto nas análises do MolProbity e do Swiss-Model. Este fato poderia ser esperado, uma vez que a estrutura utilizada como molde na modelagem pertence a uma linhagem de *C. neoformans*, sendo, portanto, muito semelhante à estrutura da TS de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. As variações, de forma geral, foram sutis, resumindo-se a pequenas alterações em regiões de alça das proteínas modeladas.

5.4. Docking Molecular da plumieridina nos modelos:

Tendo obtido os modelos estruturais para as duas TSs, assim como a estrutura otimizada da plumieridina, realizamos, então, o *docking* molecular. Para isso os servidores do SwissDock e do PatchDock foram utilizados, tendo suas predições comparadas.

Dentre os aproximadamente 260 resultados do SwissDock e os 50 resultados do PatchDock, as posições semelhantes no conjunto de predições foram, então, agrupadas, e estão representadas na Figura 18 e na Tabela 3. O agrupamento foi realizado com base na cavidade onde a molécula da plumieridina foi predita, e na conformação dela neste sítio.

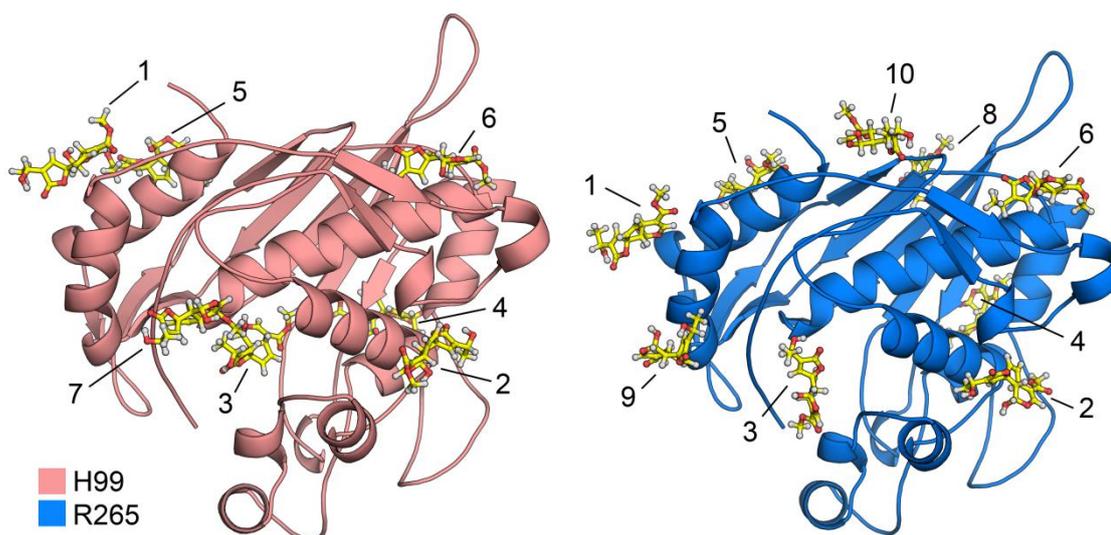


Figura 18: Docking molecular da plumieridina na TS. Os números correspondem às posições de *docking* previstas, e estão em acordo com os apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Agrupamentos de posições de *docking*. A primeira coluna para cada servidor corresponde ao número absoluto de posições previstas naquele grupo, e a segunda corresponde à quantidade relativa, em função de todas as previsões do dado servidor na dada linhagem. As tabelas resultantes dos programas pode ser encontrada no Apêndice 6.

Agrupamento	<i>C. neoformans</i> H99				<i>C. gattii</i> R265			
	SwissDock	PatchDock	SwissDock	PatchDock	SwissDock	PatchDock	SwissDock	PatchDock
1	112	43,7%	10	20,0%	16	6,2%	15	30,0%
2	79	30,9%	10	20,0%	136	53,1%	5	10,0%
3	24	9,4%	24	48,0%	56	22,2%	24	48,0%
4	24	9,4%	0	0,0%	24	9,4%	0	0,0%
5	17	6,6%	0	0,0%	8	3,1%	0	0,0%
6	0	0,0%	3	6,0%	0	0,0%	4	8,0%
7	0	0,0%	3	6,0%	0	0,0%	0	0,0%
8	0	0,0%	0	0,0%	8	3,1%	1	2,0%
9	0	0,0%	0	0,0%	8	3,1%	0	0,0%
10	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	2,0%
Total	256		50		256		50	

Podemos notar que houve divergência entre as previsões dos dois servidores. Tanto o grupo quatro como o grupo cinco foram previstos unicamente pelo SwissDock para *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265, enquanto o grupo seis foi previsto apenas pelo PatchDock. Isto poderia,

possivelmente, estar associado à implementação do algoritmo de *docking* utilizado pelos programas, que é significativamente diferente entre os dois servidores. O PatchDock realiza o *docking* com o ligante rígido, criando múltiplas conformações para ele antes do *docking*. Já o SwissDock utiliza um método que atribui flexibilidade a certas partes do ligante, mantendo apenas o receptor rígido. Além disso, esses dois programas utilizam algoritmos de busca extremamente diferentes, justificando, também, a divergência nos resultados (Grosdidier, Zoete & Michielin, 2011b; Schneidman-Duhovny et al., 2005).

Os três primeiros grupos apresentados, entretanto, foram preditos pelos dois servidores em ambas linhagens, e concentraram a maior parte das predições realizadas, apresentando, também, as melhores energias de interação entre as duas moléculas. Dentre eles, o grupo três, que conteve as melhores predições, segundo o PatchDock, encontra-se no interior do sítio catalítico da enzima, ocupando o espaço que normalmente seria ocupado pelos substratos da enzima. Decidimos, dessa forma, seguir para o próximo passo do estudo com representantes desses três grupos de posições.

5.5. Simulação de DM:

Os três grupos de posições de *docking* selecionados tiveram representantes simulados através de DM (Figura 19). Uma conformação do complexo TS-plumieridina foi escolhida como representante de cada grupo, e simulada para cada linhagem estudada. Dessa forma, seis simulações foram realizadas, três para cada linhagem (H99-TS-Plu 1, H99-TS-Plu 2, H99-TS-Plu 3, R265-TS-Plu 1, R265-TS-Plu 2, e R265-TS-Plu 3 – de acordo com a numeração dos grupos de *docking*). Adicionalmente, foram simuladas as proteínas na ausência da plumieridina (H99-TS e R265-TS), totalizando oito simulações.

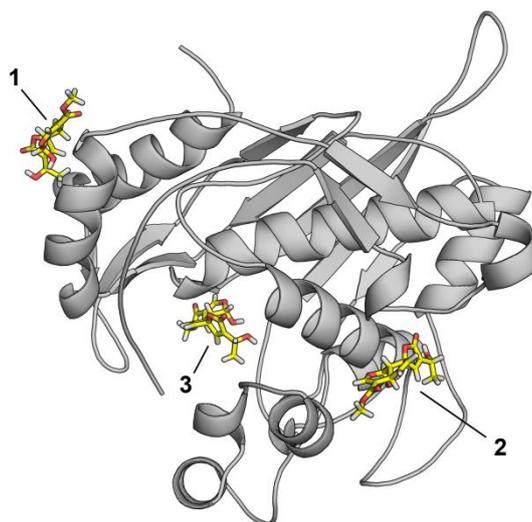


Figura 19: Posições de *docking* simuladas. Representantes dos agrupamentos 1, 2 e 3 foram escolhidos e simulados junto a TS.

Conforme protocolo predeterminado, as simulações onde as interações entre a TS e a plumieridina cessassem antes de 100 ns seriam abortadas, e não seriam avaliadas em relação à interação ligante-enzima. Desta forma a simulação H99-TS-Plu 1 foi abortada após 26 ns de simulação, a H99-TS-Plu 2 após 10 ns de simulação, a R265-TS-Plu 1 com 21 ns, e a R265-TS-Plu 2 depois de 42 ns de simulação. Todas simulações abortadas foram simuladas por 5 ns após o fim da interação TS-plumieridina, afim de certificar-se deste evento. As simulações H99-TS e R265-TS foram simuladas até 100 ns, assim como a H99-TS-Plu 3 e a R265-TS-Plu 3, únicas simulações em que a interação entre as duas moléculas se manteve durante todo período estudado.

Como dito anteriormente, essa região corresponde ao sítio catalítico da enzima, que, além de ser o local onde o dUMP e o folato são encontrados antes da catálise da reação (Monrfort et al., 1990), também é o local onde a maioria dos inibidores dessa proteína exercem sua atividade (Eckstein et al., 1994; Reich et al., 1992; Webber et al., 1993). Dessa forma, o fato desse sítio ter sido o único que manteve interações com a molécula da plumieridina corrobora com a hipótese de que ela seja um potencial inibidor da enzima.

Dentre as análises sobre as simulações de DM, na Figura 20 são mostradas análises referentes a *C. neoformans* H99. Dentre elas podemos observar que o gráfico de RMSD da estrutura total atinge um platô nas duas simulações, indicando uma estabilização do complexo. Apesar disso, a simulação da TS na presença da plumieridina apresentou, majoritariamente, valores mais elevados de RMSD, inclusive após a estabilização do sistema. Isto indica que a presença da plumieridina fez com que a estrutura da TS se modificasse mais em relação a sua estrutura inicial, do que a TS sem plumieridina, indicando que esse ligante favoreceu variações na estrutura da proteína.

Para avaliar onde as mudanças estruturais apresentavam maiores modificações, o gráfico de RMSD foi dividido em dois, representando regiões que apresentavam estrutura secundária (α -hélices e fitas- β) e estruturas desordenadas (alças e voltas), determinadas a partir do algoritmo do DSSP, para a TS em um tempo intermediário da simulação, fazendo com que estruturas secundárias que foram perdidas durante a DM constem nele como alças. O gráfico de RMSD de estrutura secundária apresentou pequena variação em relação ao observado para a simulação sem a plumieridina. Por outro lado, o RMSD para as regiões de alça apresentou valores bem superiores aos da simulação da TS sozinha, indicando que o principal fator para a variação na flexibilidade da proteína provém dessas estruturas, assim como de eventos de desenovelamento, que serão discutidos posteriormente.

O raio de giro mede a globularidade da proteína, sendo um indicativo da estabilidade do seu enovelamento. Ainda na Figura 20, podemos ver que o gráfico de raio de giro apresentou variação similar à observada no gráfico de RMSD. Isto indica que as alterações estruturais observadas no gráfico de RMSD para a proteína complexada com a plumieridina, alteraram sua globularidade, podendo indicar uma variação no perfil de enovelamento da proteína.

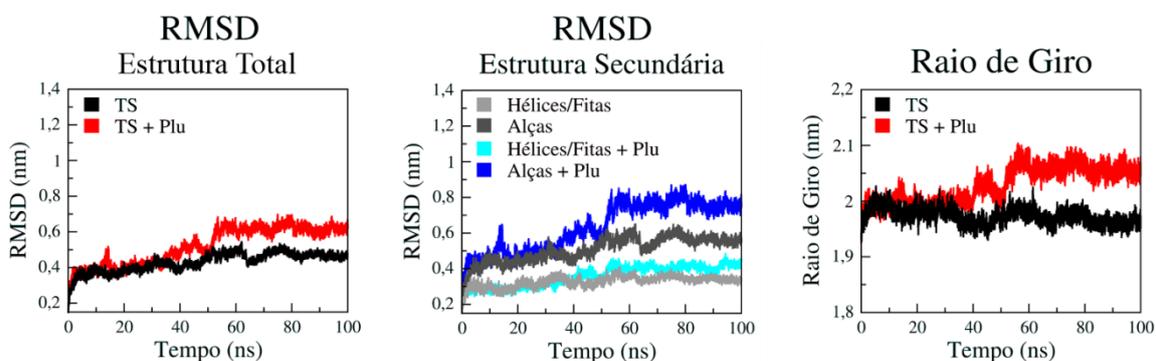


Figura 20: Análises da simulação de *C. neoformans* H99. A esquerda encontra-se o gráfico de RMSD da estrutura total da TS. Ao lado deste está disposto o gráfico do RMSD desmembrado nas estruturas da proteína. A direita encontra-se graficado o raio de giro das TSs ao longo das simulações.

Da mesma forma a Figura 21 traz as análises correspondentes para a simulação da TS de *C. gattii* R265. Podemos notar que, assim como nas simulações de *C. neoformans* H99, o gráfico de RMSD da estrutura total atingiu um platô, demonstrando a estabilidade da simulação. Em contrapartida, podemos observar o oposto do que foi visto para *C. neoformans* H99, com o complexo TS-plumieridina apresentando valores menores de RMSD. Isto significa que, em *C. gattii* R265, a presença da plumieridina provocou menos variações na estrutura da proteína, que permanece mais semelhante à do início da simulação, quando comparada a TS na ausência do ligante.

Novamente o gráfico de RMSD foi dividido em dois, representando a estrutura secundária e as estruturas desordenadas separadamente. Dessa forma foi possível observar que a pequena variação observada no gráfico de RMSD da estrutura total não esteve centrada em apenas uma dessas estruturas. Tanto a estrutura secundária da proteína, quanto as estruturas desordenadas contribuem igualmente na diminuição dos valores de RMSD observados.

O gráfico de raio de giro também refletiu o observado no RMSD, mostrando que a proteína simulada na presença da plumieridina apresentou valores de raio de giro levemente inferiores, quando comparada com a simulada sem o ligante. Além disso, o raio de giro médio para a proteína de *C. gattii* R265 na simulação com o ligante foi de $1,947 \pm 0,015$ nm, enquanto para a de *C. neoformans* H99 foi de $2,038 \pm 0,031$ nm, indicando que a proteína de *C. gattii*

R265 apresentou uma variação mais sutil para o seu raio de giro, sugerindo uma maior conservação de seu enovelamento.

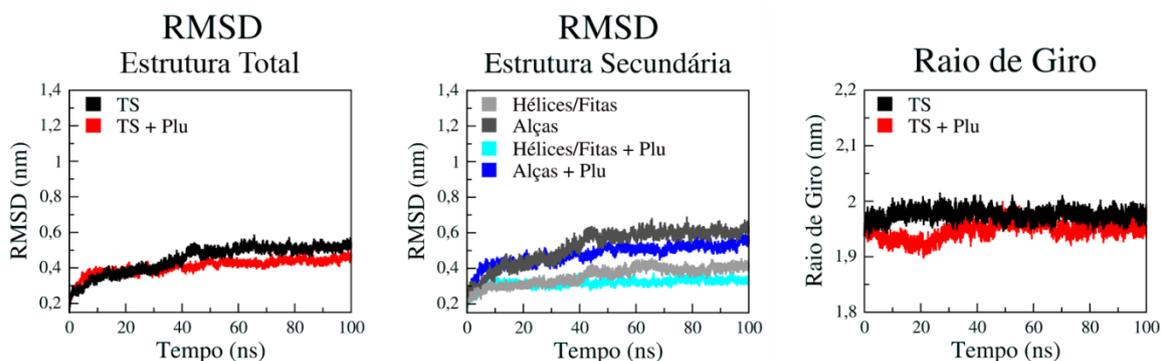


Figura 21: Análises da simulação de *C. gattii* R265. A esquerda encontra-se o gráfico de RMSD da estrutura total da TS. Ao lado está disposto o gráfico do RMSD das estruturas da proteína. A direita localiza-se o raio de giro das TSs ao longo das simulações.

A forma de interação entre a plumieridina e a TS variou bastante durante a simulação (Figura 22). Em *C. neoformans* H99 é possível notar que, apesar da plumieridina permanecer basicamente no mesmo local durante toda simulação, ocorre uma grande alteração na sua orientação em relação à TS. Já em *C. gattii* R265 a mudança é mais brusca. A partir de um dado momento na simulação, a plumieridina começa a se deslocar para fora do sítio catalítico, até estabelecer uma nova forma de interação, com uma parte mais externa dele, onde se mantém, então, pelo resto da dinâmica.

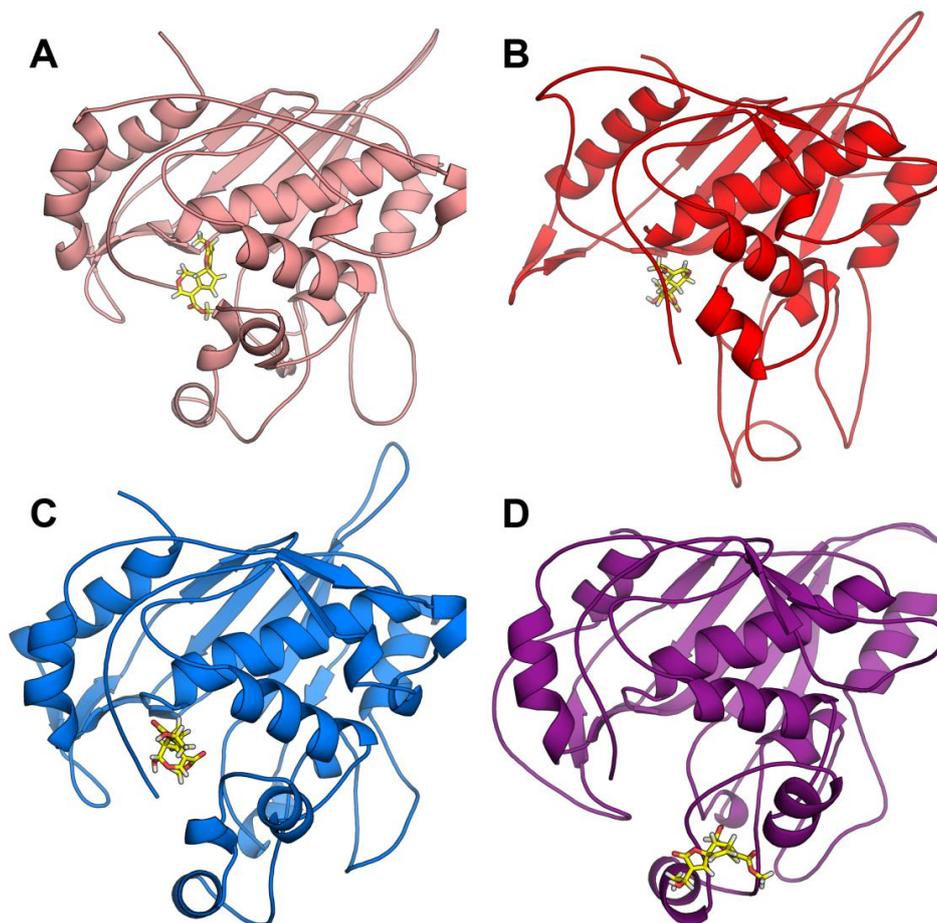


Figura 22: Variação na forma de interação da plumieridina com a TS. A) Complexo TS-plumieridina de *C. neoformans* H99 no início da simulação. B) Complexo TS-plumieridina de *C. neoformans* H99 aos 100 ns de simulação. C) Complexo TS-plumieridina de *C. gattii* R265 no início da simulação. D) Complexo TS-plumieridina de *C. gattii* R265 aos 100 ns de simulação.

De forma geral, a plumieridina interage com regiões em comum com os substratos da enzima, e que já estão bem caracterizadas. Destacamos, por tanto, seis regiões de interação da TS com o dUMP e o folato que são de extrema importância para a catálise da reação (Figura 23).

A primeira região encontra-se delimitada pelos aminoácidos Arg70 e Trp82, correspondendo a uma região bem caracterizada de ligação ao folato (RLF), apesar de apresentar interações com o dUMP. A segunda região destacada está compreendida no intervalo Gly97 – Asn106, e foi rotulada como RL1, sendo conhecidamente uma região de interação com o folato. Nessa região encontramos a única variação entre as sequências das TSs nas regiões destacadas: o aminoácido 106, que em *C. neoformans* H99 é uma serina, em

C. gattii R265 corresponde a uma asparagina (Figura 16). Entre a Leu184 e a Cys187 encontra-se a RL2, uma região que apresenta interações com os dois substratos da enzima. Da mesma forma, a quarta região, RL3, interage com o dUMP e o folato, e localiza-se entre a Gln215, e a Asn227. A quinta região, a RL4, corresponde ao aminoácido His257, que é conhecido por interagir apenas com o dUMP. Já a última região que destacamos como importante corresponde ao C-terminal da proteína, indo da Ile311 até o último aminoácido da enzima, a Ala317, e sendo conhecida por interagir apenas com o folato (Finer-Moore, J. S. et al., 2005; Montfort; Finer-Moore; Maley, 1990).

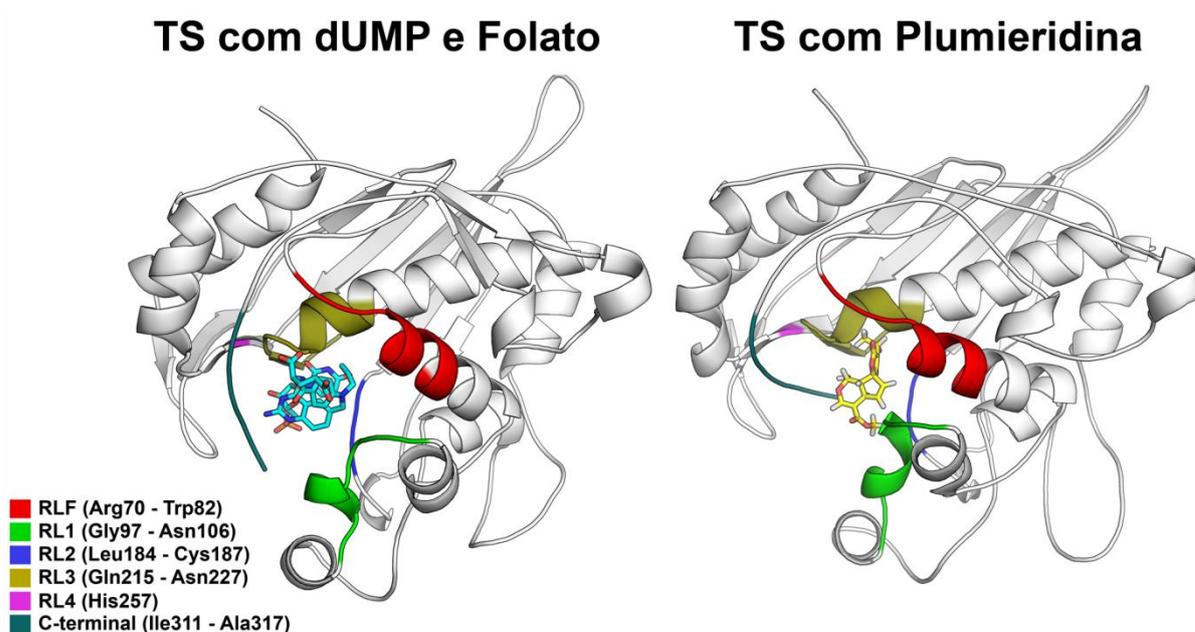


Figura 23: Regiões de importância na interação da TS com o dUMP e o folato. A esquerda o complexo TS-dUMP-folato. A direita o complexo TS-plumieridina. As regiões de importância encontram-se destacadas com cores, segundo a legenda.

As variações no complexo TS-plumieridina tem como consequência óbvias mudanças no perfil de interação entre as duas moléculas, como pode ser visto na Tabela 4. Na simulação da TS de *C. neoformans* H99 podemos observar, inicialmente, interações com a região da RL1 (Gly97 – Asn106), da RL3 (Gln215 – Asn227) e da região C-terminal (a partir da Ile311). Ao longo da simulação, entretanto, a plumieridina interage com as todas as demais regiões destacadas, ocorrendo, assim, interações com a RLF (Arg70 – Trp82), RL2 (Leu184 – Cys187) e com a RL4 (His257). Ao final da simulação, apenas as

regiões RL1, RL3, RL4 e C-terminal permanecem interagindo com a plumieridina. Ocorre, porém, uma concentração das interações na região da RL3. De forma geral, a RL1 e a região C-terminal apresentam apenas um aminoácido interagindo com a plumieridina ao final da simulação, enquanto a RL3 apresenta quatro.

Tabela 4: Interações da molécula Plumieridina com os resíduos de aminoácido da TS ao longo da simulação. (O) Representa interações hidrofóbicas, e (|) interações hidrofílicas. O **VERMELHO** representa interações observadas na TS de *C. neoformans* H99, e o **AZUL** na TS de *C. gattii* R265.

AA ns	Arg 70	Val 71	Phe 72	Arg 74	Gly 75	Glu 79	Trp 82	Ala 90	Lys 91	Ser 94	Gly 97	Val 98	Gly 99	Ile 100	Trp 101	Asp 102	Gly 103	Asn 104	Gly 105	Ser/Asn 106	Glu 120	Gly 121
1													O	O	O			O	O			
10				O									O	O	O		O					
20													O	O		O	O		O			
30	O	O		O										O	O							
40			O									O		O	O							
50			O	O									O	O	O	O						
60								O	O	O		O		O		O	O					
70							O	O	O			O		O		O	O			O	O	
80						O		O	O			O	O	O	O	O						
90								O	O		O	O		O	O	O	O				O	
100								O	O		O	O		O		O			O	O		O

AA ns	Val 126	Tyr 127	Leu 184	Pro 185	Pro 186	Cys 187	Gln 215	Ser 217	Cys 218	Asp 219	Leu 222	Gly 223	Val 224	Phe 226	Asn 227	His 257	Ile 311	Asp 312	Met 313	Lys 314	Met 315	Ser 316	Ala 317		
1						O	O	O	O	O	O	O	O		O					O	O	O			O
10			O	O		O														O	O		O	O	
20		O	O	O		O														O	O	O	O	O	
30			O	O	O						O							O		O	O	O		O	
40			O	O		O								O				O	O		O	O		O	
50			O	O		O								O						O	O	O	O	O	
60		O		O	O					O		O									O	O	O	O	
70	O			O	O				O		O	O												O	
80				O	O							O		O										O	
90					O						O	O		O						O	O			O	
100								O			O	O		O		O					O	O		O	

Já na simulação da TS de *C. gattii* R265 notamos uma mudança mais abrupta nas interações, concordando com a variação observada na conformação do complexo TS-plumieridina. No início da simulação ocorriam interações com as regiões RL1, RL3 e C-terminal. No decorrer da simulação a plumieridina interage também com a RLF, não interagindo, no entanto, em nenhum momento com a RL2 ou com a RL4. O deslocamento da plumieridina ocorre logo após os 50ns, e a partir deste momento todas as interações deixam de ocorrer, com exceção das que ocorrem na RL1. O deslocamento aproxima a

plumieridina desta região da proteína, fazendo com que as interações não apenas se mantenham, mas aumentem, também, em quantidade.

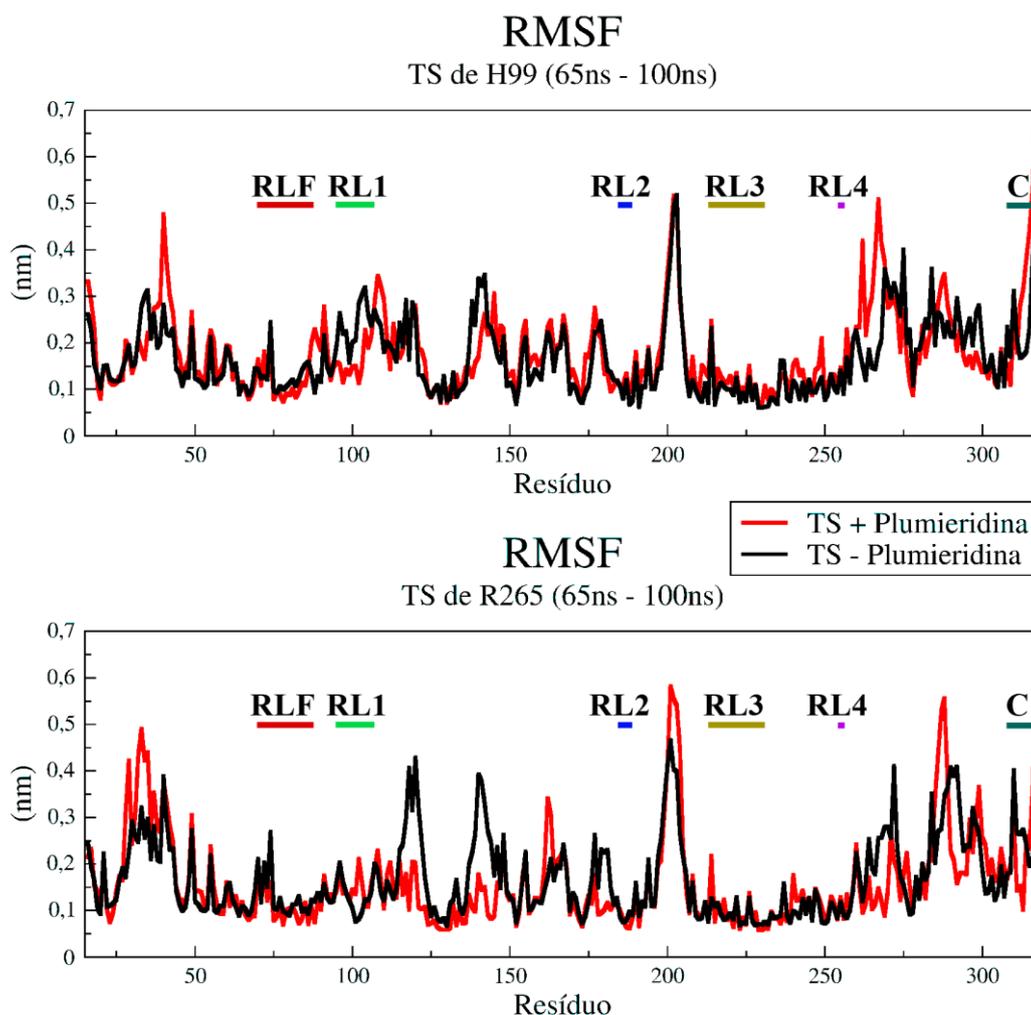


Figura 24: Gráfico de RMSF da TS. Acima localiza-se o gráfico de RMSF para as simulações de *C. neoformans* H99, e abaixo o para *C. gattii* R265. Encontram-se indicados nos gráficos as principais regiões de interação da TS com o dUMP e o folato.

A Figura 24 corresponde aos gráficos de RMSF para as TSs de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265, indicando a flexibilidade dos aminoácidos das proteínas. O RMSF foi calculado para o intervalo dos 65 ns de simulação aos 100 ns de simulação, onde a DM já havia atingido o platô de estabilidade observado no gráfico de RMSD. As regiões destacadas anteriormente encontram-se demarcadas nos gráficos.

O RMSF para as simulações de *C. neoformans* H99 com e sem a plumieridina não apresentaram grandes divergências (Figura 24). Podemos, no entanto, notar duas regiões que apresentaram alterações que justificam uma menção: A primeira, em torno da RL1, onde notamos uma variação no perfil de flexibilidade dos aminoácidos da região, provavelmente associada ao grande número de interações que ocorrem; e outra bem próxima a RL4, onde os aminoácidos da TS simulada com plumieridina apresentaram flexibilidade bem superior aos da simulação sem plumieridina, indicando uma possível mudança estrutural da região.

Já o RMSF para as simulações de *C. gattii* R265 mostrou uma alteração sutilmente maior entre a TS com e sem plumieridina quando comparado ao RMSF de *C. neoformans* H99, apresentando duas regiões com alterações bem expressivas. Em ambos casos, pode ser notada uma grande diminuição na flexibilidade dos aminoácidos da TS simulada com a plumieridina, em relação aos da TS simulada na ausência do iridóide.

Uma dessas regiões encontra-se muito próxima a RL1 indicando que a variação na sua flexibilidade pode ocorrer por uma estabilização da região, por causa do grande número de interações que se concentram ali a partir do momento em que a molécula da plumieridina sofre o deslocamento, aproximando-se desse ponto da proteína.

Já a segunda região (entre os aminoácidos Gln130 e Val150) está localizada um pouco mais distante da plumieridina que a primeira. Nossa hipótese é de que a estabilização da primeira região resulta na estabilização da segunda, propagando o efeito das interações que ocorrem na RL1, e causando a diminuição da flexibilidade dos aminoácidos dessa segunda região. O RMSF da proteína analisada dos 30ns aos 50ns (Figura 25) mostra que a flexibilidade dessa segunda região (marcada com um R2 na figura), era maior antes do deslocamento da plumieridina, do que após o deslocamento (linha em rosa na imagem). Este resultado corrobora nossa hipótese, uma vez que, após o deslocamento, o número de interações da RL1 com a plumieridina aumenta, causando a diminuição da flexibilidade dos aminoácidos da RL1, assim como dos dessa região adjacente.

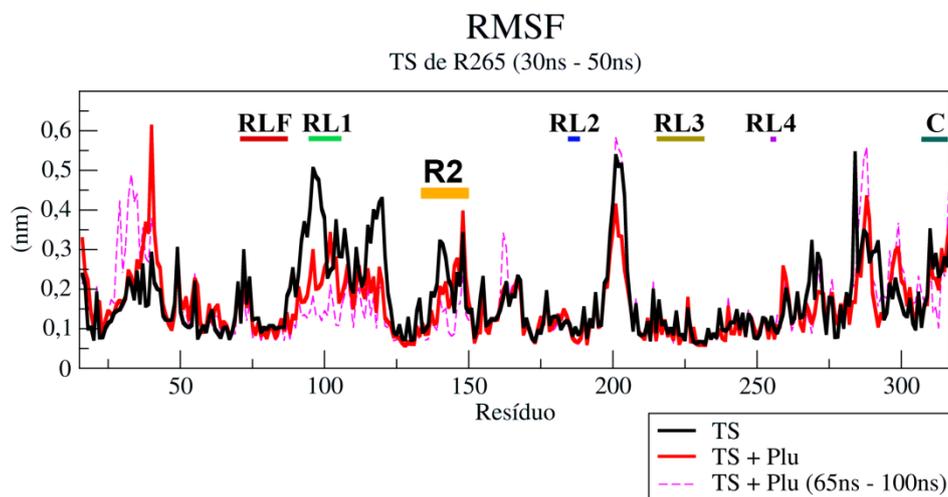


Figura 25: RMSF para a TS de *C. gattii* R265 no tempo anterior ao deslocamento da plumieridina (30ns aos 50ns). Em rosa no gráfico pode ser visto o RMSF para a TS simulada com a plumieridina, analisada dos 65 ns aos 100 ns, e mostrada previamente na Figura 24. Encontram-se, novamente, indicados as regiões destacadas para a discussão. Além disso, uma região R2 está demarcada, para facilitar a discussão.

Com relação à estrutura secundária das proteínas no decorrer da simulação, a mesma refletiu diretamente as alterações mostradas nas análises anteriores. Na simulação de *C. neoformans* H99, podemos notar que uma parte razoável da estrutura secundária permanece enovelada durante as simulações, ocorrendo a perda de aproximadamente 12% da estrutura observada no início da simulação (Figura 26). Essa variação parece ser causada pelo desenovelamento de duas α -hélices, demarcadas em amarelo e em verde na Figura 26, explicando, em parte, a variação estrutural da proteína observada no RMSD.

A primeira α -hélice está localizada muito próxima da RL1 (Figura 26 – demarcação amarela). Aparentemente, as interações da plumieridina com essa região causam uma desestabilização dessa área. Como consequência, ocorre a variação no perfil de flexibilidade dos aminoácidos dela, causando, finalmente, o desenovelamento da α -hélice, por volta dos 40 ns. Este evento, por sua vez, contribui para a alteração estrutural observada no RMSD das regiões de alça, uma vez que a estrutura bem organizada da α -hélice se torna uma alça, pouco organizada. A mudança estrutural que ocorre justifica, ainda, a alteração na forma de interação da plumieridina com essa região, uma vez que

essas interações diminuem ao longo da simulação, restando apenas uma ao final da simulação.

A segunda α -hélice, por sua vez, encontra-se muito próxima da RL4 (Figura 26 – demarcação verde). A plumieridina, aparentemente, interage de forma ocasional com essa área, provocando uma perturbação da região que resulta no aumento da flexibilidade dos aminoácidos próximos a ela (Figura 24). Isto leva ao desenovelamento da α -hélice, após cerca de 85 ns de simulação (como pode ser visto na região entre o aminoácido Arg260 e o Leu270, no DSSP - Apêndice 7 – Figura 2). De forma análoga ao que acontece com a primeira α -hélice citada, o desenovelamento dessa região parece causar uma variação estrutural que contribui amplamente para o aumento nos valores observados para o RMSD de alças e voltas.

A estrutura secundária das TSs de *C. gattii* R265, de forma similar ao que ocorre em *C. neoformans* H99, também reproduz os eventos citados anteriormente. A pequena variação na estrutura da proteína na presença da plumieridina, que podemos observar no RMSD, poderia ser deduzida a partir da alta conservação da estrutura secundária que é vista para a TS. De forma geral, toda estrutura se manteve basicamente constante durante a DM, ocorrendo a perda de apenas 1,7% da estrutura secundária observada no início da simulação.

Foi possível observar, entretanto, a formação de um grampo- β (Gln130 – Val150), nas TSs de ambas linhagens simuladas sem a molécula da plumieridina (Figura 26 – demarcações laranja). Essa região não está localizada próxima à plumieridina, mas apresentou uma diminuição na sua flexibilidade na simulação de *C. gattii* R265, como foi apontado anteriormente, na análise do RMSF. Em *C. neoformans* H99, essa variação no RMSF não foi evidenciada.

Em *C. gattii* R265 o grampo- β se forma antes dos 10 ns de simulação, e permanece formado durante o todo decorrer da simulação. Já em *C. neoformans* H99, este só se forma após os 60 ns. Essa variação no tempo de formação pode estar associada a propriedades intrínsecas da sequência de aminoácidos, uma vez que duas das pouquíssimas variações que essa proteína apresenta, entre as linhagens estudadas, estão presentes nessa região. Em *C. neoformans* H99 existem dois aspartatos (Asp144 e Asp147) que

na sequência de *C. gattii* R265 correspondem a uma asparagina e uma glicina (Asn144 e Gly147) (Figura 16), configurando a troca de dois aminoácidos positivamente carregados para dois não carregados. Realizamos uma busca por esse grampo na estrutura de outras TSs no PDB, e pudemos verificar que ele existe em alguns procariotos, mas aparentemente não foi descrito, ainda, em eucariotos. São necessários, no entanto, mais estudos para determinar o motivo pelo qual a formação dessa estrutura ocorre.

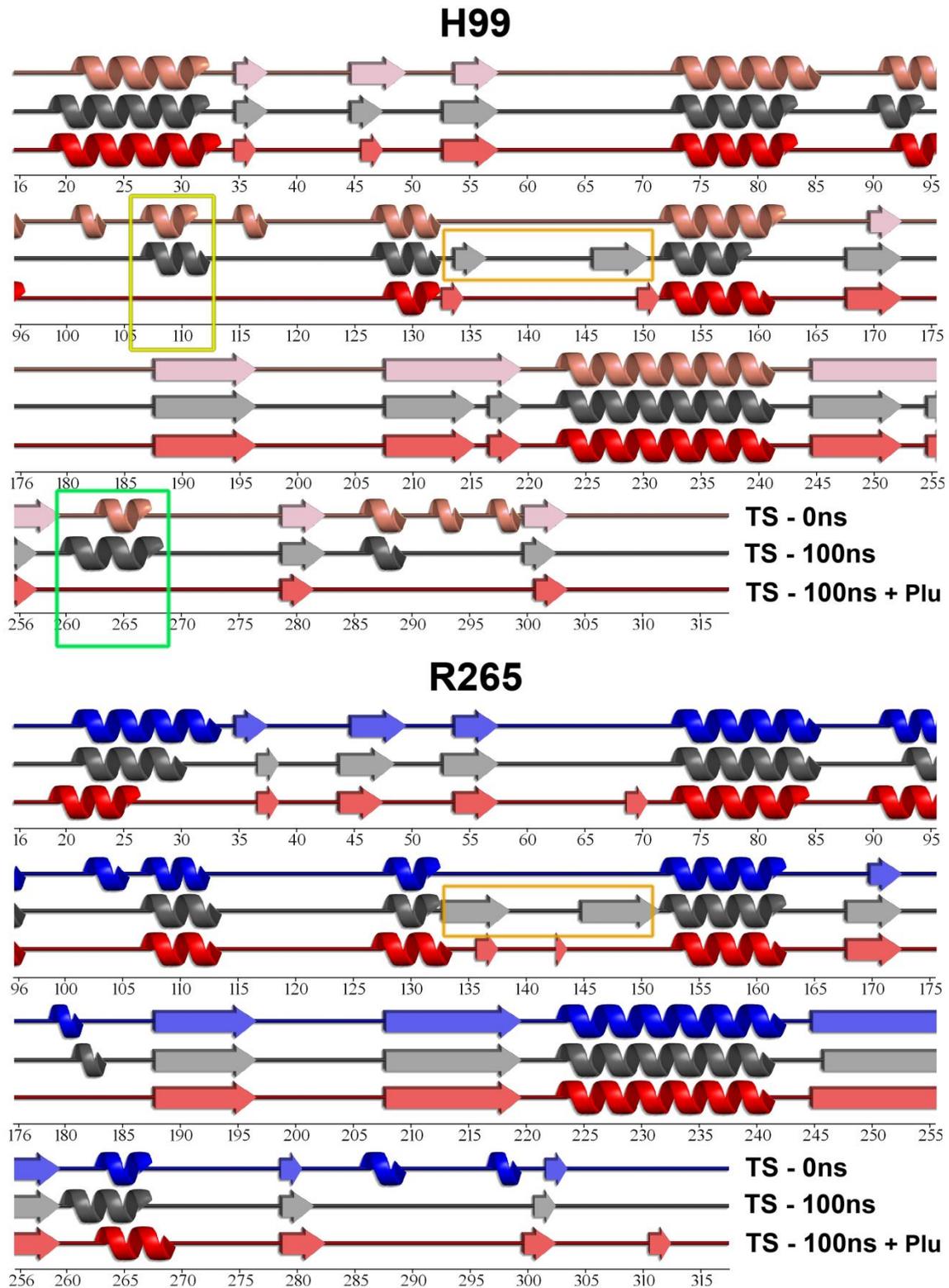


Figura 26: Estrutura secundária das TSs simuladas. A estrutura foi predita pelo PDBsum. Em **ROSA** e **AZUL** encontram-se as estruturas iniciais da TS. Em **PRETO**, as estruturas finais das TSs simuladas sem plumieridina, e em **VERMELHO** as simuladas com plumieridina. A predição da estrutura de forma contínua foi realizada utilizando o DSSP através da ferramenta do_dssp do GROMACS. Os resultados deste estão disponíveis no apêndice 7.

6. Conclusão e Perspectivas:

De acordo com os objetivos apresentados, esse trabalho conseguiu, por métodos *in silicio*, identificar e analisar um potencial alvo proteico para ação da molécula da plumieridina em *C. neoformans* e *C. gattii*: a TS, proteína pertencente à rota das pirimidinas, que realiza a conversão do dUMP a dTMP, em um passo determinante para síntese de dTTP.

A partir da análise de nossos resultados, podemos observar uma grande divergência entre as simulações das TSs de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. Na primeira, a proteína do complexo TS-plumieridina apresentou grande variação estrutural ao longo da simulação, comparado com a TS simulada sem o ligante. Aparentemente, as interações da plumieridina com a enzima, que, apesar de apresentarem alguma variação, se conservaram durante a maior parte da simulação, causaram o desenovelamento de duas α -hélices, fato que poderia ser, por si só, suficiente para inviabilizar o correto funcionamento da enzima.

Já na simulação do complexo TS-plumieridina de *C. gattii* R265, vemos o oposto do determinado em *C. neoformans* H99. A proteína apresentou pouquíssimas variações estruturais, não havendo nenhuma perda significativa de estrutura secundária. Indo, também, de encontro com o que foi observado para *C. neoformans* H99, a plumieridina apresentou uma grande variação em sua forma de interação com a TS. Logo após os 50 ns de simulação, ela se desloca para uma região mais externa do sítio catalítico, passando a interagir, unicamente, com uma região da proteína. As interações com essa região, no entanto, se intensificaram, o que causou, aparentemente, uma grande diminuição na flexibilidade da região, assim como de uma região proximal, contribuindo, por tanto, para estabilização da TS e para a manutenção de sua estrutura secundária.

Em ambos os casos, no entanto, foi possível observar que a plumieridina interagiu com regiões essenciais na catálise realizada pela TS, ocupando o espaço no sítio catalítico originalmente destinado aos substratos da enzima. Dessa forma, a plumieridina poderia, potencialmente, bloquear o sítio catalítico da TS, impedindo a ligação dos seus substratos, e, por conseguinte, inibindo a

atividade da enzima. Assim, identificamos a TS como uma enzima em potencial para a ação da plumieridina em *C. neoformans* e *C. gattii*.

Apesar disso, a grande divergência observada entre as simulações das duas linhagens estudadas ainda necessita ser melhor investigada, uma vez que as proteínas apresentam uma alta identidade de sequência, sendo, também, muito semelhantes estruturalmente. Propomos, por tanto, realizar as simulações dos complexos TS-plumieridina com as posições de *docking* escolhidas invertidas, simulando a TS de *C. neoformans* H99 com a plumieridina na orientação estudada para *C. gattii* R265, e vice-e-versa. As posições simuladas para as linhagens apresentam orientações significativamente diferentes, apesar de estarem ambas localizadas no sítio catalítico, o que poderia ter como consequência as divergências observadas nos resultados.

Além disso, o estudo das demais proteínas da rota das pirimidinas descritas pelo PharmMapper ainda se faz necessário. Da mesma forma, ainda temos como perspectiva a conclusão dos estudos práticos que ainda estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mas que tem, majoritariamente, corroborado com os resultados obtidos em nossos estudos *in silicio*.

7. Bibliografia:

- ACKLAND, S. P. et al. Thymidylate synthase inhibitors. **Cancer chemother.biol.response modif.**, 2002. v. 20, n. 0921–4410 (Print), p. 1–36.
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical reviews**, 2006. v. 106, n. 5, p. 1589–1615.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal research reviews**, 2006. v. 26, n. 5, p. 531–568.
- ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. **Chemistry and biology**, set. 2003. v. 10, n. 9, p. 787–797.
- ARNOLD, K. et al. The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 15 jan. 2006. v. 22, n. 2, p. 195–201.
- BELLO, A. M. et al. A potent, covalent inhibitor of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase with antimalarial activity. **Journal of medicinal chemistry**, mar. 2007. v. 50, n. 5, p. 915–921.
- BELLO, A. M. et al. Structure–activity relationships of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase inhibitors as anticancer agents. **Journal of medicinal chemistry**, 26 mar. 2009. v. 52, n. 6, p. 1648–1658.
- BENHAM, R. W. Cryptococci: their identification by morphology and by serology. **The journal of infectious diseases**, 1935. v. 57, n. 3, p. 255–274.
- BENHAM, R. W. Cryptococcosis and blastomycosis. **Annals of the new york academy of sciences**, set. 1950. v. 50, n. 10, p. 1299–1314.
- BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **The journal of physical chemistry**, nov. 1987. v. 91, n. 24, p. 6269–6271.
- BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. VAN DER; DRUNEN, R. VAN. Gromacs: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, set. 1995. v. 91, n. 1–3, p. 43–56.

- BERGER, F. G.; BERGER, S. H. Thymidylate synthase as a chemotherapeutic drug target: where are we after fifty years? **Cancer biology and therapy**, 2006. v. 5, n. 9, p. 1238–1241.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucl. acids res.**, 2000. v. 28, n. 1, p. 235–242.
- BICANIC, T. et al. Symptomatic relapse of hiv-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clinical infectious diseases : an official publication of the infectious diseases society of america**, 15 out. 2006. v. 43, n. 8, p. 1069–1073.
- BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes cryptococcus gattii a pathogen? **Fems yeast research**, fev. 2015. v. 16, n. 1, p. fov106.
- BRESCIANI, F. R. Caracterização da atividade antifúngica de extrato aquoso de sementes de allamanda polyantha. 2013.
- BULMER, G. S.; SANS, M. D. Cryptococcus neoformans. 3. inhibition of phagocytosis. UNITED STATES: **Journal of bacteriology**, jan. 1968. v. 95, n. 1, p. 5–8.
- BURGESS, J. L.; BIRCHALL, R. Nephrotoxicity of amphotericin b, with emphasis on changes in tubular function. **The american journal of medicine**, jul. 1972. v. 53, n. 1, p. 77–84.
- CALLEJAS, A. et al. First isolation of cryptococcus neoformans var. gattii, serotype c, from the environment in colombia. **Medical mycology**, out. 1998. v. 36, n. 5, p. 341–344.
- CARRERAS, C. W.; SANTI, D. V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. **Annual review of biochemistry**, 1 jan. 1995. v. 64, n. 1, p. 721–62.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la sociedad espanola de quimioterapia**, jun. 2006. v. 19, n. 2, p. 130–9.
- CHAKRABARTI, A. et al. Isolation of cryptococcus neoformans var. gattii from eucalyptus camaldulensis in india. **Journal of clinical microbiology**, dez. 1997. v. 35, n. 12, p. 3340–3342.
- CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central

nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and immunity**, 2004. v. 72, n. 9, p. 4985–4995.

CHENG, M. F. et al. Cryptococcus laurentii fungemia in a premature neonate. **Journal of clinical microbiology**, abr. 2001. v. 39, n. 4, p. 1608–1611.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of cryptococcus neoformans and cryptococcus gattii: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, 2013. v. 2013, n. serotype D, p. 23.

CORRÊA, A. Caracterização do mecanismo de ação do composto natural plumieridina contra cryptococcus gattii caracterização do mecanismo de ação do composto natural plumieridina contra cryptococcus gattii. 2016.

COSTI, M. P. et al. Structure-based studies on species-specific inhibition of thymidylate synthase. **Biochimica et biophysica acta - molecular basis of disease**, 18 jul. 2002. v. 1587, n. 2–3, p. 206–214.

COX, M.; NELSON, D. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th. ed. New York: Freeman, 2005.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh ewald: an $n \cdot \log(n)$ method for ewald sums in large systems. **The journal of chemical physics**, 1993. v. 98, n. 12, p. 10089.

DAVIS, I. W. et al. Molprobit: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic acids research**, jul. 2007. v. 35, n. SUPPL.2, p. W375-83.

DUHOVNY, D.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. Efficient unbound docking of rigid molecules. **Algorithms in bioinformatics**, 2002. p. 185–200.

DURDAGI, S. et al. Computational design of novel fullerene analogues as potential hiv-1 pr inhibitors: analysis of the binding interactions between fullerene inhibitors and hiv-1 pr residues using 3d qsar, molecular docking and molecular dynamics simulations. **Bioorganic and medicinal chemistry**, 2008. v. 16, n. 23, p. 9957–9974.

DUSCHINSKY, R.; PLEVEN, E.; HEIDELBERGER, C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. **Journal of the american**

chemical society, ago. 1957. v. 79, n. 16, p. 4559–4560.

ECKSTEIN, J. W. et al. Mechanism-based inhibition of thymidylate synthase by 5-(trifluoromethyl)-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate. **Biochemistry**, dez. 1994. v. 33, n. 50, p. 15086–15094.

ELLABIB, M. S. et al. Isolation, identification and molecular typing of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and other environmental sources in Tripoli, Libya. **Mycopathologia**, 2016. v. 181, n. 7–8, p. 603–608.

FAKHRUDIN, N. et al. Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, abr. 2014. v. 171, n. 7, p. 1676–1686.

FINER-MOORE, J. S. et al. The structure of *Cryptococcus neoformans* thymidylate synthase suggests strategies for using target dynamics for species-specific inhibition. **Acta crystallographica section d biological crystallography**, 1 out. 2005. v. 61, n. 10, p. 1320–1334.

FISER, A.; ŠALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. **Methods in enzymology**, 2003. v. 374, p. 461–491.

FOX, R. I. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. **Journal of rheumatology**, dez. 1998. v. 25, n. SUPPL. 53, p. 20–26.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of clinical microbiology**, mar. 1999. v. 37, n. 3, p. 838–40.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev Infect Dis**, 1990. v. 12, n. 2, p. 308–329.

GAO, Z. et al. Pdb: a web-accessible protein database for drug target identification. **BMC Bioinformatics**, 2008. v. 9, n. 1, p. 104.

GIGLIOTTI, F. et al. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. **The journal of infectious diseases**,

nov. 1987. v. 156, n. 5, p. 784–789.

GILCHRIST, C. A.; PETRI, W. A. Virulence factors of entamoeba histolytica. **Current opinion in microbiology**, ago. 1999. v. 2, n. 4, p. 433–437.

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**, 2014. v. 70, p. 12–23.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. Swissdock, a protein-small molecule docking web service based on eadock dss. **Nucleic acids research**, jul. 2011a. v. 39, n. SUPPL. 2, p. W270-7.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. Fast docking using the charmm force field with eadock dss. **Journal of computational chemistry**, 30 jul. 2011b. v. 32, n. 10, p. 2149–2159.

GUEDES, I.; MAGALHÃES, C.; DARDENNE, L. Atracamento. *In*: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática da biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo, Brasil: [s.n.], 2014, p. 188–208.

GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European journal of clinical microbiology and infectious diseases**, nov. 2013. v. 32, n. 11, p. 1377–1391.

HAMILTON-MILLER, J. M. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. **Bacteriological reviews**, set. 1973. v. 37, n. 2, p. 166–196.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, jan. 2012. v. 4, n. 8, p. 17.

HARDY, L. et al. Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design. **Science**, 23 jan. 1987. v. 235, n. 4787, p. 448–455.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 15 nov. 1992. v. 89, n. 22, p. 10915–9.

- HESS, B. et al. Lincs: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of computational chemistry**, set. 1997. v. 18, n. 12, p. 1463–1472.
- JAMBOR, W. P.; STEINBERG, B. A.; SUYDAM, L. O. Amphotericins a and b: two new antifungal antibiotics possessing high activity against deep-seated and superficial mycoses. **Antibiotics annual**, 1956. v. 3, p. 574–8.
- JOHNSON, M. et al. Ncbi blast: a better web interface. **Nucleic acids research**, 19 maio. 2008. v. 36, n. Web Server, p. W5–W9.
- KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, dez. 1983. v. 22, n. 12, p. 2577–637.
- KALATHIYA, U.; PADARIYA, M.; BAGINSKI, M. Identification of 1 *h*-indene-(1,3,5,6)-tetrol derivatives as potent pancreatic lipase inhibitors using molecular docking and molecular dynamics approach. **Biotechnology and applied biochemistry**, 2015. p. n/a-n/a.
- KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A; MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, abr. 2007. v. 35, n. 2, p. 51–58.
- KILSTRUP, M. et al. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. **Fems microbiology reviews**, ago. 2005. v. 29, n. 3, p. 555–590.
- KON, A. S. et al. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, out. 2008. v. 41, n. 5, p. 524–544.
- KROCKENBERGER, M. B. et al. Pathogenesis of pulmonary cryptococcus gattii infection: a rat model. **Mycopathologia**, nov. 2010. v. 170, n. 5, p. 315–330.
- KRYSAN, D. J. Toward improved anti-cryptococcal drugs: novel molecules and repurposed drugs. **Fungal genetics and biology : fg & b**, maio. 2015. v. 78, p. 93–8.
- KUTZNER, C. et al. Speeding up parallel gromacs on high-latency networks. **Journal of computational chemistry**, set. 2007. v. 28, n. 12, p. 2075–2084.

- KWON-CHUNG, K. J. A new genus, filobasidiella, the perfect state of cryptococcus neoformans. **Mycologia**, nov. 1975. v. 67, n. 6, p. 1197.
- KWON-CHUNG, K. J. A new species of filobasidiella, the sexual state of cryptococcus neoformans b and c serotypes. **Mycologia**, jul. 1976. v. 68, n. 4, p. 943–946.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. Proposal to conserve the name cryptococcus gattii against c. hondurians and c. bacillisporus (basidiomycota, hymenomycetes, tremellomycetidae). **Taxon**, nov. 2002. v. 51, n. 4, p. 804.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. Cryptococcus neoformans and cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, 1 jul. 2014. v. 4, n. 7, p. a019760--a019760.
- KWON-CHUNG, K. J.; RHODES, J. C. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in cryptococcus neoformans. **Infection and immunity**, jan. 1986. v. 51, n. 1, p. 218–23.
- LASKOWSKI, R. A. et al. Pdbsum: a web-based database of summaries and analyses of all pdb structures. **Trends in biochemical sciences**, dez. 1997. v. 22, n. 12, p. 488–490.
- LAZÉRA, M. S. et al. Cryptococcus neoformans var. gattii--evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Medical mycology**, abr. 1998. v. 36, n. 2, p. 119–122.
- LIU, T. et al. Bindingdb: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic acids research**, 3 jan. 2007. v. 35, n. Database, p. D198–D201.
- LIU, X. et al. Pharmmapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. **Nucleic acids research**, 2010. v. 38, n. SUPPL. 2, p. 5–7.
- LU, S. Y. et al. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of gpr40 receptor-agonist interactions. **Journal of molecular graphics and modelling**, 2010. v. 28, n. 8, p. 766–774.
- LU, Y. Z.; AIELLO, P. D.; MATTHEWS, R. G. Studies on the polyglutamate specificity of thymidylate synthase from fetal pig

- liver. **Biochemistry**, dez. 1984. v. 23, n. 26, p. 6870–6876.
- MACDOUGALL, L. et al. Risk factors for cryptococcus gattii infection, british columbia, canada. **Emerging infectious diseases**, fev. 2011. v. 17, n. 2, p. 193–199.
- MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins †. **The journal of physical chemistry b**, abr. 1998. v. 102, n. 97, p. 3586–3616.
- MADDUX, M. S.; BARRIERE, S. L. A review of complications of amphotericin-b therapy: recommendations for prevention and management. **Annals of pharmacotherapy**, 1 mar. 1980. v. 14, n. 3, p. 177–181.
- MALDE, A. K. et al. An automated force field topology builder (atb) and repository: version 1.0. **Journal of chemical theory and computation**, 13 dez. 2011. v. 7, n. 12, p. 4026–4037.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal brasileiro de pneumologia**, 2006. v. 32, n. 5, p. 449–460.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of north america**, mar. 2016. v. 30, n. 1, p. 179–206.
- MILLER, R. P.; BATES, J. H. Amphotericin b toxicity. a follow-up report of 53 patients. **Annals of internal medicine**, dez. 1969. v. 71, n. 6, p. 1089–95.
- MONE, M. et al. Plumieride from allamanda cathartica as an inhibitory compound to plant pathogenic fungi. **Archives of phytopathology and plant protection**, 3 jul. 2014. v. 47, n. 11, p. 1311–1326.
- MONTFORT, W. R. et al. Structure, multiple site binding, and segmental accommodation in thymidylate synthase on binding dump and an anti-folate. **Biochemistry**, 31 jul. 1990. v. 29, n. 30, p. 6964–6977.
- MONTFORT, W. R.; FINER-MOORE, J. S.; MALEY, F. Structure, multiple site binding, and segmental accommodation in thymidylate synthase on binding dump and an anti-folatet*\$. 1990. n. 1981, p. 6964–6977.
- MORRIS, G.; HUEY, R. Autodock4 and autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of {...}**, 2009.

v. 30, n. 16, p. 2785–2791.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, 2012. v. 75, n. 3, p. 311–335.

NISHIKAWA, M. M. et al. Serotyping of 467 cryptococcus neoformans isolates from clinical and environmental sources in brazil : analysis of host and regional patterns serotyping of 467 cryptococcus neoformans isolates from clinical and environmental sources in brazil : analysis o. 2003. v. 41, n. 1, p. 73–77.

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

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the gromos force-field parameter sets 53a5 and 53a6. **Journal of computational chemistry**, out. 2004. v. 25, n. 13, p. 1656–76.

PALMER, A. M. Teriflunomide, an inhibitor of dihydroorotate dehydrogenase for the potential oral treatment of multiple sclerosis. **Current opinion in investigational drugs (london, england : 2000)**, nov. 2010. v. 11, n. 11, p. 1313–23.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with hiv/aids. **Aids (london, england)**, 20 fev. 2009. v. 23, n. 4, p. 525–30.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clinical infectious diseases : an official publication of the infectious diseases society of america**, 1 fev. 2010. v. 50, n. 3, p. 291–322.

PHILLIPS, M.; RATHOD, P. Plasmodium dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. **Infectious disorders - drug targets**, 1 jun. 2010. v. 10, n. 3, p. 226–239.

RAJASINGHAM, R. et al. Cryptococcal meningitis treatment strategies in resource-limited settings: a cost-effectiveness analysis. **Plos medicine**, 25 set. 2012. v. 9, n. 9, p. e1001316.

RAPPE, A. K. et al. Uff, a full periodic table force field for molecular

mechanics and molecular dynamics simulations. **Journal of the american chemical society**, dez. 1992. v. 114, n. 25, p. 10024–10035.

REICH, S. H. et al. Design and synthesis of novel 6,7-imidazotetrahydroquinoline inhibitors of thymidylate synthase using iterative protein crystal structure analysis. **Journal of medicinal chemistry**, mar. 1992. v. 35, n. 5, p. 847–858.

RICHARDSON, K. et al. Activity of uk-49,858, a bis-triazole derivative, against experimental infections with candida albicans and trichophyton mentagrophytes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 1 maio. 1985. v. 27, n. 5, p. 832–835.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of cryptococcus neoformans: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and infection / institut pasteur**, abr. 1999. v. 1, n. 4, p. 293–301.

RUDRAMURTHY, S. M. et al. Fatal cryptococcosis involving multiple sites in an immunocompetent child. **Indian journal of medical microbiology**, 2015. v. 33, n. 5, p. 148.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 1 jan. 1988. v. 32, n. 1, p. 1–8.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, 5 dez. 1993. v. 234, n. 3, p. 779–815.

SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of the brazilian chemical society**, 2001. v. 12, n. 2, p. 144–153.

SCHLIEMANN, W.; ADAM, G. Enzymatic hydrolysis of plumieride to plumieridine. **Phytochemistry**, jan. 1982. v. 21, n. 6, p. 1438–1439.

SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. 1993. v. 14, n. 11, p. 1347–1363.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. Patchdock and symmdock: servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic acids research**, 1 jul. 2005. v. 33, n. Web Server issue, p. W363-7.

SECKO. **A peach of a pathogen: cryptococcus neoformans.**

SINGH, D. et al. Antioxidant potential of plumieride against ccl4-induced peroxidative damage in rats. **Antioxidants**, 27 nov. 2014. v. 3, n. 4, p. 798–813.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of cryptococcus neoformans. 1995. n. July 1980, p. 28–34.

SPOEL, D. VAN DER et al. Gromacs: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, dez. 2005. v. 26, n. 16, p. 1701–1718.

STROUD, R. M.; FINER-MOORE, J. S. Stereochemistry of a multistep/bipartite methyl transfer reaction: thymidylate synthase. **Faseb journal: official publication of the federation of american societies for experimental biology**, maio. 1993. v. 7, n. 8, p. 671–7.

TALELE, T. T.; MCLAUGHLIN, M. L. Molecular docking/dynamics studies of aurora a kinase inhibitors. **Journal of molecular graphics and modelling**, 2008. v. 26, n. 8, p. 1213–1222.

TASSEL, D. Treatment of candida sepsis and cryptococcus meningitis with 5-fluorocytosine. **Jama**, 21 out. 1968. v. 206, n. 4, p. 830.

TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of computer-aided molecular design**, 2002. v. 16, n. 3, p. 151–166.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal-w - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, 1994. v. 22, n. 22, p. 4673–4680.

TIWARI, T. N.; PANDEY, V. B.; DUBEY, N. K. Plumieride from allamanda cathartica as an antidermatophytic agent. **Phytotherapy research**, jun. 2002. v. 16, n. 4, p. 393–394.

VAQUÉ, M. et al. Protein-ligand docking: a review of recent advances and future perspectives. **Current pharmaceutical analysis**, 2008. v. 4, n. 1, p. 1–19.

- 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**, 2000. v. 46, p. 171–179.
- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Ligplot : a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions clean up structure. 1995. v. 8, n. 2, p. 127–134.
- WANG, R. et al. The pdbbind database: collection of binding affinities for protein–ligand complexes with known three-dimensional structures. **Journal of medicinal chemistry**, jun. 2004. v. 47, n. 12, p. 2977–2980.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. (A) decreased susceptibility of melanized cryptococcus neoformans to uv light. **Applied and environmental microbiology**, out. 1994a. v. 60, n. 10, p. 3864–6.
- WANG, Y.; CASADEVALL, A. (B) growth of cryptococcus neoformans in presence of l-dopa decreases its susceptibility to amphotericin b. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, nov. 1994b. v. 38, n. 11, p. 2648–50.
- WEBBER, S. E. et al. Design of thymidylate synthase inhibitors using protein crystal structures: the synthesis and biological evaluation of a novel class of 5-substituted quinazolinones. **Journal of medicinal chemistry**, mar. 1993. v. 36, n. 6, p. 733–746.
- WISHART, D. S. et al. Drugbank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. **Nucleic acids research**, 23 dez. 2007. v. 36, n. Database, p. D901–D906.
- XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future microbiology**, jan. 2014. v. 9, n. 4, p. 523–42.
- XU, J. et al. Iridoids from the roots of valeriana jatamansi and their neuroprotective effects. **Fitoterapia**, 2011. v. 82, n. 7, p. 1133–1136.
- YAO, Z.-W. et al. Comparison of flucytosine and fluconazole combined with amphotericin b for the treatment of hiv-associated cryptococcal meningitis: a systematic review and meta-analysis. **European journal of clinical microbiology &**

infectious diseases : official publication of the european society of clinical microbiology, ago. 2014. v. 33, n. 8, p. 1339–44.

APÊNDICE 1:

Apêndice 1 – Tabela 1: Estruturas de TSs disponíveis no PDB:

<i>Babesia bovis</i>	3I3R, 3KJR, 3K2H, 3NRR
<i>Bacillus subtilis</i>	1B02, 1BKO, 1BKP, 1BSF, 1BSP
<i>Brucella melitensis</i>	3IX6
<i>Burkholderia thailandensis</i>	3V8H
<i>Caenorhabditis elegans</i>	4IQB, 4IQQ, 4IRR, 4ISW, 4LRR, 4PSG
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	3FNN, 3GE9, 4H0R, 4H0U
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2AAZ
<i>Cryptosporidium hominis</i>	1SEJ, 2OIP, 3DL5, 3DL6, 4KY8, 4Q0D, 4Q0E, 1QZF
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	3KGB
<i>Enterobacteria phage T4 sensu lato</i>	1TIS
<i>Enterococcus faecalis</i>	3UWL, 4O7U
<i>Escherichia coli</i>	1AIQ, 1AJM, 1AN5, 1AOB, 1AXW, 1BDU, 1BID, 1BJG, 1BQ1, 1BQ2, 1DDU, 1DNA, 1EV5, 1EV8, 1EVF, 1EVG, 1F4B, 1F4C, 1F4D, 1F4E, 1F4F, 1F4G, 1FFL, 1FWM, 1JG0, 1JTQ, 1JTU, 1JUT, 1KCE, 1KZI, 1KZJ, 1NCE, 1QQQ, 1SYN, 1TDU, 1TJS, 1TLC, 1TLS, 1TRG, 1TSD, 1TSN, 1TYS, 1ZPR, 2A9W, 2BBQ, 2FTN, 2FTO, 2FTQ, 2G8X, 2KCE, 2TSC, 2VET, 2VF0, 3B5B, 3B9H, 3BFI, 3BGX, 3BHL, 3BHR, 3TMS, 4GEV, 4ISK, 4KNZ, 4UP2
<i>Helicobacter pylori</i>	3AH5, 3N3Y
<i>Homo sapiens</i>	1HVY, 1HW3, 1HW4, 1HZW, 1I00, 1JU6, 1JUJ, 1YPV, 2ONB, 2RD8, 2RDA, 3ARN, 3EAW, 3EBU, 3ED7, 3EDW, 3EF9, 3EGY, 3EHI, 3EJL, 3GG5, 3GH0, 3GH2, 3H9K, 3HB8, 3N5E, 3N5G, 3NTZ, 3NU0, 3OB7, 4E28, 4FGT, 4G2O, 4G6W, 4GD7, 4GYH, 4H1I, 4JEF, 4KPW, 4O1U, 4O1X, 4UP1, 5HS3
<i>Human herpesvirus 3</i>	4XSC, 4XSD, 4XSE
<i>Lactobacillus casei</i>	1BO7, 1BO8, 1BP0, 1BP6, 1BPJ, 1JMF, 1JMG, 1JMH, 1JMI, 1LCA,

	1LCB, 1LCE, 1NJA, 1NJB, 1NJC, 1NJD, 1NJE, 1TDA, 1TDB, 1TDC, 1THY, 1TSL, 1TSM, 1TSV, 1TSW, 1TSX, 1TSY, 1TSZ, 1TVU, 1TVV, 1TVW, 1VZA, 1VZB, 1VZC, 1VZD, 1VZE, 2G86, 2G89, 2G8A, 2G8D, 2TDD, 2TDM, 3BNZ, 3BYX, 3BZ0, 3C06, 3C0A, 3IJZ, 3IK0, 3IK1, 4TMS
<i>Mus musculus</i>	3IHI, 4E5O, 4EB4, 4EIN, 4EZ8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2AF6, 2GQ2, 3GWC, 3HZG, 3QJ7, 4FOA, 4FOG, 4FOX, 4FQS
<i>Paramecium bursaria</i> <i>Chlorella virus 1</i>	2CFA, 4FZB
<i>Plasmodium falciparum</i>	1J3I, 1J3J, 1J3K, 3DG8, 3DGA, 3JSU, 3QG2, 3QGT, 3UM5, 3UM6, 3UM8, 4DP3, 4DPD, 4DPH
<i>Pneumocystis carinii</i>	1CI7, 1E26, 1F28
<i>Rattus norvegicus</i>	1RTS, 2TSR
<i>Staphylococcus aureus</i>	4DQ1
<i>Streptomyces cacaoi</i>	4P5A, 4P5B
<i>Thermotoga marítima</i>	1KQ4, 1O24, 1O25, 1O26, 1O27, 1O28, 1O29, 1O2A, 1O2B, 3G4C, 3G4A, 3N0B, 3N0C, 4GT9, 4GTA, 4GTB, 4GTC, 4GTD, 4GTE, 4GTF, 4GTL, 4KAR, 4KAS, 4KAT, 5IOQ, 5IOR, 5IOS, 5IOT
<i>Toxoplasma gondii</i>	4ECK, 4EIL, 4KY4, 4KYA
<i>Trichinella spiralis</i>	5BY6
<i>Trypanosoma brucei</i>	3QFX, 3RG9
<i>Trypanosoma cruzi</i>	2H2Q, 3CL9, 3CLB, 3HBB, 3INV, 3IRM, 3IRN, 3IRO, 3KJS

APÊNDICE 2:

Topologia da molécula utilizada nas simulações:

```
[ moleculetype ]
; Name      nrexcl
INA        3

[ atoms ]
; nr  type  resnr  resid  atom  cgnr  charge  mass  total_charge
  1   HC    1     INA   H12   1     0.107  1.0080
  2    C    1     INA   C14   1    -0.389 12.0110
  3   HC    1     INA   H10   1     0.107  1.0080
  4   HC    1     INA   H11   1     0.107  1.0080
  5    C    1     INA   C13   1     0.432 12.0110
  6   HC    1     INA   H8    1    -0.006  1.0080
  7   OA    1     INA   O5    1    -0.686 15.9994
  8    H    1     INA   H9    1     0.442  1.0080      ; 0.114
  9    C    1     INA   C10   2    -0.180 12.0110
 10   C    1     INA   C9    2     0.750 12.0110
 11   O    1     INA   O3    2    -0.570 15.9994      ; 0.000
 12   C    1     INA   C11   3    -0.170 12.0110
 13   HC    1     INA   H16   3     0.170  1.0080      ; 0.000
 14  CH0    1     INA   C6    4     0.066 12.0110
 15  OE    1     INA   O2    4    -0.412 15.9994
 16   C    1     INA   C7    4    -0.032 12.0110
 17   HC    1     INA   H5    4     0.153  1.0080
 18   C    1     INA   C3    4    -0.070 12.0110
 19   HC    1     INA   H2    4     0.147  1.0080      ; -0.148
 20   C    1     INA   C4    5     0.410 12.0110
 21   HC    1     INA   H3    5     0.036  1.0080
 22   OA    1     INA   O4    5    -0.631 15.9994
 23   H    1     INA   H7    5     0.459  1.0080      ; 0.274
 24  OE    1     INA   O1    6    -0.368 15.9994
 25   C    1     INA   C5    6     0.247 12.0110
 26   HC    1     INA   H4    6     0.121  1.0080      ; 0.000
 27   C    1     INA   C1    7    -0.770 12.0110
 28   C    1     INA   C12   7     0.930 12.0110
 29   O    1     INA   O6    7    -0.597 15.9994
 30   C    1     INA   C2    7     0.764 12.0110
 31   HC    1     INA   H1    7    -0.037  1.0080
 32   C    1     INA   C8    7    -0.547 12.0110
 33   HC    1     INA   H6    7     0.257  1.0080      ; 0.000
 34  OE    1     INA   O7    8    -0.393 15.9994
 35   C    1     INA   C15   8    -0.213 12.0110
 36   HC    1     INA   H13   8     0.122  1.0080
 37   HC    1     INA   H14   8     0.122  1.0080
 38   HC    1     INA   H15   8     0.122  1.0080      ; -0.240
; total charge of the molecule: -0.000

[ bonds ]
; ai  aj  funct  c0      c1
  1   2   2    0.1100  1.2100e+07
  2   3   2    0.1090  1.2300e+07
  2   4   2    0.1100  1.2100e+07
  2   5   2    0.1520  5.4300e+06
  5   6   2    0.1100  1.2100e+07
  5   7   2    0.1430  8.1800e+06
```

5	9	2	0.1520	5.4300e+06
7	8	2	0.1000	2.3200e+07
9	10	2	0.1520	5.4300e+06
9	12	2	0.1330	1.1800e+07
10	11	2	0.1230	1.6600e+07
10	15	2	0.1360	1.0200e+07
12	13	2	0.1090	1.2300e+07
12	14	2	0.1520	5.4300e+06
14	15	2	0.1435	6.1000e+06
14	16	2	0.1530	7.1500e+06
14	18	2	0.1530	7.1500e+06
16	17	2	0.1090	1.2300e+07
16	32	2	0.1330	1.1800e+07
18	19	2	0.1100	1.2100e+07
18	20	2	0.1520	5.4300e+06
18	30	2	0.1530	7.1500e+06
20	21	2	0.1100	1.2100e+07
20	22	2	0.1360	1.0200e+07
20	24	2	0.1460	2.7500e+06
22	23	2	0.1000	2.3200e+07
24	25	2	0.1360	1.0200e+07
25	26	2	0.1090	1.2300e+07
25	27	2	0.1330	1.1800e+07
27	28	2	0.1480	5.7300e+06
27	30	2	0.1520	5.4300e+06
28	29	2	0.1230	1.6600e+07
28	34	2	0.1360	1.0200e+07
30	31	2	0.1100	1.2100e+07
30	32	2	0.1520	5.4300e+06
32	33	2	0.1090	1.2300e+07
34	35	2	0.1435	6.1000e+06
35	36	2	0.1090	1.2300e+07
35	37	2	0.1090	1.2300e+07
35	38	2	0.1090	1.2300e+07

[pairs]

; ai aj funct ; all 1-4 pairs but the ones excluded in GROMOS itp

1	6	1
1	7	1
1	9	1
2	8	1
2	10	1
2	12	1
3	6	1
3	7	1
3	9	1
4	6	1
4	7	1
4	9	1
6	8	1
6	10	1
6	12	1
7	10	1
7	12	1
8	9	1
12	17	1
12	19	1
12	20	1
12	30	1

12	32	1
14	21	1
14	22	1
14	24	1
14	27	1
14	31	1
14	33	1
15	17	1
15	19	1
15	20	1
15	30	1
15	32	1
16	19	1
16	20	1
16	27	1
16	31	1
17	18	1
17	30	1
17	33	1
18	23	1
18	25	1
18	28	1
18	33	1
19	21	1
19	22	1
19	24	1
19	27	1
19	31	1
19	32	1
20	26	1
20	27	1
20	31	1
20	32	1
21	23	1
21	25	1
21	30	1
22	25	1
22	30	1
23	24	1
24	28	1
24	30	1
25	29	1
25	31	1
25	32	1
25	34	1
26	28	1
26	30	1
27	33	1
27	35	1
28	31	1
28	32	1
28	36	1
28	37	1
28	38	1
29	30	1
29	35	1
30	34	1
31	33	1

```

[ angles ]
; ai  aj  ak  funct  angle  fc
  1   2   3   2    109.50  520.00
  1   2   4   2    108.00  740.00
  1   2   5   2    109.50  285.00
  3   2   4   2    113.00  921.00
  3   2   5   2    106.00  848.00
  4   2   5   2    109.60  450.00
  2   5   6   2    108.53  443.00
  2   5   7   2    111.00  530.00
  2   5   9   2    111.00  530.00
  6   5   7   2    108.00  740.00
  6   5   9   2    108.00  740.00
  7   5   9   2    109.50  320.00
  5   7   8   2    108.53  443.00
  5   9  10   2    120.00  560.00
  5   9  12   2    132.00  760.00
 10   9  12   2    109.50  285.00
  9  10  11   2    126.00  640.00
  9  10  15   2    109.50  320.00
 11  10  15   2    124.00  730.00
  9  12  13   2    126.00  575.00
  9  12  14   2    109.50  285.00
 13  12  14   2    120.00  505.00
 12  14  15   2    103.00  741.00
 12  14  16   2    111.00  530.00
 12  14  18   2    120.00  560.00
 15  14  16   2    111.00  530.00
 15  14  18   2    111.00  530.00
 16  14  18   2     96.00  594.00
 10  15  14   2    109.50  380.00
 14  16  17   2    120.00  505.00
 14  16  32   2    111.00  530.00
 17  16  32   2    125.00  750.00
 14  18  19   2    106.00  848.00
 14  18  20   2    120.00  560.00
 14  18  30   2    104.00  490.00
 19  18  20   2    108.00 1040.00
 19  18  30   2    109.50  520.00
 20  18  30   2    111.00  530.00
 18  20  21   2    110.00 1270.00
 18  20  22   2    111.00  530.00
 18  20  24   2    109.50  320.00
 21  20  22   2    114.00  782.00
 21  20  24   2    106.00  848.00
 22  20  24   2    109.50  320.00
 20  22  23   2    108.53  443.00
 20  24  25   2    125.00  750.00
 24  25  26   2    109.50  285.00
 24  25  27   2    126.00  640.00
 26  25  27   2    120.00  505.00
 25  27  28   2    120.00  560.00
 25  27  30   2    120.00  560.00
 28  27  30   2    120.00  560.00
 27  28  29   2    125.00  750.00
 27  28  34   2    115.00  610.00
 29  28  34   2    124.00  730.00
 18  30  27   2    109.50  285.00

```

```

18 30 31 2 109.50 618.00
18 30 32 2 96.00 594.00
27 30 31 2 109.50 618.00
27 30 32 2 120.00 560.00
31 30 32 2 106.75 503.00
16 32 30 2 111.00 530.00
16 32 33 2 125.00 750.00
30 32 33 2 126.00 575.00
28 34 35 2 120.00 780.00
34 35 36 2 109.50 285.00
34 35 37 2 111.00 530.00
34 35 38 2 109.60 450.00
36 35 37 2 110.30 524.00
36 35 38 2 110.30 524.00
37 35 38 2 109.50 618.00
[ dihedrals ]
; GROMOS improper dihedrals
; ai aj ak al funct angle fc
14 15 10 9 2 0.00 167.36
15 10 9 12 2 0.00 167.36
10 9 12 14 2 0.00 167.36
9 12 14 15 2 0.00 167.36
12 14 15 10 2 0.00 167.36
27 25 28 30 2 0.00 167.36
25 24 26 27 2 0.00 167.36
16 14 17 32 2 0.00 167.36
32 16 30 33 2 0.00 167.36
10 9 11 15 2 0.00 167.36
9 5 10 12 2 0.00 167.36
12 9 13 14 2 0.00 167.36
28 27 29 34 2 0.00 167.36
[ dihedrals ]
; ai aj ak al funct ph0 cp mult
3 2 5 9 1 0.00 5.92 3
9 5 7 8 1 0.00 1.26 3
2 5 9 10 1 180.00 1.00 6
18 14 16 32 1 0.00 1.00 6
16 14 18 30 1 0.00 5.92 3
14 16 32 30 1 180.00 41.80 2
30 18 20 24 1 0.00 5.92 3
20 18 30 27 1 0.00 5.92 3
18 20 22 23 1 0.00 1.26 3
18 20 24 25 1 180.00 1.00 3
20 24 25 27 1 180.00 24.00 2
24 25 27 30 1 180.00 5.86 2
30 27 28 29 1 180.00 5.86 2
25 27 30 18 1 0.00 1.00 6
27 28 34 35 1 180.00 24.00 2
27 30 32 16 1 0.00 1.00 6
28 34 35 36 1 0.00 1.26 3
[ exclusions ]
; ai aj funct ; GROMOS 1-4 exclusions
5 11
5 13
5 14
5 15
9 16
9 18

```

```
10 13
10 16
10 18
11 12
11 14
13 15
13 16
13 18
```

```
; Include Position restraint file
#ifdef POSRES
#include "plumieridina-posre.itp"
#endif
```

APÊNDICE 3:

Parâmetros das simulações de DM.

```
title           = Yo
cpp             = /lib/cpp
define         = -DFLEX_SPC
constraints    = all-bonds
integrator     = md
tinit         = 0000.0
dt            = 0.001 ; ps !
nsteps        = 1000000 ; total 0000-1000 ps.
nstcomm       = 1
nstxout       = 250
nstvout       = 1000
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 100
nstlist       = 10
ns_type       = grid
coulombtype   = PME
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
rvdw          = 0.9
fourierspacing = 0.12
optimize_fft  = yes
pme_order     = 4
ewald_rtol    = 1e-5
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        = v-rescale
tc-grps       = Protein INA SOL NA
tau_t         = 0.1 0.1 0.1 0.1
ref_t         = 310 310 310 310
; Energy monitoring
energygrps    = Protein INA SOL NA
; Isotropic pressure coupling is now on
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0
; Generate velocities is off at 100 K.
gen_vel       = no
gen_temp      = 310.0
gen_seed      = 173529
```

APÊNDICE 4:

Apêndice 4 – Tabela 1: Resultados do PhramMapper ordenados por seu valor de z'-score.

Nº	Proteína Alvo	z'-score	Mamíferos	Fungos
1	Streptavidina	4.80933	-	-
2	Streptavidina	4.76279	-	-
3	Streptavidina	2.80111	-	-
4	Streptavidina	1.89614	-	-
5	Ciclomaltodextrina glucanotransferase	1.80816	-	-
6	Lectina Manose/glicose específica Cramoll	1.78755	-	-
7	Urocanato hidratase	1.75532	X	X
8	Não identificada *	1.74821	-	-
9	Repressor do operon Pur	1.37026	-	-
10	Streptavidina	1.33214	-	-
11	Fenilalanina-4-hydroxilase	1.31639	X	X
12	HINT1	1.25982	X	X
13	6-fosfo-β -glicosidase bgIT	1.12417	-	-
14	Adenilosuccinato sintetase isoenzima 1	1.04041	X	-
15	mRNA Cap-específico	0.900365	X	X
16	Treonil-tRNA sintetase	0.7901	X	X
17	Ribonuclease pancreatica	0.730221	X	-
18	Polipeptídeo pentafuncional AROM	0.686445	X	X
19	3,5-cíclico fosfodiesterase cGMP-específica	0.648541	X	-
20	Fucolectina	0.613543	X	-
21	Não identificada *	0.58452	-	-
22	2,2-dialquila-glicina descarboxilase	0.524567		X
23	Aminoglicosideo 3-fosfotransferase	0.480761	X	X
24	Fosfopanteteina adenililtransferase	0.453718	X	X
25	Uracil fosforribosiltransferase	0.441835	X	X
26	Timidilato sintase	0.438357	X	X
27	Purina nucleosideo fosforilase	0.43724	X	X
28	Fosfopanteteina adenililtransferase	0.435644	X	X
29	Não identificada *	0.421861	-	-
30	Streptavidina	0.421153	-	-
31	Timidilato quinase	0.413462	X	X
32	Lectina fucose específica	0.399018	X	X
33	Streptavidina	0.392707	-	-
34	Proteina ioS	0.389053	X	X
35	Sulfato adenililtransferase	0.381918	X	X
36	Maltodextrina fosforilase	0.363448	X	X
37	Familia sulfotransferase citosolica 2B membro 1	0.355382	X	-
38	Ribonuclease pancreatica	0.354857	X	-

39	Timidilato sintase thyX	0.3471	X	X
40	Não identificada *	0.311648	-	-
41	Acil-CoA hidrolase	0.294002	X	X
42	Proteína homóloga 2 controladora de divisão celular	0.291796	X	X
43	Proteína ActVA 6	0.289424	-	X
44	Não identificada *	0.229299	-	-
45	Proteína de choque térmico HSP 90- α	0.20953	X	X
46	Timidilato quinase	0.208174	X	X
47	Defosfo-CoA quinase	0.191693	X	X
48	Orotidina 5'-fosfato descarboxilase	0.174865	X	X
49	Streptavidina	0.173512	-	-
50	Pteridina redutase 1	0.152384	X	X

(*) Corresponde a estruturas que não possuem identificação, mas foram preditas pelo servidor como potencial alvo para a molécula.

APÊNDICE 5:

Análises dos modelos de TS escolhidos:

Resultados do MolProbity:

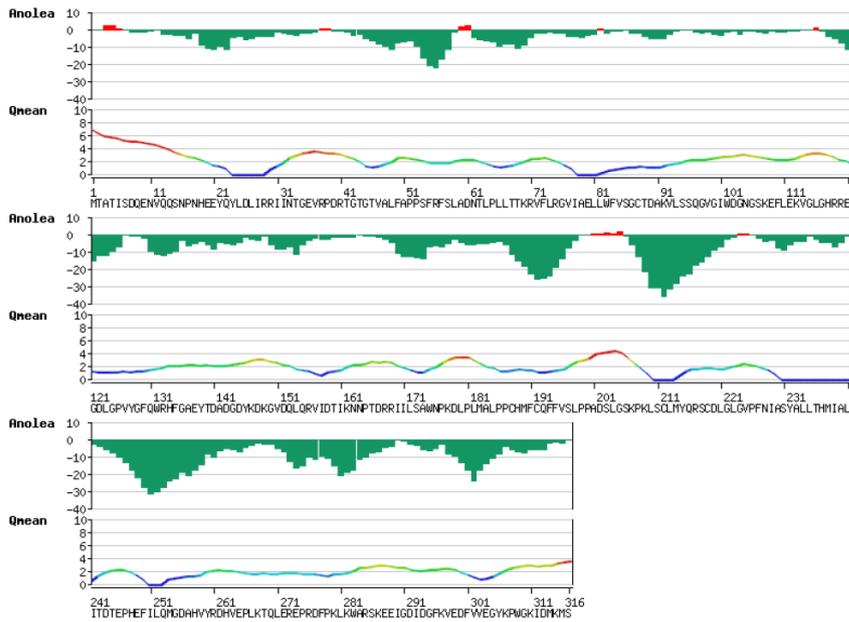
Apêndice 5 – Tabela 1: Resultados do Molprobity para o modelo escolhido da TS de *C. neoformans* H99:

Geometria da Proteína	Rotâmeros pobres	1	0,36%	Ideal: <1%
	Ramachandran <i>outliers</i>	0	0,00%	Ideal: <0,05%
	Ramachandran favoráveis	307	97,46%	Ideal: >98%
	Desvio C β >0.25Å	0	0,00%	Ideal: 0
	Ligações ruins da cadeia principal:	0 / 2588	0,00%	Ideal: 0%
	Ângulos ruins da cadeia principal::	46 / 3509	1,31%	Ideal: <0,1%

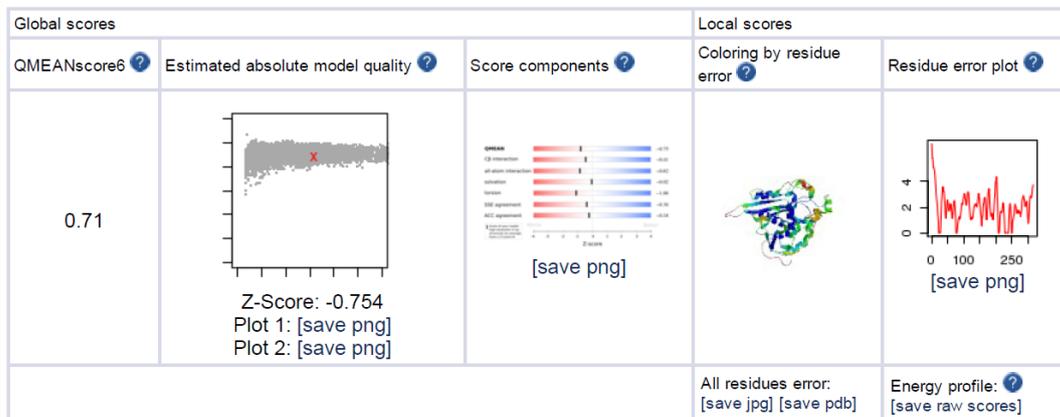
Apêndice 5 – Tabela 2: Resultados do Molprobity para o modelo escolhido da TS de *C. gattii* R265:

Geometria da Proteína	Rotâmeros pobres	3	1,09%	Ideal: <1%
	Ramachandran <i>outliers</i>	0	0,00%	Ideal: <0,05%
	Ramachandran favoráveis	306	97,14%	Ideal: >98%
	Desvio C β >0.25Å	0	0,00%	Ideal: 0
	Ligações ruins da cadeia principal:	0 / 2596	0,00%	Ideal: 0%
	Ângulos ruins da cadeia principal::	45 / 3520	1,28%	Ideal: <0,1%

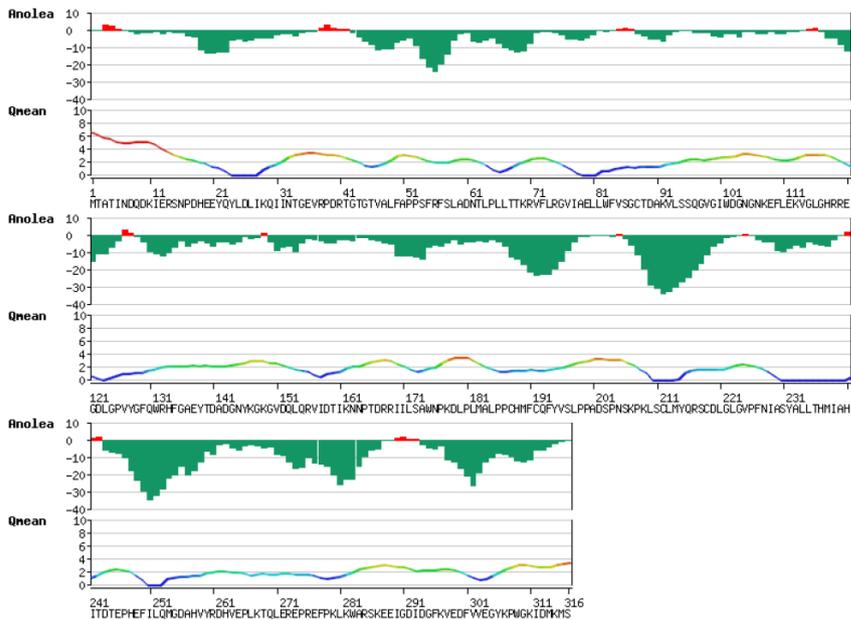
Resultados do Swiss-Model:



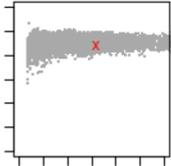
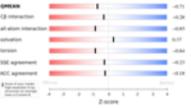
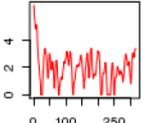
dfire_energy: -459.21



Apêndice 5 – Figura 1: Resultados do Swiss-Model para o modelo selecionado da TS de *C. neoformans* H99:



dfire_energy: -458.28

Global scores		Local scores		
QMEANscore6 ?	Estimated absolute model quality ?	Score components ?	Coloring by residue error ?	Residue error plot ?
0.713	 Z-Score: -0.709 Plot 1: [save png] Plot 2: [save png]	 [save png]		 [save png]
			All residues error: [save jpg] [save pdb]	Energy profile: ? [save raw scores]

Apêndice 5 – Figura 2: Resultados do Swiss-Model para o modelo selecionado da TS de *C. gattii* R265.

APÊNDICE 6:

Apêndice 6 – Tabela 1: Resultados do SwissDock para o docking da plumieridina na TS de *C. neoformans* H99.

Cluster	ClusterRank	Fitness	Energy
0	0	-1682.3633	-14.1647
0	1	-1682.3508	-14.1639
0	2	-1682.1549	-14.0454
0	3	-1679.2761	-13.1780
0	4	-1672.9120	-7.95393
0	5	-1669.6355	-0.720093
0	6	-1669.6288	-0.720092
1	0	-1681.4470	-6.44069
1	1	-1681.4470	-6.44069
1	2	-1681.4470	-6.44069
1	3	-1681.3398	-6.35685
1	4	-1681.3398	-6.35685
1	5	-1681.3398	-6.35685
1	6	-1681.3398	-6.35685
1	7	-1680.9932	-5.94462
2	0	-1680.1433	-3.54741
2	1	-1678.6174	-2.98141
2	2	-1672.3046	-0.639134
2	3	-1672.1321	-0.680496
2	4	-1672.0706	-0.693091
2	5	-1671.2991	3.48428
3	0	-1679.7599	-6.95311
3	1	-1679.7576	-6.95366
3	2	-1679.7570	-6.95229
3	3	-1679.7570	-6.95229
3	4	-1672.7609	-1.82437
3	5	-1672.6993	-1.77458
3	6	-1672.6993	-1.77458
3	7	-1672.6074	-1.7466
4	0	-1679.5447	-7.84487
4	1	-1679.2981	-7.94971
4	2	-1674.6411	-7.2730
4	3	-1674.0181	-4.86115
4	4	-1673.5677	-3.95074
4	5	-1673.0039	-0.803315
4	6	-1671.3470	-3.00706
4	7	-1667.7050	1.9541
5	0	-1678.8066	-5.0104
5	1	-1672.1427	-2.40999
5	2	-1670.85	-2.61186
5	3	-1670.7191	-2.30381
5	4	-1669.7396	3.33104
5	5	-1669.0845	3.32661
5	6	-1667.6617	0.638597
5	7	-1661.2141	7.8599
6	0	-1678.3364	-5.17183
6	1	-1678.3169	-5.15125
6	2	-1677.2520	-3.8468
6	3	-1677.1078	-3.76359
6	4	-1677.0057	-3.72258
6	5	-1676.9850	-3.70986
6	6	-1675.9064	-2.10142
6	7	-1675.2522	-1.10924
7	0	-1678.0775	-6.85273
7	1	-1677.6086	-6.55079
7	2	-1677.0653	-5.78127
7	3	-1676.9852	-6.1607
7	4	-1676.8560	-5.76281
7	5	-1676.5969	-5.91314
7	6	-1675.8701	-4.88854
7	7	-1675.86	-4.86183
7	8	-1675.1912	-3.80643
7	9	-1673.7123	-4.44113

7	10	-1673.6864	-4.47806
7	11	-1673.5740	-2.2790
7	12	-1673.3073	-1.61104
7	13	-1673.2605	-4.26412
7	14	-1672.9025	-3.81209
7	15	-1671.9021	-3.28877
8	0	-1677.8954	-5.12763
8	1	-1677.8606	-5.13171
8	2	-1677.4607	-4.97659
8	3	-1677.1375	-4.68215
8	4	-1674.5629	-1.57719
8	5	-1669.6046	1.58003
8	6	-1661.5012	8.0904
8	7	-1661.3027	8.54353
8	8	-1661.1112	8.98022
9	0	-1677.5836	-4.18296
9	1	-1677.5836	-4.18296
9	2	-1677.5836	-4.18296
9	3	-1677.4962	-3.5759
9	4	-1675.4346	-3.50499
9	5	-1675.4346	-3.50499
9	6	-1675.4346	-3.50499
9	7	-1675.4346	-3.50499
9	8	-1675.4346	-3.50499
10	0	-1677.3770	-6.28287
10	1	-1677.1204	-4.86459
10	2	-1677.1008	-4.87309
10	3	-1677.0767	-4.74073
10	4	-1676.6816	-4.38667
10	5	-1676.6367	-4.51105
10	6	-1673.2062	-4.45213
10	7	-1672.7495	-3.23355
11	0	-1676.5979	0.278529
11	1	-1676.5979	0.278529
11	2	-1676.5979	0.278529
11	3	-1676.0491	0.369991
11	4	-1676.4910	0.369991
11	5	-1676.4910	0.369991
11	6	-1676.4910	0.369991
11	7	-1676.4089	0.467763
12	0	-1676.4048	-10.8457
12	1	-1675.6113	-8.91076
12	2	-1671.6587	-6.48345
12	3	-1667.9731	-1.2034
12	4	-1667.8005	-1.19399
12	5	-1666.5807	0.224946
12	6	-1666.1151	-1.17334
12	7	-1665.3723	-0.01369282
13	0	-1676.3665	-4.53109
13	1	-1670.5647	-0.556275
13	2	-1670.1060	-0.320882
13	3	-1667.2083	2.20795
13	4	-1666.8389	0.203483
13	5	-1658.3712	10.9054
13	6	-1658.2483	10.7782
13	7	-1657.3501	9.89298
14	0	-1676.3162	-4.06087
14	1	-1676.3002	-4.08209
14	2	-1675.3173	-4.78913
14	3	-1666.1812	3.55437
14	4	-1666.1556	3.55654
14	5	-1664.7654	5.84196
14	6	-1655.9250	8.95265
14	7	-1654.9381	12.4163
15	0	-1676.2931	-4.54734
15	1	-1673.8154	-3.71505
15	2	-1673.7103	-1.99434
15	3	-1671.0529	-0.939875
15	4	-1670.4226	0.437989
15	5	-1668.9924	1.14551
15	6	-1661.5465	6.52461
16	0	-1676.2125	-7.03247
16	1	-1676.1649	-7.03354
16	2	-1673.4147	-6.13318

16	3	-1673.4121	-4.36235
16	4	-1673.4066	-6.14506
16	5	-1673.3857	-6.13985
16	6	-1672.1256	-3.46388
16	7	-1671.0588	-4.38383
17	0	-1676.0503	-7.91179
17	1	-1675.8353	-7.18211
17	2	-1673.3171	-6.35308
17	3	-1673.3076	-6.30381
17	4	-1673.2947	-6.35211
17	5	-1673.2932	-6.34862
17	6	-1672.2208	-2.08147
17	7	-1672.1655	-2.45947
18	0	-1676.0503	-5.43366
18	1	-1675.7285	-5.73013
18	2	-1675.7236	-5.77212
18	3	-1675.6901	-5.76378
18	4	-1675.6777	-5.93594
18	5	-1675.67	-5.6906
18	6	-1675.6235	-5.56745
18	7	-1669.7894	0.101109
19	0	-1675.7233	-3.7874
19	1	-1675.4546	-3.41329
19	2	-1672.9050	-1.4576
19	3	-1672.4688	-0.662851
19	4	-1672.3457	-0.620485
19	5	-1671.1377	-0.627779
19	6	-1671.0017	-0.601826
19	7	-1657.0283	14.5851
20	0	-1675.6711	-6.5425
20	1	-1675.6711	-6.5425
20	2	-1675.6711	-6.5425
20	3	-1675.6711	-6.5425
20	4	-1675.6680	-6.65232
20	5	-1675.6680	-6.65232
20	6	-1675.5519	-6.66897
20	7	-1675.5519	-6.66897
21	0	-1675.3749	-0.587916
21	1	-1675.3749	-0.587916
21	2	-1675.3738	-0.309595
21	3	-1675.3738	-0.309595
21	4	-1675.3738	-0.309595
21	5	-1675.2136	-0.311806
21	6	-1675.2136	-0.311806
21	7	-1675.2136	-0.311806
22	0	-1675.3350	-2.37393
22	1	-1674.4662	-4.33392
22	2	-1674.1705	-4.30381
22	3	-1673.2413	-2.07738
22	4	-1672.9834	-2.09466
22	5	-1672.91	-2.10247
22	6	-1672.5189	-0.797247
22	7	-1672.2489	-2.62785
23	0	-1675.3148	-6.05501
23	1	-1675.2852	-6.03771
23	2	-1675.2548	-5.21286
23	3	-1675.1282	-5.24717
23	4	-1674.4303	-4.91891
23	5	-1672.7382	-2.00452
23	6	-1672.4373	-1.59216
23	7	-1672.4353	-1.58822
24	0	-1675.2809	-3.57808
24	1	-1675.2726	-3.64723
24	2	-1675.2689	-3.60388
24	3	-1673.5537	-4.12798
24	4	-1673.0718	-3.53815
24	5	-1672.9431	-3.53287
24	6	-1672.4521	-0.442628
24	7	-1672.0317	-1.10713
25	0	-1675.2288	-0.518043
25	1	-1675.2288	-0.518043
25	2	-1674.9849	-0.511247
25	3	-1674.9849	-0.511247
25	4	-1674.9124	-0.609182

25	5	-1674.9124	-0.609182
25	6	-1674.9124	-0.609182
25	7	-1674.9124	-0.609182
26	0	-1674.9279	-1.74823
26	1	-1674.9272	-1.7328
26	2	-1672.2798	1.77333
26	3	-1672.2358	1.74299
26	4	-1671.8890	1.43343
26	5	-1671.8656	1.41585
26	6	-1671.8656	1.41585
26	7	-1671.7201	1.45567
27	0	-1674.2982	-9.34518
27	1	-1674.1803	-9.34513
27	2	-1673.8310	-9.27921
27	3	-1673.1469	-8.97249
27	4	-1660.2212	2.78783
27	5	-1660.2108	2.78814
27	6	-1659.9895	0.784841
27	7	-1659.9067	2.81887
28	0	-1674.1672	-3.84891
28	1	-1674.1364	-3.8496
28	2	-1674.1351	-3.8495
28	3	-1673.2336	-2.23692
28	4	-1673.2317	-2.30586
28	5	-1667.1061	4.79946
28	6	-1666.9143	4.17823
28	7	-1666.8413	4.11647
29	0	-1673.9999	-7.86988
29	1	-1673.9868	-7.86013
29	2	-1673.6620	-8.17716
29	3	-1673.1823	-7.75947
29	4	-1673.1454	-7.75858
29	5	-1672.9238	-6.88657
29	6	-1665.9230	-1.81544
30	0	-1673.3563	-1.7425
30	1	-1673.3250	-1.73191
30	2	-1673.3250	-1.73191
30	3	-1673.3250	-1.73191
30	4	-1673.3250	-1.73191
30	5	-1673.3250	-1.73191
30	6	-1673.2966	-1.71929
30	7	-1673.2966	-1.71929
31	0	-1669.5702	2.10991
32	0	-1664.9136	-4.19626
33	0	-1664.0927	10.2724

Apêndice 6 – Tabela 2: Resultados do SwissDock para o *docking* da plumieridina na TS de *C. gattii* R265.

Cluster	ClusterRank	Fitness	Energy
0	0	-1792.2771	-7.59778
0	1	-1792.2771	-7.59778
0	2	-1792.2771	-7.59778
0	3	-1792.2771	-7.59778
0	4	-1792.0575	-7.9529
0	5	-1792.0575	-7.9529
0	6	-1790.3049	-7.04274
0	7	-1790.3049	-7.04274
1	0	-1790.0215	-13.0723
1	1	-1790.0215	-13.0723
1	2	-1790.0215	-13.0723
1	3	-1790.0150	-13.0722
1	4	-1790.0150	-13.0722

1	5	-1789.9869	-13.0708
1	6	-1789.9869	-13.0708
1	7	-1789.9869	-13.0708
2	0	-1788.5702	-6.38786
2	1	-1788.5702	-6.38786
2	2	-1788.1311	-5.81689
2	3	-1788.1311	-5.81689
2	4	-1788.1311	-5.81689
2	5	-1782.9603	-2.2272
2	6	-1782.9603	-2.2272
2	7	-1782.9603	-2.2272
3	0	-1788.5667	-8.92855
3	1	-1784.6760	-5.45805
3	2	-1784.5399	-5.46163
3	3	-1783.0730	-4.07244
3	4	-1781.0390	-3.37865
3	5	-1780.5642	-1.21347
3	6	-1767.8302	9.35236
3	7	-1767.5774	9.24709
4	0	-1788.1654	-11.8077
4	1	-1788.1069	-11.7566
4	2	-1785.7990	-10.0475
4	3	-1783.4565	-9.94074
4	4	-1777.7206	-4.96006
4	5	-1776.3516	-3.96605
5	0	-1787.2142	-3.48991
5	1	-1787.1151	-3.4888
5	2	-1787.1151	-3.4888
5	3	-1787.1151	-3.4888
5	4	-1787.1	-3.4865
5	5	-1787.1	-3.4865
5	6	-1787.1	-3.4865
5	7	-1787.1	-3.4865
6	0	-1786.5519	-4.18886
6	1	-1786.4867	-4.17392
6	2	-1785.4005	-4.08591
6	3	-1785.3325	-4.04762
6	4	-1781.0387	-2.59053
6	5	-1780.4652	-1.72319
7	0	-1786.1846	-7.95812
7	1	-1786.0302	-7.98334
7	2	-1785.8807	-7.96753
7	3	-1785.4592	-7.24574
7	4	-1785.2941	-7.12448
7	5	-1784.8917	-6.98836
7	6	-1784.6974	-4.90323
7	7	-1784.4111	-5.27864
7	8	-1783.5134	-5.73902
7	9	-1783.4454	-5.68593
8	0	-1786.0367	-0.528697
8	1	-1786.0367	-0.528697
8	2	-1785.8529	-0.443686
8	3	-1785.6145	-0.17236

8	4	-1785.6145	-0.17236
8	5	-1785.5504	-0.139065
8	6	-1785.3125	0.04045436
8	7	-1785.1111	0.122094
9	0	-1785.8468	-3.99281
9	1	-1784.4431	-6.15647
9	2	-1783.7151	-2.4788
9	3	-1783.4838	-3.50483
9	4	-1783.2750	-6.61305
9	5	-1783.2605	-6.04766
9	6	-1782.0344	-5.24958
9	7	-1780.4915	-0.661383
9	8	-1777.5464	2.25533
9	9	-1777.4407	2.49846
9	10	-1777.4133	2.49798
9	11	-1769.5952	4.29866
9	12	-1766.7457	7.7356
10	0	-1785.8378	-2.61062
10	1	-1785.8378	-2.61062
10	2	-1785.8060	-2.62287
10	3	-1785.7019	-2.21929
10	4	-1785.5991	-4.46421
10	5	-1785.3440	-5.52185
10	6	-1785.3440	-5.52185
10	7	-1785.3177	-4.12692
10	8	-1785.3177	-4.12692
10	9	-1785.2589	-5.49295
10	10	-1785.2589	-5.49295
10	11	-1785.2589	-5.49295
10	12	-1785.2441	-5.50677
10	13	-1785.2441	-5.50677
10	14	-1785.2441	-5.50677
10	15	-1785.1382	-4.03189
11	0	-1785.6465	0.05379941
11	1	-1785.6465	0.05379941
11	2	-1785.6465	0.05379941
11	3	-1785.5978	0.07116989
11	4	-1785.5833	-0.166312
11	5	-1785.5833	-0.166312
11	6	-1785.5833	-0.166312
11	7	-1785.5833	-0.166312
12	0	-1785.5568	-5.18592
12	1	-1785.5568	-5.18592
12	2	-1785.4777	-4.9771
12	3	-1784.9314	-4.4120
12	4	-1779.8967	-1.20001
12	5	-1778.1309	0.225938
12	6	-1778.1309	0.225938
12	7	-1778.0955	0.339902
13	0	-1784.9280	-3.92887
13	1	-1784.9115	-3.94903
13	2	-1784.8081	-5.08295
13	3	-1784.7168	-4.75965

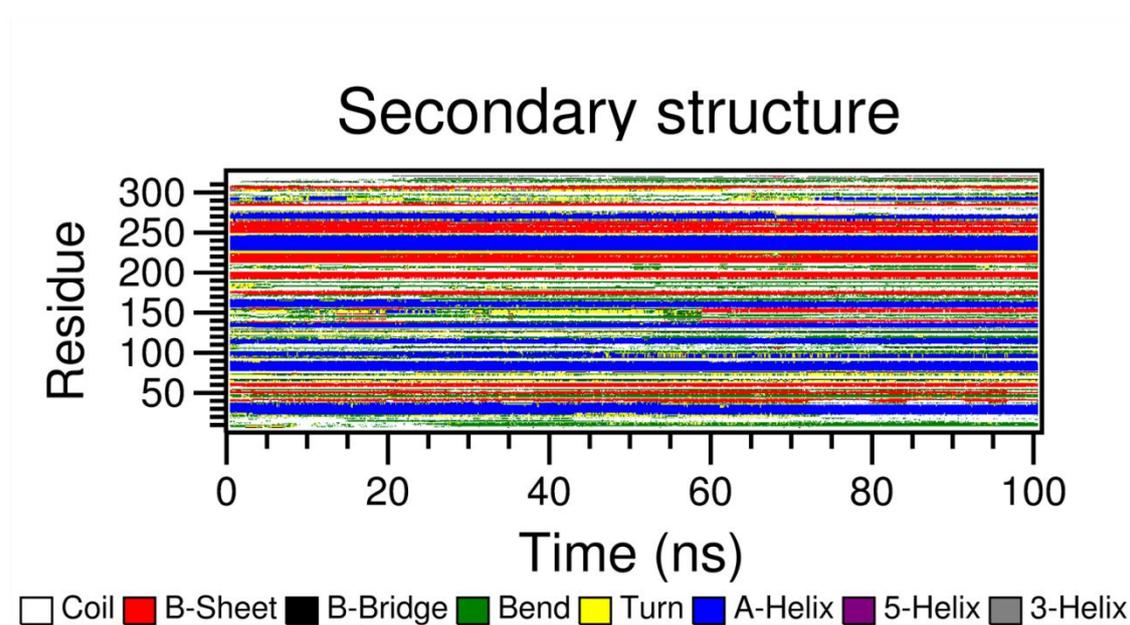
13	4	-1784.6583	-3.54699
13	5	-1784.6371	-4.88845
13	6	-1781.4027	-2.99328
13	7	-1779.2120	-1.85247
14	0	-1784.8718	-1.99129
14	1	-1784.8718	-1.99129
14	2	-1784.8718	-1.99129
14	3	-1784.8533	-1.98772
14	4	-1784.8533	-1.98772
14	5	-1784.8533	-1.98772
14	6	-1784.8469	-1.99052
14	7	-1784.8469	-1.99052
15	0	-1784.8062	-6.34488
15	1	-1784.8062	-6.34488
15	2	-1784.8062	-6.34488
15	3	-1783.93	-6.00502
15	4	-1783.93	-6.00502
15	5	-1783.93	-6.00502
15	6	-1783.8790	-5.92333
15	7	-1783.8790	-5.92333
16	0	-1783.4661	1.6801
16	1	-1783.4661	1.6801
16	2	-1783.2910	1.81224
16	3	-1783.2910	1.81224
16	4	-1783.2910	1.81224
16	5	-1782.6224	3.59304
16	6	-1782.6224	3.59304
16	7	-1782.6224	3.59304
17	0	-1783.3175	-7.10926
17	1	-1783.3175	-7.10926
17	2	-1783.3175	-7.10926
17	3	-1782.2250	-7.97553
17	4	-1782.2250	-7.97553
17	5	-1782.2250	-7.97553
17	6	-1782.2250	-7.97553
17	7	-1782.1368	-7.18552
18	0	-1783.1143	-14.5010
18	1	-1783.0164	-14.5156
18	2	-1782.9729	-14.2215
18	3	-1782.9318	-14.3121
18	4	-1781.9392	-13.6962
18	5	-1781.3616	-10.5072
18	6	-1768.5173	-4.28491
18	7	-1768.2905	-4.24159
19	0	-1782.9598	-0.806329
19	1	-1782.9598	-0.806329
19	2	-1782.8577	-0.78334
19	3	-1782.8577	-0.78334
19	4	-1782.8577	-0.78334
19	5	-1782.8577	-0.78334
19	6	-1782.6864	-0.703436
19	7	-1782.6864	-0.703436
20	0	-1782.8440	-4.2250

20	1	-1782.8336	-4.30929
20	2	-1782.8070	-4.35385
20	3	-1778.1617	0.40863
20	4	-1778.1617	0.40863
20	5	-1778.1617	0.40863
20	6	-1778.0092	0.352158
20	7	-1777.9661	0.349107
21	0	-1782.6671	0.53496
21	1	-1782.6671	0.53496
21	2	-1782.6671	0.53496
21	3	-1782.4021	1.12182
21	4	-1782.4021	1.12182
21	5	-1781.9812	1.93341
21	6	-1781.9812	1.93341
21	7	-1781.9812	1.93341
22	0	-1782.5078	-12.0196
22	1	-1780.3387	-10.1961
22	2	-1777.0923	-8.87446
22	3	-1774.0157	-6.66026
22	4	-1772.1626	-4.1495
22	5	-1770.0130	-4.72868
22	6	-1766.3553	4.20918
22	7	-1757.4281	6.23442
23	0	-1782.4526	-4.23214
23	1	-1782.4526	-4.23214
23	2	-1782.4342	-4.24179
23	3	-1782.4342	-4.24179
23	4	-1782.4342	-4.24179
23	5	-1781.9207	-4.05698
23	6	-1781.9207	-4.05698
23	7	-1781.9207	-4.05698
24	0	-1782.2075	-14.3954
24	1	-1782.1012	-15.4050
24	2	-1773.3428	-9.0794
24	3	-1771.8378	-10.3975
24	4	-1769.8862	-3.39121
24	5	-1769.7478	-3.34342
24	6	-1767.7262	-2.08478
24	7	-1767.4261	-3.44924
25	0	-1782.1565	-0.52565
25	1	-1782.1439	-0.525031
25	2	-1782.1439	-0.525031
25	3	-1782.1289	-0.5236
25	4	-1769.5264	13.2909
25	5	-1769.5264	13.2909
25	6	-1769.2336	13.5764
25	7	-1769.0988	13.2695
26	0	-1781.9329	2.07062
26	1	-1781.9329	2.07062
26	2	-1781.9312	1.98743
26	3	-1781.9312	1.98743
26	4	-1781.9312	1.98743
26	5	-1781.8772	2.15114

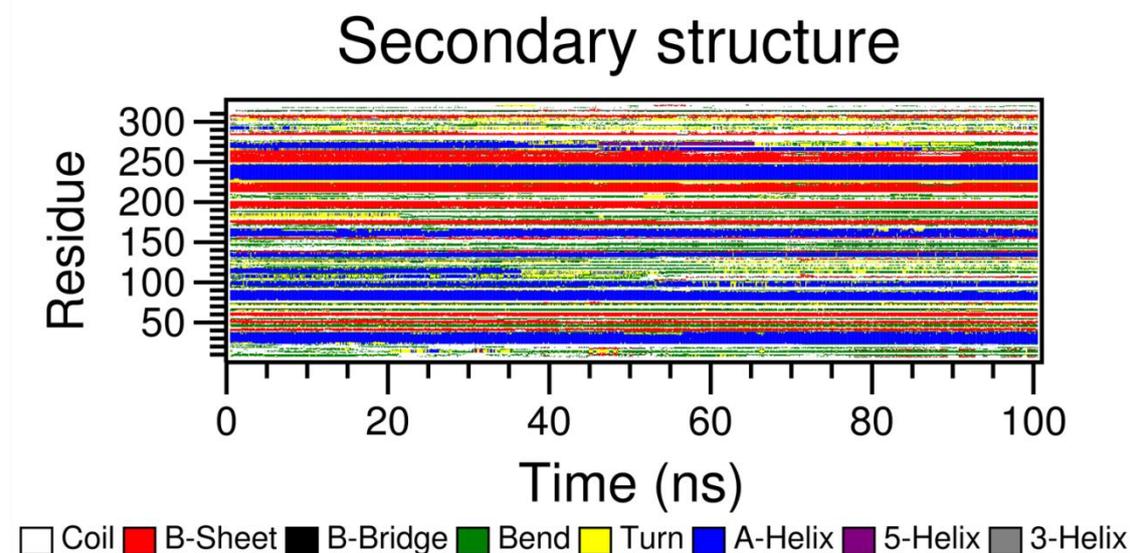
26	6	-1781.8772	2.15114
26	7	-1781.8772	2.15114
27	0	-1781.5680	4.35638
27	1	-1781.5680	4.35638
27	2	-1781.3857	4.48272
27	3	-1781.3857	4.48272
27	4	-1781.3843	4.47787
27	5	-1781.3843	4.47787
27	6	-1781.3843	4.47787
27	7	-1781.3843	4.47787
28	0	-1781.2334	-3.45862
28	1	-1780.7146	-2.57757
28	2	-1771.9463	1.90346
28	3	-1771.0637	4.35088
28	4	-1770.7057	3.44286
28	5	-1770.6555	3.44863
28	6	-1755.4388	18.2746
28	7	-1737.1826	38.9546
29	0	-1780.9045	-4.43078
29	1	-1780.3878	-4.75767
29	2	-1779.9547	-4.68319
29	3	-1778.2571	-3.66515
29	4	-1777.6674	-3.74155
29	5	-1777.4650	-3.54006
29	6	-1772.3351	4.27766
29	7	-1767.3895	5.67285
29	8	-1766.9131	7.42187
29	9	-1766.8436	6.14041
29	10	-1766.8284	6.14291
30	0	-1751.9451	21.7809
30	1	-1741.1882	31.9476

APÊNDICE 7:

Predição da estrutura secundária das proteínas, realizadas com o DSSP através da ferramenta do `_dssp` do programa GROMACS:

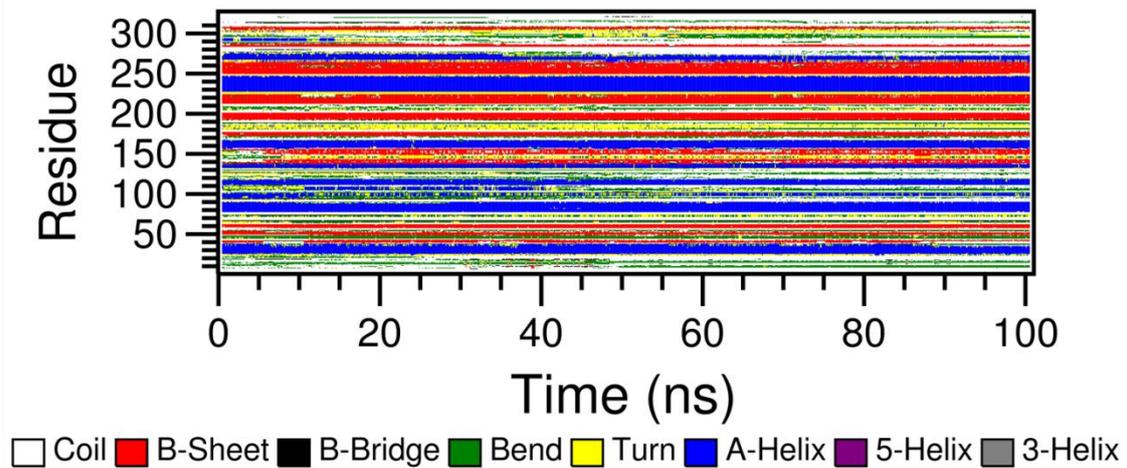


Apêndice 7 – Figura 1: DSSP da TS de *C. neoformans* H99 sem a plumieridina.



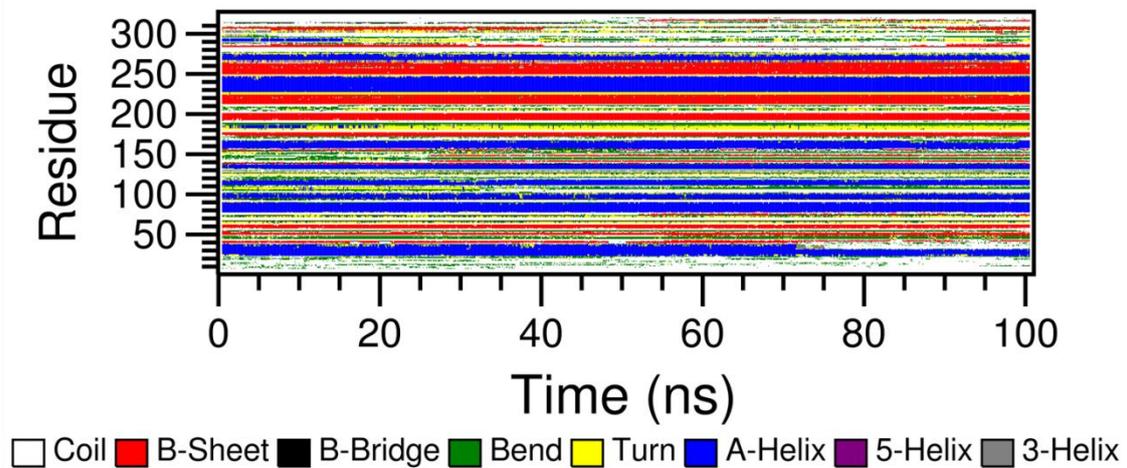
Apêndice 7 – Figura 2: DSSP da TS de *C. neoformans* H99 com a plumieridina.

Secondary structure



Apêndice 7 – Figura 3: DSSP da TS de *C. gattii* R265 sem a plumieridina.

Secondary structure



Apêndice 7 – Figura 4: DSSP da TS de *C. gattii* R265 com a plumieridina.