

Estudos *in silico* da interação entre a molécula Plumieridina e a enzima Timidilato Sintase de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Renato Kulakowski Corá^{1,2}, Marilene Henning Vainstein²

1 Biotecnologia Molecular, UFRGS; 2 Centro de Biotecnologia, UFRGS.

INTRODUÇÃO

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras patogênicas de humanos, causadoras da criptococose. Sua infecção ocorre inicialmente nos pulmões, podendo disseminar-se pelo sistema circulatório, chegando também ao cérebro, onde sua proliferação acarreta em meningite, que pode levar a óbito. *C. neoformans* apresenta virulência especificamente a imunodeficientes, e imunossuprimidos, sendo responsável por grande parte dos óbitos de pacientes acometidos com AIDS. *C. gattii*, todavia, se mostrou ainda mais virulento, infectando também à imunocompetentes. (Kwon-Chung, KJ, 2014)

Os tratamentos a esta infecção podem apresentar efeitos indesejados, como neurotoxicidade, além de, a longo prazo, ocasionar a aquisição de resistência dos fungos aos fármacos. Isto torna necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da criptococose. (Fisher JF et al, 1983)

Em estudos anteriores do nosso grupo, realizados a partir do extrato de sementes de *Allamanda polyantha*, foram identificados e isolados dois iridóides com ação antifúngica, a Plumieridina e o Plumierídeo. Estes compostos foram então submetidos ao PharmMapper (Liu, X. et al. 2010), uma ferramenta computacional online que aponta potenciais alvos para a ação de compostos químicos. Entre as proteínas indicadas por ele, três estavam na rota das pirimidinas, destacando-se a Timidilato Sintase (TS), um alvo já conhecido da Flucitosina, medicamento atualmente usado no tratamento da criptococose (Espinel-Ingroff A, 2012). Por conseguinte, este trabalho tem como objetivo a caracterização *in silico* da interação do composto químico Plumieridina sobre a proteína TS de *C. neoformans* e *C. gattii*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelagem comparativa por homologia: As TS de *C. neoformans* (H99) e *C. gattii* (R265) foram então modeladas com o programa Modeller (Sali & Blundell, 1993), para obtenção de modelos tridimensionais a serem usados no Docking Molecular e nas análises a seguir. Para a criação dos modelos foi utilizada um molde da própria TS de *C. neoformans*, tendo uma identidade de 97,16% para H99, e de 95,58% para R265.

Docking Molecular: A Plumieridina e os modelos obtidos a partir do Modeller foram então submetidos ao SwissDock (Grosdidier A. et al, 2011) e ao PatchDock (Schneidman-Duhovny D. et al, 2005), dois servidores de Docking Molecular online. O resultado obtido foi analisado agrupando as posições descritas e comparando o resultados dos dois servidores, considerando-se informações já descritas na literatura, como por exemplo, a localização do sítio catalítico. Foram então selecionados três grupos de ancoramento para cada TS.

Dinâmica Molecular (DM): Foram, então, montadas DM's com as TS's para cada posição de Docking escolhida, totalizando seis DM's, objetivando-se avaliar a interação ligante-receptor nas posições selecionadas. O sistema foi devidamente termalizado por 35 ps, seguidos de simulações de 50 ns, realizadas com o pacote de programas GROMACS (Berendsen, et al., 1995), utilizando o campo de força 53a6 (Oostenbrink C, 2004). Ao fim da simulação foi verificada a permanência, ou não, da ligação da Plumieridina com a TS. Nos casos onde a Plumieridina permaneceu ligada, e na simulação sem ela, a DM foi analisada através de gráficos gerados com programas do próprio pacote do GROMACS.

Avaliação ligante-receptor: Para avaliação da interação ligante-receptor, utilizou-se o programa LigPlot (Wallace A C, 1996), avaliando-se as interações entre a molécula Plumieridina e a proteína TS durante a DM, a cada 10 ns.

RESULTADOS

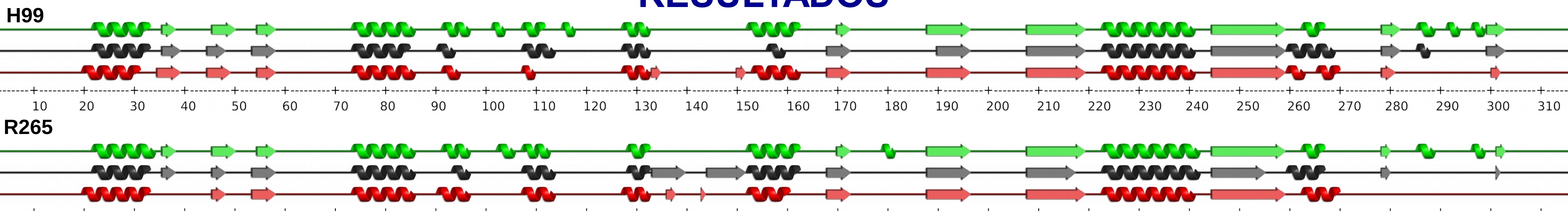


Figura 1. Representação esquemática da estrutura secundária da TS. Em VERDE temos a estrutura inicial, em PRETO na ausência de Plumieridina aos 50 ns de simulação, e em VERMELHO a única posição de docking que permaneceu ligada após os 50 ns. Esta corresponde ao sítio catalítico da TS.

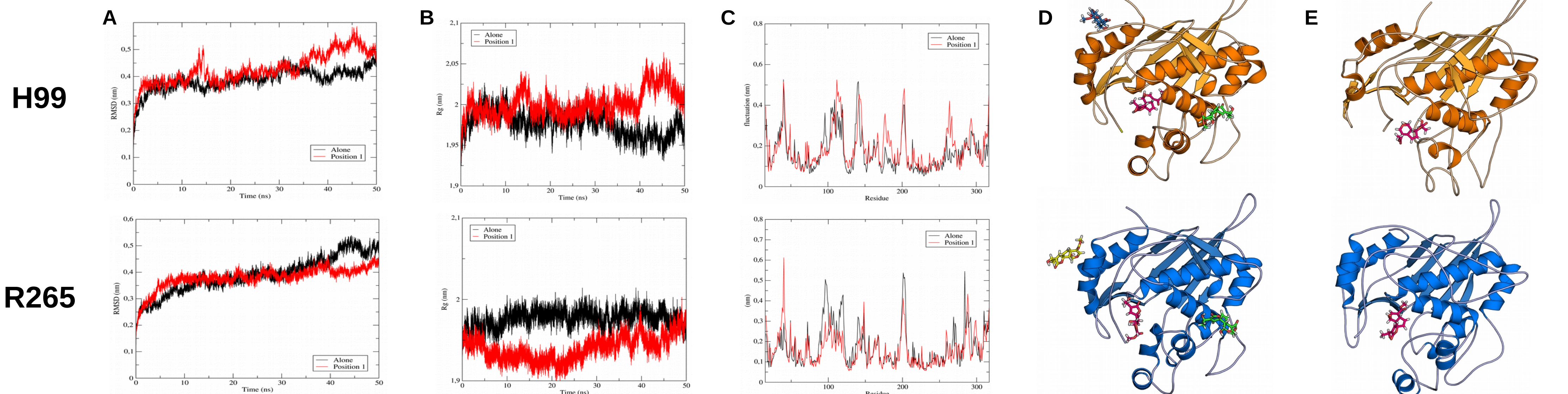


Figura 2. Resultados da DM para as posições ligadas e para simulação sem Plumieridina. Acima estão representados os resultados da simulação realizada com a TS de H99, e abaixo a de R265. Em PRETO estão representados os dados das simulações na ausência de Plumieridina, e em VERMELHO os dados da simulação com Plumieridina no sítio catalítico. A) RMSD: Desvio médio quadrático para todos átomos da proteína em relação ao tempo. B) Raio de giro da proteína ao longo da simulação. C) RMSF: Indica a flexibilidade dos resíduos de aminoácido da proteína no intervalo de tempo analisado (30 ns ao 50 ns). D) TS ligada a Plumieridina nas três posições iniciais de docking, representadas em azul, rosa e verde na TS de H99, e em amarelo, rosa e verde na de R265. E) TS e Plumieridina ao fim da DM para a posição que permaneceu ligada. Apesar de em ambos casos a região de docking ter sido a mesma, a configuração da molécula apresenta configurações diferentes, e energia de interação média de $-200,765 \pm 39,6553$ kJ/mol para H99, e $-177,164 \pm 40,8657$ kJ/mol para R265.

Tabela 1. Interações da molécula Plumieridina com os resíduos de aminoácido da TS ao longo da simulação. (O) Representa interações hidrofóbicas, e (I) interações hidrofílicas. O LARANJA representa interações observadas na TS de H99, e o AZUL na TS de R265. (LIG) corresponde ao número de interações ligante-receptor nos diferentes tempos avaliados.

AA/Tempo (ns)	Arg 70	Val 71	Phe 72	Arg 74	Gly 75	Gly 99	Ile 100	Trp 101	Asp 102	Asn 104	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	Ile 311	Asp 312	Met 313	Lys 314	Met 315	Ser 316	Ala 317	LIG	
1						O	OO	OO		OO					O				O														14/8
10				O		O	OO	O	O	II	I	O	O		O													O				8/7	
20						O	O	O	O	O		O	O		O												I	O	O	OO	O		7/8
30	O	O	I	O			O	O		II	I	O	O		I						O					O		O	OO	O			11/9
40			O				O	O				O	O		O									O		O		I	O	O	I		9/6
50			O	O	I	O	OO	OO	I		I	O	O		O								O					O	OO	O	O		10/9

DISCUSSÃO: A partir das informações acima, pudemos inferir algumas características da interação da Plumieridina com a TS de H99 e R265.

- Em ambos casos notamos através dos RMSF's (Figura 2C), que a região de alça entre os resíduos Gly99 e Asn104 (Figura 1) parece ter ficado mais estável com a interação com a Plumieridina (Tabela 1).
- Também observamos uma região de interação em comum ao redor do aminoácido Met315. Já próximo a região do aminoácido Pro185, vemos uma interação somente presente em H99, que parece acarretar em instabilidade para esta região de alça (Figura 2C), que acreditamos ser devida a uma interação variável entre estes resíduos com a Plumieridina.
- Identificamos ainda uma interação da Plumieridina com a região do aminoácido Arg70 da TS de R265, que surge com o decorrer da simulação, e correspondente a uma região intermediária entre uma alça e uma hélice.

PERSPECTIVAS: Realizar mais análises em cima dos dados apresentados, para uma melhor caracterização e diferenciação das interações da TS de H99 e R265. Pretendemos também alongar o tempo de simulação para 100 ns visando um melhor entendimento das bases moleculares da interação ligante-receptor.