

## INTRODUÇÃO

*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são leveduras basidiomicéticas encapsuladas, e os agentes etiológicos da criptococose (Kwon-Chung, 1975; Kwon-Chung, 1976). O tratamento da criptococose está geralmente associado ao uso de três fármacos: a anfotericina B, o fluconazol e a flucitosina. A combinação de anfotericina B com flucitosina constitui o método mais eficaz de tratamento, embora apresente alta toxicidade. Entre os métodos alternativos está o uso de fluconazol, em altas doses, e por longos prazos de tempo, o que torna muito comum a aquisição de resistência, principalmente nas regiões subdesenvolvidas, onde esse método é mais comum (Maziarsz & Perfect, 2016; Rajasingham et al., 2012). Tendo em vista o exposto, identifica-se a necessidade do desenvolvimento de fármacos que agreguem novos métodos de tratamento aos existentes. 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 (Figura 1) e o plumierideo (Bresciani, 2013). Relatos anteriores demonstram que a molécula do plumierideo pode ser convertida na da plumieridina através de hidrólise enzimática com celulases (Schliemann & Adam, 1982). Entretanto, o mecanismo de ação e o alvo celular dessa molécula não são conhecidos.

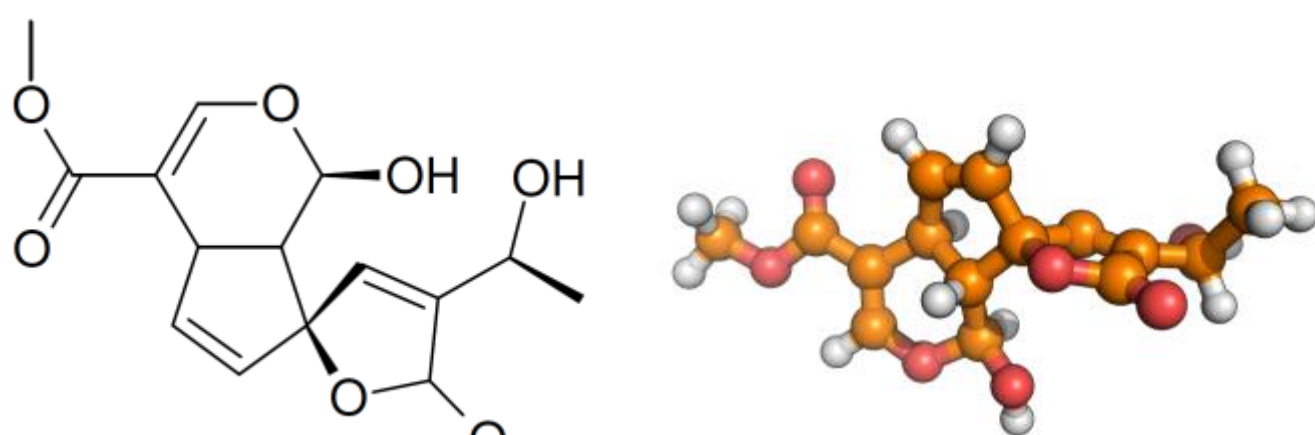


Figura 1: Estrutura bidimensional e tridimensional da plumieridina.

## OBJETIVOS

Ante o exposto, o objetivo deste trabalho consiste em identificar e avaliar, por métodos *in silico*, possíveis proteínas alvos para a molécula da plumieridina, a fim de guiar sua caracterização experimental *in vitro*, e facilitar a determinação do seu mecanismo de ação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Otimização da estrutura da plumieridina:** A estrutura da plumieridina foi, inicialmente, desenhada e otimizada com o programa Avogadro (Hanwell et al., 2012), e campo de força GAFF (Wang et al., 2004). Em seguida, foi submetida a uma otimização mais robusta no programa GAMESS (Schmidt et al., 1993), com as bases de cálculo quântico 3-21G\*\* e 6-31G\*\*, através do método de Hartree-Fock.

**Predição de potenciais alvos:** A molécula otimizada foi, então, submetida ao servidor *online* do PharmMapper (Liu et al., 2010), com a geração de 300 conforméres, e avaliando alvos no banco de dados. Dentre os 50 melhores resultados listados, pudemos identificar três proteínas da rota das pirimidinas, a dihidrorotato desidrogenase, a orotidina-5'-fosfato descarboxilase, e a timidilato sintase (TS), que além de ser a melhor posicionada entre as três e aparecer duas vezes na lista (em diferentes conformações da proteína), também é o alvo da ação da flucitosina. Decidimos por tanto, torná-la o foco de nosso estudo.

**Modelagem comparativa por homologia:** As TSs de *C. neoformans* (linhagem H99) e *C. gattii* (linhagem R265) foram então modeladas com o programa Modeller 9.15 (Fiser & Sali, 2003). Em ambos casos um molde de *C. neoformans* (PDBID: 2AAZ) (Finer-Moore et al., 2005) que possuía 97.16% de identidade com a TS de H99 e 95.58% com a de R265 foi utilizado. Os modelos gerados em cada modelagem foram validados com os servidores *online* MolProbity (Davis et al., 2007) e Swiss-Model (Arnold et al., 2006).

**Docking molecular:** A estrutura otimizada da proteína foi ancorada nos modelos produzidos na etapa anterior. Dois servidores *online* de docking foram utilizados para isso, o PatchDock (Schneidman-Duhovny et al., 2005) e o SwissDock (Grosdidier, Zoete and Michielin, 2011). Seus resultados foram sobrepostos e separados em agrupamentos (Figura 3), que foram, finalmente, comparados.

**Dinâmica molecular:** Com base nos dados do docking, três complexos TS-plumieridina foram selecionados para cada espécie do fungo, dentre os quais um possuía a plumieridina ancorada no sítio catalítico da proteína. Quatro simulações de dinâmica molecular foram realizadas, tanto para H99 quanto para R265, sendo uma para cada complexo, e mais uma para a TS na ausência de plumieridina. Para isso, o pacote de programas GROMACS 4.5.7 (Berendsen, Spoel and Druen, 1995) foi utilizado, com campo de força GROMOS53a6 (Oostenbrink et al., 2004). Os sistemas foram simulados em água com contra íons, de forma a neutralizar sua carga. Eles foram inicialmente minimizados com os métodos de gradiente conjugado e descida oblíqua, termalizados com uma rampa de aquecimento até 310 K e, então, simulados durante 100 ns. As simulações dos complexos TS-plumieridina foram, em alguns casos, terminadas com tempos inferiores, quando a interação proteína-ligante deixou de ocorrer.

## RESULTADOS

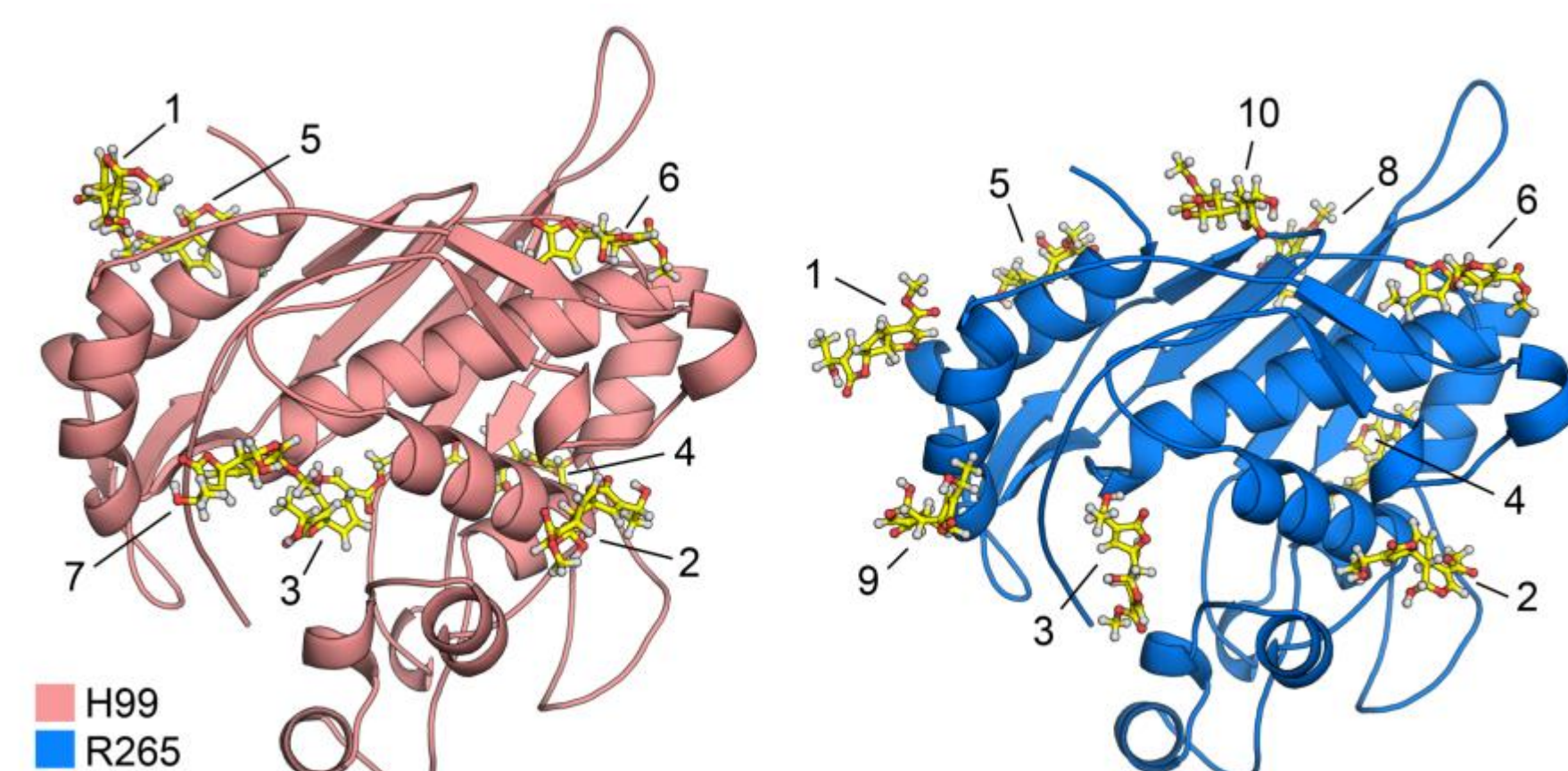


Figura 2. Modelos gerados pelo Modeller 9.15 e posições de docking previstas pelos servidores. As posições [1], [2] e [3] foram simuladas individualmente com a TS. A posição [3] está localizada no sítio catalítico, e foi a única em que o complexo TS-plumieridina se manteve estável pelos 100 ns estipulados.

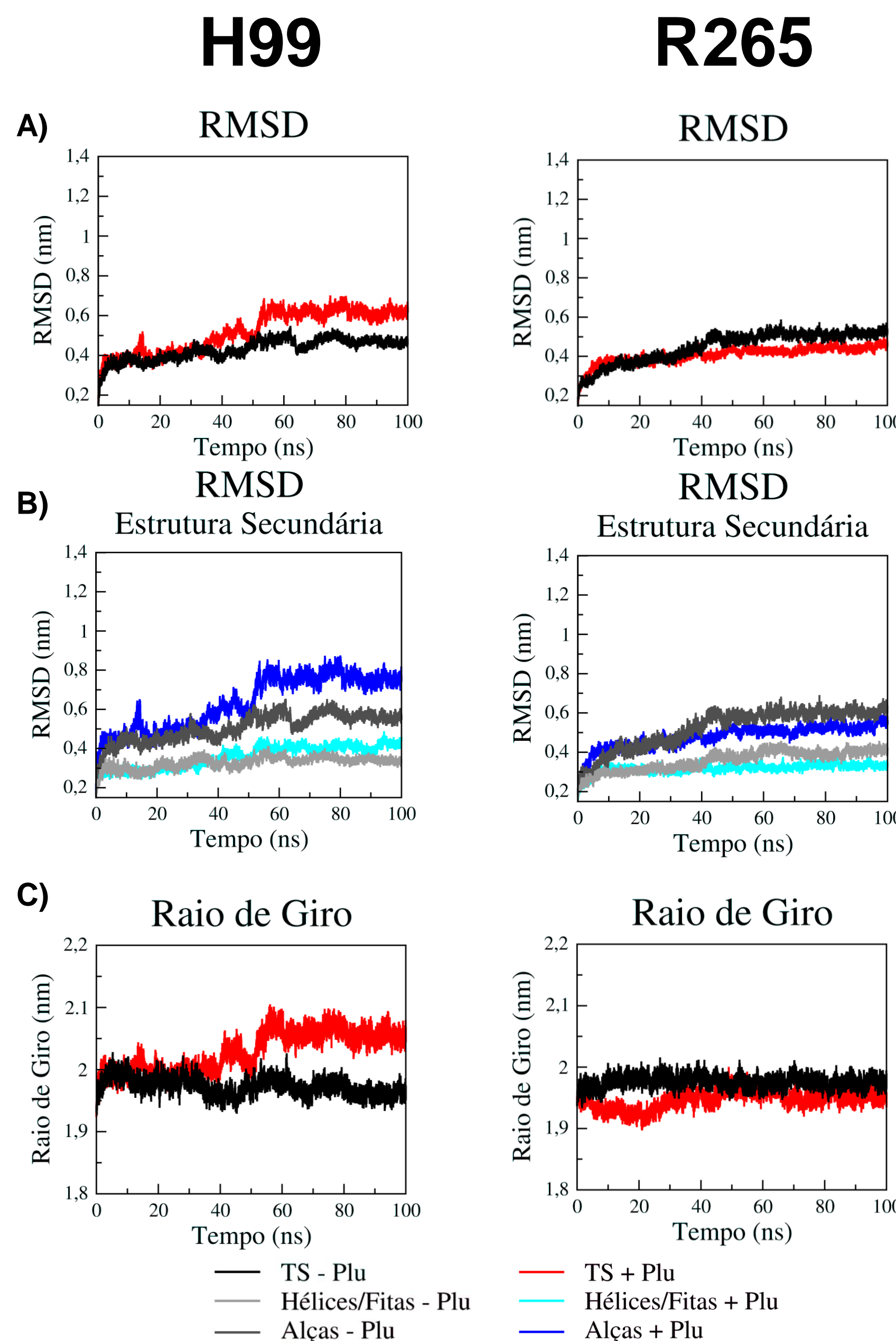


Figura 3. Análises da simulação. A) RMSD da estrutura total da proteína. Todas simulações se estabilizaram durante o tempo simulado. A do complexo TS-plumieridina de H99, entretanto, apresenta a menor estabilização, isso se reflete na análise das alças (3B). Em contrapartida, a estabilização do complexo em R265 aparenta ser consequência de uma estabilização uniforme, em toda estrutura. C) Raio de giro da proteína. Todas estruturas se mantêm estáveis com exceção do complexo TS-plumieridina em H99 que, devido a maior flexibilidade das alças, não mantém um formato tão regular.

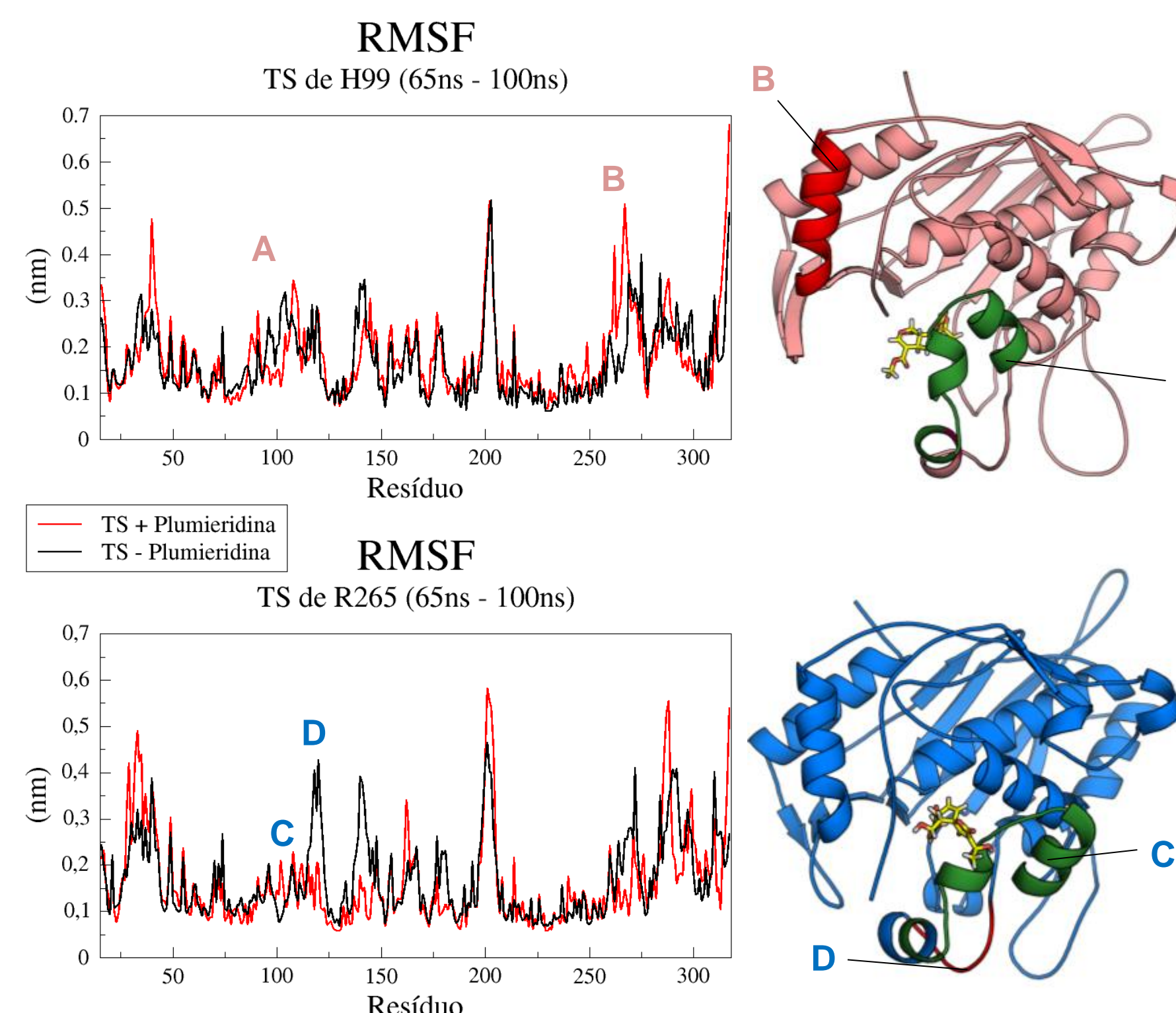


Figura 4. Flutuação do desvio médio quadrático (RMSF) dos aminoácidos das proteínas, medido a partir dos 65 ns de simulação. As regiões mais desviadas estão destacadas com letras, e coloridas em VERMELHO na representação da proteína ao lado. As áreas sinalizadas por A e C correspondem a uma região de ligação com o folato (RL1) [I100 e N104], o cofator da enzima, e está colorida em VERDE, junto com as duas hélices localizadas em suas extremidades.

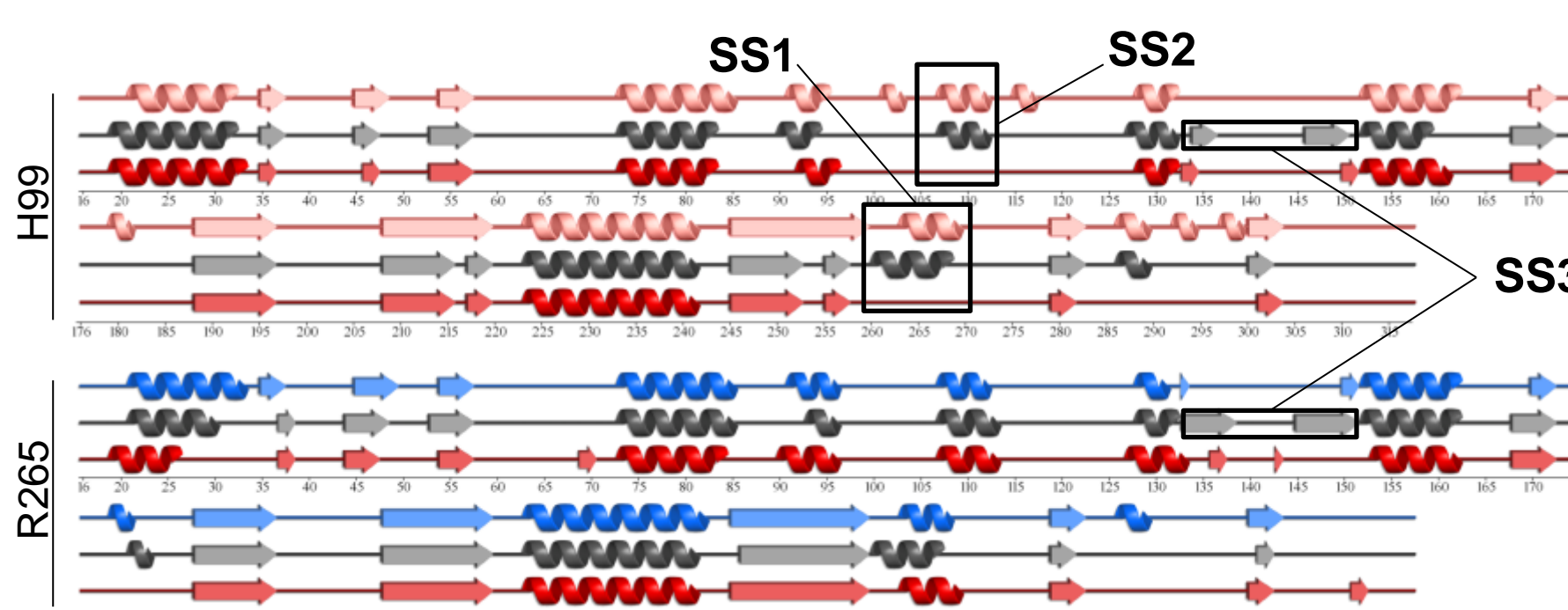


Figura 5. Alinhamento da estrutura secundária prevista pelo PDBsum (Laskowski et al., 1997). Em VERMELHO as proteínas das simulações sem a plumieridina, aos 100 ns de simulação, em ROSA e AZUL as proteínas utilizadas na docking de H99 e R265, respectivamente. SS1, SS2 e SS3 correspondem a regiões onde pudemos observar variações na estrutura secundária entre as proteínas que serão comentadas a seguir.

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 VERMELHO representa interações observadas na TS de H99, e o AZUL na TS de R265. Em H99, a plumieridina diminui o número de interações com a RL1 e com a região carboxiterminal, passando a interagir com uma região importante na ligação com o dUMP [Ser217 - Asn227] (RL2). Já em R265, ela deixa de interagir com a região de alça entre os aminoácidos Arg70 e Gly75 (RLF) e com a região carboxiterminal, ambas importantes na ligação do substrato.

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	Ser 105	Arg/Asn 106	Glu 120	Gly 121	
1																							
10																							
20																							
30																							
40																							
50																							
60																							
70																							
80																							
90																							
100																							

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																								
10																								
20																								
30																								
40																								
50																								
60																								
70																								
80																								
90																								
100																								

## DISCUSSÃO

Apenas as simulações das TSs sem plumieridina e os complexos TS-plumieridina onde o ligante se encontrava no sítio catalítico (Figura 2, docking [3]) foram simulados até o tempo total estipulado. Todas as demais foram interrompidas devido a não apresentarem mais interação ligante-receptor.

A estrutura secundária se manteve constante nas simulações de TS sem plumieridina (Figura 5 - SS3). Encontramos relatos dessa estrutura apenas na TS de procariontos realizando maiores investigações sobre este dado.

A proteína no complexo de H99 apresentou-se menos estável ao longo da simulação (Figura 3) devido a pouca estabilidade das regiões de alças. Observamos, inclusive, o desenvolvimento de uma grande hélice (Figura 5 - SS1), que resultou no aumento da flexibilidade da região (Figura 4 - B).

Durante as simulações, a plumieridina interagiu com regiões de extrema importância para a catálise promovida pela TS. As principais foram a RLF [Phe72 - Glu79], o RL1 [Ile100 - Asn104] e a cauda C-terminal [Asp312 - Ala317] que se ligam ao folato, cofator da enzima, e o RL2 [Leu184 - Cys187], RL3 [Gln215 - Asn227] e o RL4 [Asp255 - Tyr259] que se ligam ao dUMP, o substrato da enzima.

O modo de interação da plumieridina com esses aminoácidos variou no decorrer da simulação em ambos complexos. Em H99 ela interage inicialmente com RL1, RL2, RL3 e a região carboxiterminal. Ao longo da simulação, entretanto, as interações com RL1, RL2 e com a calda C-terminal se tornam mais escassas, enquanto aumentam as interações com a RL3. Como consequência, ocorreu um aumento na flexibilidade das regiões próximas a RL1 (Figura 4 - A), que culminou no desenvolvimento de uma hélice (Figura 5 - SS2).

Já em R265 a plumieridina se deslocou para região externa do sítio catalítico, deixando de interagir com a RLF e com a região carboxiterminal, intensificando, porém, as interações ao redor da RL1 (Tabela 1) (Figura 4 - A), o que causou uma estabilização das áreas próximas (Figura 4 - B).

## CONCLUSÃO

Apesar das divergências observadas entre as espécies, em ambos casos a plumieridina foi capaz de ocupar o espaço no sítio catalítico destinado ao substrato e ao cofator, interagindo, inclusive, com aminoácidos essenciais na atividade da enzima, além de ter provocado importantes mudanças estruturais na proteína. Por tanto, ao que tudo indica, a plumieridina pode, potencialmente, impedir a ligação do substrato e do cofator na enzima, bloqueando o sítio catalítico, e ocasionar mudanças conformacionais na TS, inviabilizando, enfim, o correto funcionamento da enzima.

## PERSPECTIVAS

Realizar a validação dos resultados apresentados através de experimentos práticos, como por exemplo pelo teste de inibição da TS em H99 e R265, junto ao inibidor da rota das pirimidinas, avaliação da expressão de TS nos fungos na presença da plumieridina, e, finalmente, o teste de inibição *in vitro* da TS com a plumieridina.

## REFERÊNCIAS

Arnold, Konstantin et al. "The SWISS-MODEL Workspace: A Web-Based Environment for Protein Structure Homology Modelling." *Bioinformatics* (Oxford, England) 22.2 (2006): 195-201.  
 Berendsen, H.J.C., D. van der Spoel, and R. van Drunen. "GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation." *Computer Physics Communications* 91.1-3 (1995): 43-56.  
 Bresciani, Fernanda Regina. "Caracterização Da Atividade Antifúngica de Extrato Aquoso de Sementes de *Allamanda Polyantha*." (2013).  
 Davis, Ian W et al. "MolProbity: All-Atom Contacts and Structure Validation for Proteins and Nucleic Acids." *Nucleic acids research* 35.Web Server issue (2007): W375-83.  
 Finer-Moore, Janet 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* 61.10 (2005): 1320-1334.  
 Fiser, Andrés, and Andrej Sali. "MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models." *Methods in Enzymology* 374 (2003): 461-491.  
 Grosdidier, Aurélien, Vincent Zoete, and Olivier Michielin. "SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock\_DSS." *Nucleic acids research* 39.Web Server issue (2011): W270-7.  
 Hanwell, Marcus D et al. "Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform." *Journal of cheminformatics* 4.1 (2012): 17.  
 Kwon-Chung, K. J. "A New Species of Filobasidiella, the Sexual State of *Cryptococcus Neoformans* B and C Serotypes." *Mycologia* 68.4 (1976): 942.  
 Kwon-Chung, K. J. "A New Genus, Filobasidiella, the Perfect State of *Cryptococcus Neoformans*." *Mycologia* 67.6 (1975): 1197.  
 Laskowski, Roman A. et al. "PDBsum: A Web-Based Database of Summaries and Analyses of All PDB Structures." *Trends in Biochemical Sciences* 22.12 (1997): 488-490.  
 Liu, Xiaofeng et al. "PharmMapper Server: A Web Server for Potential Drug Target Identification Using Pharmacophore Mapping Approach." *Nucleic acids research* 38.Web Server issue (2010): W609-14.  
 Maziarsz, Eileen K., and John R. Perfect. "Cryptococcosis." *Infectious Disease Clinics of North America* 30.1 (2016): 179-206.  
 Oostenbrink, Chris et al. "A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Set 53A5 and 53A6." *Journal of computational chemistry* 25.13 (2004): 1656-76.  
 Rajasingham, Radha et al. "Cryptococcal Meningitis Treatment Strategies in Resource-Limited Settings: A Cost-Effectiveness Analysis." *Ed. Jeremy Farrar. PLoS Medicine* 9.9 (2012): e1001316.  
 Schliemann, W., and G. Adam. "Enzymatic Hydrolysis of Plumieride to Plumieridine." *Phytochemistry* 21.6 (1982): 1438-1439.  
 Schmidt, Michael W et al. "General Atomic and Molecular Electronic Structure System." 14.11 (1993): 1347-1363.  
 Schneidman-Duhovny, Dina et al. "PatchDock and SymmDock: Servers for Rigid and Symmetric Docking." *Nucleic acids research* 33.Web Server issue (2005): W363-7.  
 Wang, Junmei et al. "Development and Testing of a General Amber Force-Field." 56531 (2004)