



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Expressão e caracterização enzimática da Tioredoxina redutase (Trr1) e do seu substrato Tioredoxina (Trx1) e identificação de novas drogas por modelagem molecular do alvo Trr1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*

Claudia Patrícia Bravo Chaucanés

Brasília, DF

2014

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Expressão e caracterização enzimática da Tioredoxina redutase (Trr1) e do seu substrato Tioredoxina (Trx1) e identificação de novas drogas por modelagem molecular do alvo Trr1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília e desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular da UnB como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientada: Claudia Patrícia Bravo Chaucanés
Orientadora: Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Fevereiro de 2014
Brasília, DF

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Claudia Patrícia Bravo Chaucanés

Expressão e caracterização enzimática da Tioredoxina redutase (Trr1) e do seu substrato Tioredoxina (Trx1) e identificação de novas drogas por modelagem molecular do alvo Trr1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*

Banca Examinadora

Orientadora: Prof. Dra. Maria Sueli Soares Felipe

Examinador externo: Prof. Dr. Andre Moraes Nicola

Examinador interno: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Suplente: Prof. Dra. Larissa Fernandes Matos

DEDICATÓRIA

A meus pais, pelo amor e apoio que sempre me deram, por me possibilitarem tudo na vida, pois sem eles eu não estaria aqui...

Mesmo estando longe estavam perto, sempre ao meu lado.

Ao Fernando, meu companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que está sempre ao meu lado, conduzindo meus caminhos e iluminando minha vida.

À Professora Doutora Maria Sueli Soares Felipe, minha grande orientadora. Agradeço, verdadeiramente, por tudo que você tem feito por mim! Obrigada pela confiança e a oportunidade do ingresso ao laboratório e na Pós- Graduação.

A minha família que de alguma forma sempre esteve presente. Aos meus pais (Jairo e Cecília) por toda a força, dedicação e pelo incentivo para que eu nunca desista dos meus sonhos, por mais difíceis que estes possam parecer.

Em especial ao meu namorado, minha família no Brasil, que me deu forças para continuar meus estudos, que sempre me encorajou a “querer mais” e a “fazer melhor” e que sempre esteve ao meu lado.

Aos meus colaboradores, Dra. Ana Karina Rodrigues Abadio, Profa. Dra. Erika Seki Kioshima, Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves e a Prof. Dra. Larissa Fernandes que tiveram papel fundamental no desenvolvimento do trabalho contribuindo com conhecimentos, sugestões e experimentos.

A todos os companheiros da BioMol, especialmente aos colegas do laboratório 4 pelas conversas e companhia durante tanto tempo no ‘lab’.

À Pós-Graduação em Biologia molecular pela oportunidade. Às agências de fomento pelo apoio financeiro que possibilitou a realização da pesquisa.

A todos que, de uma forma ou de outra, dentro ou fora da universidade, contribuíram para o meu crescimento não só profissional, mas também pessoal.

Que Deus abençoe a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Infecções fúngicas	1
1.2 Fungos e doenças humanas	1
1.3 Criptococose	3
1.4 <i>Cryptococcus neoformans</i>	4
1.5 Drogas antifúngicas existentes para tratar as micoses	7
1.6. Resistência de <i>C. neoformans</i> aos medicamentos	13
1.7 Busca de potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	15
1.8 Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas-alvo	17
1.9 Varredura virtual de compostos ativos	19
1.10 Trr1 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	22
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS	32
4.1 Reagentes	32
4.2 Meios de cultura	32
4.3 Antibióticos para seleção das células transformadas	33
4.4 Meios com glicose	33
4.5 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida	33
4.6 Soluções para coloração/descoloração de gel de poliacrilamida com <i>Coomassie Blue</i>	33
4.7 Soluções para o <i>western-blot</i>	34
4.8 Componentes dos ensaios de atividade enzimática da Tiorredoxina redutase	34
4.9 Levedura para o teste de suscetibilidade a antifúngicos	34
4.10 Meios de cultura, soluções e solvente usados no teste de suscetibilidade a antifúngicos	34
4.11 Drogas utilizadas no teste de suscetibilidade antifúngica	34
4.12 Componentes para cristalização das proteínas recombinantes	35

5. MÉTODOS	35
5.1 Síntese química dos genes <i>TRR1</i> e <i>TRX1</i> para expressão heteróloga	35
5.2 Expressão heteróloga dos genes selecionados	36
5.2.1 Vetor plasmídial - <i>pET21a</i>	36
5.2.2 Cepas de <i>E. coli</i>	37
5.2.3 Células bacterianas competentes por choque térmico	38
5.2.4 Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	39
5.2.5 Extração de DNA plasmidial e verificação da presença dos sítios de restrição e do inserto	39
5.2.6 Indução da expressão das proteínas <i>Trr1</i> e <i>Trx1</i> recombinantes	40
5.2.7 Meios contendo glicose	41
5.2.8 Análise da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%)	41
5.2.9 Coloração e visualização do gel	42
5.2.10 Western-blot	42
5.3 Purificação das proteínas <i>Trr1</i> e <i>Trx1</i> recombinantes por cromatografia de afinidade	43
5.4 Determinação da concentração das proteínas	44
5.5 Ensaio enzimático da atividade de <i>Trr1</i> recombinante	44
5.6 Cristalização das proteínas recombinantes	45
5.7 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos	45
5.7.1 Agentes antifúngicos	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1. Seleção do gene alvo <i>TRR1</i>	46
6.2. Expressão heteróloga dos genes <i>TRR1</i> e <i>TRX1</i> em linhagens de <i>E. coli</i> e purificação das proteínas recombinantes	47
6.2.1 Digestão para confirmar os sítios de restrição e o gene sintético clonado no vetor	47
6.2.2 Obtenção de células competentes, transformação em <i>E. coli</i> e expressão heteróloga	48
6.2.3 Purificação das proteínas recombinantes	55
6.3 Ensaio de atividade enzimática de <i>Trr1</i> recombinante	59
6.4 Obtenção de cristais da proteína recombinante <i>Trx1</i>	62
6.5 Ensaio de atividade antifúngica <i>in vitro</i>	64
7. CONCLUSÕES	65
8. PERSPECTIVAS	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
10. ANEXO	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infeccioso de <i>C. neoformans</i> (ambiente e hospedeiro).	3
Figura 2. O complexo de espécies de <i>C. neoformans</i> .	7
Figura 3. Agentes antifúngicos e seus alvos.	8
Figura 4. Antifúngicos e seus alvos.	11
Figura 5. Mecanismos de resistência de <i>C. neoformans</i> aos medicamentos.	14
Figura 6. Estratégia de varredura virtual para a descoberta de <i>hits</i> .	21
Figura 7. Cascata do sistema redox da Trx.	23
Figura 8. Estrutura global do monômero TrxR1 de <i>S. cerevisiae</i> .	26
Figura 9. Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína Trr1.	28
Figura 10. Alinhamento múltiplo realizado entre as sequências da proteína Trr1 de <i>C. neoformans</i> e as estruturas molde 3ITJ, 1CL0 e 1F6M depositadas no PDB.	29
Figura 11. Sequências de nucleotídeos dos genes <i>TRR1</i> (A) e <i>TRX1</i> (B) de <i>C. neoformans</i> otimizadas para expressão heteróloga em <i>E. coli</i> .	36
Figura 12. Esquema do vetor da série pET.	37
Figura 13. Esquema da indução da expressão gênica no vetor pET por IPTG.	38
Figura 14. Esquema geral de expressão e purificação das proteínas recombinantes.	41
Figura 15. Confirmação dos sítios de restrição e a presença do sistema de ligação (vetor pET21a::inserto).	48
Figura 16. Análise da expressão das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% ao longo do tempo de indução.	50
Figura 17. Análise da expressão da proteína Trr1 em clones de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformados.	51
Figura 18. Análise da expressão da proteína Trx1 em clones de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE transformados.	53
Figura 19. Representação esquemática da regulação da expressão proteica no sistema pET com a cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE.	54
Figura 20. Análise da proteína Trr1 recombinante purificada por cromatografia de afinidade, em coluna sepharose acoplada ao níquel da GE Healthcare.	56
Figura 21. Análise da proteína Trx1 recombinante purificada por cromatografia de afinidade, em coluna sepharose acoplada ao níquel da GE Healthcare.	57
Figura 22. Determinação de K_m e $V_{máx}$ de Trr1 utilizando o substrato Trx1.	60

Figura 23. Condições de crescimento dos cristais da proteína recombinante Trx1 do fungo patogénico *C. neoformans* (Sulfato de amônio 2M).

63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatística das dez mais relevantes infecções fúngicas invasivas.	2
Tabela 2. Drogas antifúngicas: mecanismo de ação e de resistência.	12
Tabela 3. Linhagens de <i>E. coli</i> para clonagem e expressão das proteínas recombinantes.	32
Tabela 4. Condições de expressão realizadas para obtenção das proteínas recombinantes Trr1 e Trx1.	49
Tabela 5. Parâmetro cinético (K_m) de diferentes redoxinas como substrato para a tioredoxina redutase.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Amp	Ampicilina
bp	Pares de bases
BSA	Albumina de soro bovino
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Cam	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Gás Carbônico
DH5 α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	Derivado nucleotídico da riboflavina
h	Hora
His Tag	Cauda de histidinas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HTS	<i>High-throughput screening</i> (varredura <i>High-throughput</i>)
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilo Dalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Meio Luria-Bertani
LORIA	<i>Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications</i>
M	Molar
MIC	Concentração inibitória mínima
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-N-Morpholino propanesulfônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-reduzido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
phRMA	<i>Pharmaceutical Research and Manufacturers of America</i>
p/v	Peso a volume
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação da polimerização em cadeia
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSd	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	RPMI-1640 sem bicarbonato, com L-glutamina
ScTrr1	Tioredoxina redutase 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
sec	Segundos
SNC	Sistema nervoso central
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> -tetrametilenodiamina
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Trr1	Tioredoxina redutase recombinante 1 de <i>C. neoformans</i>
<i>TRR1</i>	Gene tioredoxina redutase 1
Trx1	Tioredoxina recombinante 1 de <i>C. neoformans</i>
<i>TRX1</i>	Gene tioredoxina 1
U	Unidade enzimática
USA	Estados Unidos de América
UV	Ultravioleta
v/v	Volume a volume
V _{máx}	Velocidade máxima
VS	<i>Virtual screening</i> (varredura virtual)
VSM-G	Gerente de varredura virtual para redes - <i>grids</i> - computacionais
W	Watts
xg	Gravidade por minuto
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>
µm	Micrometro
µM	Micromolar

RESUMO

As infecções fúngicas invasivas configuram um problema grave de saúde pública, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Mais de 90% de todas as mortes relacionadas com fungos procedem de espécies que pertencem aos gêneros: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*. A Criptococose é causada pelo fungo encapsulado *Cryptococcus neoformans*, que causa doença pulmonar e pode-se espalhar amplamente no cérebro e pele; afeta cerca de um milhão de pessoas anualmente e mata cerca de 650.000. A virulência desse fungo é mediada por vários fatores, como a presença de uma cápsula polissacarídica anti-fagocítica e a indução de enzimas antioxidantes tais como peroxidases e catalases. Estes mecanismos antioxidantes de defesa se mostram importantes, não só para a resistência às espécies reativas, mas também para a sobrevivência em hospedeiros mamíferos. Estas enzimas antioxidantes, importantes para a virulência, podem servir como alvos excelentes para a terapia antifúngica. O gene *TRR1* é essencial em *C. neoformans* e, codifica para a enzima citoplasmática tioredoxina redutase. Esta proteína tem um papel importante na manutenção redox da célula e é parte do complexo chamado sistema tioredoxina, no qual participam a tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (Trr) e NADPH, protegendo as células contra o estresse oxidativo e nitrosativo. Algumas drogas estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas ou superficiais, contudo, existe apenas um número limitado de agentes antifúngicos eficazes (anfotericina B e o fluconazol para tratar a criptococose), muitos deles com efeitos secundários tóxicos e indesejáveis. Além disso, a resistência aos antifúngicos representa uma limitação nas atuais terapias utilizadas, demonstrando uma necessidade urgente de uma nova geração de agentes antifúngicos. No presente trabalho, a expressão heteróloga, purificação e caracterização enzimática de Trr1 e seu substrato Trx1 do fungo patogênico *C. neoformans* foram realizados. Os genes *TRR1* e *TRX1* de *C. neoformans* (H99) foram expressos em *Escherichia coli* via estratégia recombinante. Os fragmentos gênicos foram obtidos por meio da montagem de genes sintéticos inseridos no vetor pET21a para a produção como proteínas de fusão na forma solúvel. Os produtos expressos foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e detecção por *western-blot* e foi possível identificar uma banda de ~ 39 kDa e outra de ~ 12 kDa, correspondentes às proteínas recombinantes Trr1 e Trx1. A análise de atividade enzimática da proteína Trr1 recombinante foi realizada por ensaios de cinética enzimática. Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram determinados variando a concentração de Trx1 de 0.25 μ M até 15 μ M. Como resultado a velocidade de reação foi aumentando gradualmente à medida que a concentração

de substrato crescia, mostrando assim a capacidade da Trr1 em reduzir Trx1. Este trabalho possibilitou a produção das proteínas recombinantes com atividades biológicas esperadas, proporcionando quantidades necessárias para a realização de estudos estruturais tridimensionais (3D). Como resultado preliminar foi identificado o crescimento dos cristais para a proteína recombinante Trx1 de *C. neoformans*, em presença do agente precipitante sulfato de amônio 2 M pelo método de difusão de vapor em gota sentada. A partir do refinamento das condições será possível encontrar uma solução ideal para a difração dos cristais de cada proteína. Diante dos resultados obtidos pelo nosso grupo, na proposta maior do projeto principal: “Pós-genoma de fungos patogênicos humanos visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas”, este trabalho encontra-se inserido nesta linha de pesquisa para a obtenção de novas moléculas candidatas que inibam a atividade da proteína tioredoxina redutase, especificamente na viabilidade do fungo patogênico *C. neoformans*. Embora estas moléculas tenham sido selecionadas por varredura virtual de quimiotecas, uma metodologia *in silico*, os resultados *in vitro* feitos previamente em nosso grupo já apontaram o potencial destas moléculas como antifúngicos para o gênero *Paracoccidioides* spp. Em parceria com pesquisadores da França foi predita a estrutura da proteína Trr1 de *C. neoformans* por modelagem molecular por homologia. A partir da varredura virtual de quimiotecas foram selecionadas 4 moléculas inibitórias do banco *Life Chemicals* que interagem com os modelos de Trr1 obtidos para *C. neoformans* (Anexo). Os testes *in vitro* para validar tais inibidores potenciais estão sendo realizados em nosso laboratório, com intuito de desenvolver novas drogas para o tratamento de infecções fúngicas de relevância mundial, e gerar informações básicas da estrutura e função desta proteína.

Palavras claves: *Cryptococcus neoformans*; Tioredoxina redutase (Trr1); Tioredoxina (Trx1); Infecções fúngicas; Alvos moleculares; Drogas antifúngicas; Expressão heteróloga; Purificação de proteínas recombinantes; Modelagem molecular; Varredura virtual.

ABSTRACT

Invasive fungal infections constitute a major public health problem, especially in immunocompromised patients. Over 90% of all deaths related to fungi come from species belonging to the genera *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* and *Pneumocystis*. Cryptococcosis is caused by *Cryptococcus neoformans*, an encapsulated fungus that causes lung disease and can spread widely in the brain and skin, affects about one million people each year and kills about 650,000. The virulence of this fungus is mediated by several factors such as the presence of an anti-phagocytic polysaccharide capsule, and the induction of antioxidant enzymes such as peroxidases and catalases. These antioxidant defense mechanisms have been shown to be important not only for resistance to reactive species but also for survival in the mammalian host. These antioxidant enzymes important for virulence may serve as excellent targets for antifungal therapy. The *TRR1* gene is essential and encodes the cytoplasmic thioredoxin reductase enzyme. This protein has a role in maintaining the redox balance of the cell and forms part of a complex called thioredoxin system, which contains thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (Trr) and NADPH, protecting cells against oxidative and nitrosative stress. Some drugs to treat systemic and superficial fungal infections are available; however, there is only a limited number of effective antifungal agents (amphotericin B and fluconazole to treat cryptococcosis) many of them are toxic and present undesirable secondary effects. Furthermore, drug resistance is a limitation on current therapy used, demonstrating an urgent need for a new generation of antifungal agents. In this study, heterologous expression, purification and enzymatic characterization of Trr1 and its substrate Trx1 of the fungal pathogen *C. neoformans* were performed. The *TRX1* and *TRR1* genes of *C. neoformans* (H99) were expressed in *Escherichia coli* using recombinant strategy. The gene fragments were obtained by assembling synthetic genes and these were inserted into pET21a vector for production as fusion proteins in soluble form. The expressed products were purified by affinity chromatography on nickel column and detected by western blot. It was possible to identify a band of ~39 kDa and another of ~12 kDa corresponding recombinant proteins Trr1 and Trx1. The enzymatic activity of the recombinant protein Trr1 was confirmed by assays of enzyme kinetics. The kinetic parameters K_m and V_{max} were determined by varying the Trx1 concentration of 0.25 μ M to 15 μ M. As a result the reaction rate was gradually increased as the substrate concentration, showing the ability of Trr1 to reduce Trx1. In conclusion, this work shows a viable system for the production of recombinant proteins providing amount necessary to perform three-dimensional structural studies (3D). As a preliminary result crystal

growth for recombinant protein, Trx1 of *C. neoformans* was identified in the presence of sulfate 2M as the precipitant agent. From the refinement of the conditions will be possible to find an ideal solution for diffraction of crystals of each protein. Considering the results obtained by our group, most of the main project proposal: "Post-genome of human pathogenic fungi aiming the development of new antifungal drugs," this work is inserted in this line of research for obtaining new candidate molecules that inhibit the activity of thioredoxin reductase protein, specifically on the viability of the pathogenic fungus *C. neoformans*. Although these molecules have been selected for virtual screening library, a methodology *in silico*, *in vitro* results previously made in our group have pointed out the potential of these molecules as antifungal in the *Paracoccidioides* genus. In collaboration with researchers from France, the structure of the protein Trr1 of *C. neoformans* was predicted by molecular homology modeling. From the virtual screening library, four inhibitory molecules that interact with the Trr1 models obtained for *C. neoformans* were selected from *Life Chemicals* database (Appendix). Currently *in vitro* tests to validate these potential inhibitors are being carried out in our laboratory, aiming at developing new drugs for the treatment of fungal infections of global significance, and generating basic information on the structure and function of this protein.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; Thioredoxin reductase (Trr1); Thioredoxin (Trx1); Fungal infections; Molecular targets; Antifungal drugs; Heterologous expression.; Recombinant protein purification; Molecular homology modeling; Virtual screening.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o número total de espécies de fungos exceda a 1,5 milhões, uma minoria de aproximadamente 150 espécies de fungos estão associados com uma ampla gama de doenças que incluem alergias, infecções superficiais e micoses invasivas (Hawksworth, 2001). Com as novas tecnologias de sequenciamento genômico, mais de 50 genomas de fungos já foram sequenciados completamente ou estão em processo de sequenciamento, incluindo agentes patogênicos em humanos e plantas, bem como fungos, que servem como modelos básicos de biologia molecular e celular (dados atuais 02/02/2014 coletados nos bancos de dados *Fungal genome initiative*, *Broad Institute* NCBI) fornecendo uma visão sobre os mecanismos de patogenicidade destes fungos.

1.1 Infecções fúngicas

Recentemente, vários dados têm mostrado a crescente importância das infecções fúngicas invasivas (IFIs) como uma causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos e de alto risco (Erjavec *et al.*, 2009). O crescente número de IFIs influencia significativamente os custos relacionados à saúde, incluindo a prevenção, o diagnóstico e o tratamento (Pfaller, M. e Diekema, 2007). A maioria das pessoas em suas vidas sofrerão de infecções fúngicas superficiais que são geralmente fáceis de curar, mas milhões de pessoas em todo o mundo irão contrair infecções invasivas que ameaçam a vida e que são muito mais difíceis para diagnosticar e tratar (Brown *et al.*, 2012).

Candida spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus neoformans* estão entre os mais comuns agentes etiológicos de infecções fúngicas, mas as infecções causadas pelas outras leveduras e fungos estão em ascensão. Infelizmente, as taxas de mortalidade associadas a essas micoses permanecem elevadas, frequentemente ocorre em mais de 50% dos pacientes (Pfaller, M. e Diekema, 2007), indicando a deficiência e limitação no manejo clínico das infecções fúngicas. Estes patógenos humanos oportunistas são de alta relevância mundial (Pemán e Salavert, 2012).

1.2 Fungos e doenças humanas

Infecções superficiais (pele e unhas) são as doenças fúngicas mais comuns em humanos e afetam ~25% do total da população mundial (ou ~1,7 bilhão) (Havlickova *et al.*, 2008). Essas infecções superficiais são mais frequentemente causadas por várias espécies de *Candida*, que constituem o segundo agente de infecção fúngica mais numeroso em todo o mundo. As IFIs

têm uma incidência muito menor que as infecções superficiais, mas as doenças invasivas são de maior preocupação porque estão associadas com elevadas taxas de mortalidade. Muitas espécies de fungos são responsáveis por essas infecções invasivas, que matam cerca de um milhão e meio de pessoas todos os anos no mundo. Mais de 90% de todas as mortes relacionadas com fungos procedem de espécies que pertencem aos gêneros: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* (Brown *et al.*, 2012) (**Tabela 1**). A incidência atual de doenças invasivas é em grande parte resultado de um sistema imunológico pouco eficaz por infecções imunossupressoras como HIV/AIDS e pelas intervenções médicas imunossupressoras modernas.

Tabela 1. Estatística das dez mais relevantes infecções fúngicas invasivas.

Doença (Espécie mais comum)	Localização	Incidência anual	Taxa de letalidade (% populações infectadas)
Micoses invasivas oportunistas			
Aspergilose (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Ao redor do mundo	>200,000	30–95
Candidíase (<i>Candida albicans</i>)	Ao redor do mundo	>400,000	46–75
Criptococose (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	Ao redor do mundo	>1,000,000	20–70
Mucormicose (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Ao redor do mundo	>10,000	30–90
Pneumocistose (<i>Pneumocystis jirovecii</i>)	Ao redor do mundo	>400,000	20–80
Micoses Endêmicas dimórficas*			
Blastomicose (<i>Blastomyces</i>)	Centro-Oeste e Estados Unidos (Atlântico)	~3,000	<2–68
Coccidioidomicose (<i>Coccidioides immitis</i>)	Sudoeste dos Estados Unidos	~25,000	<1–70
Histoplasmose (<i>Histoplasma capsulatum</i>)	Oeste dos Estados Unidos	~25,000	28–50
Paracoccidioidomicose (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	Brasil	~4,000	5–27
Peniciliose (<i>Penicillium marneffei</i>)	Sudeste Asiático	>8,000	2–75

*Micoses Endêmicas dimórficas podem ocorrer em vários lugares no mundo. No entanto, os dados para a maioria desses lugares são limitados. Para essas micoses, os autores estimaram as infecções por ano e a mortalidade num local específico, onde a maioria dos dados está disponível. Fonte: adaptado de Brown *et al.*, (2012).

1.3 Criptococose

Criptococose é causada pelo fungo encapsulado *Cryptococcus neoformans* é letal para pacientes co-infectados pelo HIV. A criptococose é causada pela inalação de partículas infecciosas (esporos ou células secas) que iniciam uma infecção pulmonar (Giles *et al.*, 2009). Como se visualiza na **Figura 1** uma vez inalado pelo organismo, os propágulos podem crescer nos alvéolos dos pulmões e causar doenças respiratórias. A infecção pode ser assintomática, crônica ou aguda, sendo que infecções pulmonares são a maioria das vezes assintomáticas. Dependendo do estado imunológico do paciente, a criptococose, é mais frequentemente reconhecida após a disseminação para o sistema nervoso central onde pode causar meningoencefalite (Voelz e May, 2010).

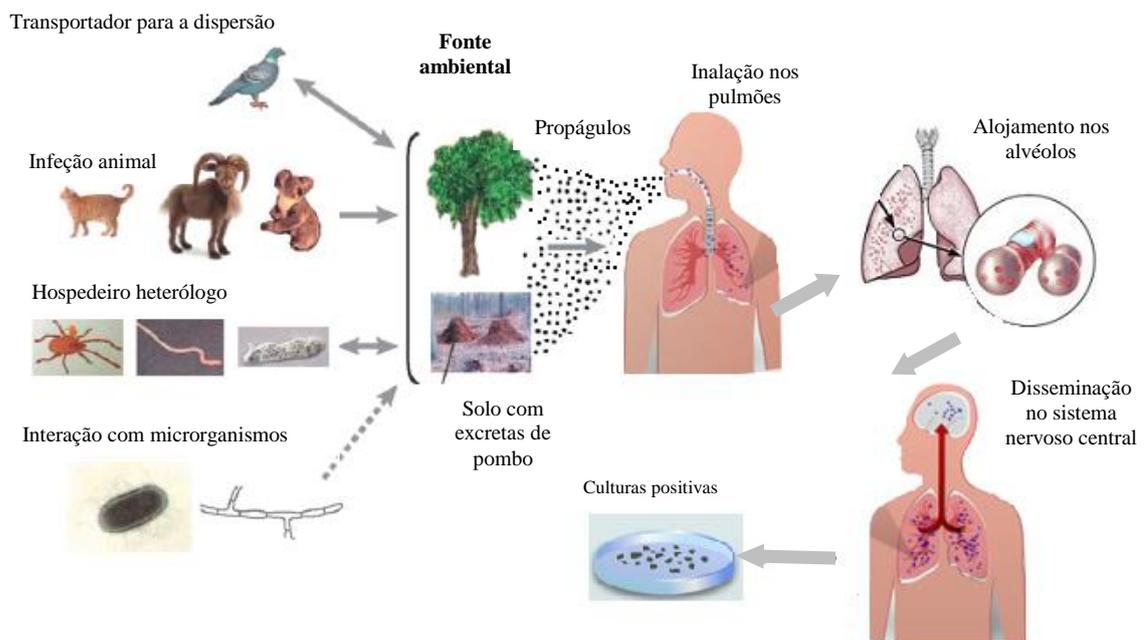


Figura 1. Ciclo infeccioso de *C. neoformans* (ambiente e hospedeiro). *C. neoformans* reside no ambiente e tem sido encontrado principalmente associado a excrementos de pombos e eucaliptos. A infecção de seres humanos geralmente ocorre quando os basidiósporos produzidos por *C. neoformans* na natureza são inalados para dentro dos pulmões. Esporos inalados são depositados dentro dos alvéolos e germinam para estabelecer uma infecção latente ou difundir para o sistema nervoso central (SNC). Uma vez que a disseminação ocorre, as células viáveis podem ser cultivadas a partir do líquido cefalorraquidiano de indivíduos afetados. Fonte: adaptado de Lin e Heitman, (2006), com modificações.

Esta forma clínica é a mais comum na América Latina, com 85% dos casos causados por *C. neoformans* (Olivares *et al.*, 2009). Segundo Idnurm e cols. (2005), nos últimos anos, o uso de

terapias antifúngicas e anti-retrovirais provocou uma redução na prevalência de criptococose, porém, a doença não deixou de ser uma preocupação (Idnurm *et al.*, 2005). Apesar do tratamento medicamentoso o impacto da doença ainda é significativo, especialmente em populações com acesso limitado a cuidados em saúde, tendo um número estimado de aproximadamente um milhão de casos por ano que resultam em quase 650 mil mortes no mesmo período (Park *et al.*, 2009). Com base em uma estimativa de 3.400 hospitalizações por meningite criptocócica nos Estados Unidos, aproximadamente 54 milhões de dólares foram investidos para tratar esta doença em 2009 (Pyrgos *et al.*, 2013). O tratamento padrão inclui o tratamento com anfotericina B e flucitosina, mas a doença continua ocasionando até 60% de mortes nos países em desenvolvimento (Jarvis e Harrison, 2007). Além disso, as cepas resistentes ao fluconazol se tornaram comuns nessas regiões desde o início da epidemia de AIDS (Bii *et al.*, 2007), embora essa taxa tenha diminuído em regiões desenvolvidas, onde a terapia anti-retroviral é mais amplamente disponível (Pfaller, M. A. *et al.*, 2011). Tais padrões de resistência e os resultados deficientes ao fluconazol ressaltam a necessidade de encontrar novos candidatos a drogas que sejam eficazes para os indivíduos, especialmente em ambientes com poucos recursos.

1.4 *Cryptococcus neoformans*

No ambiente, *C. neoformans* apresenta-se no geral como um basidiomiceto que libera basidiósporos, que se convertem para levedura (2-10 µm de diâmetro) à temperatura de 37 °C no hospedeiro (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Esse fungo é uma das principais causas de micoses fatais em pacientes com AIDS e uma das principais causas de meningoencefalite e mortalidade relacionada com o SNC ao redor do mundo (Jarvis e Harrison, 2007). Além disso, é um patógeno oportunista em terapias de transplante de órgãos e pacientes com malignidades hematológicas (Pappas *et al.*, 2001). A principal característica que distingue o *C. neoformans* de outros fungos patogênicos é a presença de uma cápsula polissacarídica rica em resíduos de mananas, em torno da parede celular, que é importante para a virulência deste fungo (Doering, 2009). A cápsula é composta de polissacarídeos, fazendo que seja altamente hidrofílica com um elevado conteúdo de água de 99% do peso total da cápsula (Maxson *et al.*, 2007). A cápsula polissacarídica confere uma forte carga negativa em virtude dos resíduos de ácido glicurônico o seu componente principal (Nosanchuk e Casadevall, 1997). Os polissacarídeos que constituem a cápsula são encontrados em dois locais diferentes. A primeira localização está ligada à parede da célula, formando a estrutura física definida como

cápsula. Estes polissacarídeos também são liberados constitutivamente pela célula para o meio circundante e ambiental, e podem ser isolados como exopolissacarídeos após certos protocolos de purificação. O material exopolissacarídeo contém dois tipos principais de polissacarídeos: glicuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), contendo aproximadamente de 90-95% de GXM e ao redor de 5-8% de GalXM. Além disso, uma pequena proporção de manoproteínas (MP) foram identificadas (<1%), mas este componente não foi estudado em detalhe e o seu papel na arquitetura da cápsula é desconhecido (Zaragoza *et al.*, 2009). A GXM consiste de ácido glicurônico, xilose e manose; a GalXM é composta de galactose, xilose e manose; e a MP contém manose como carboidrato predominante, e em menor quantidade, galactose e xilose (McFadden e Casadevall, 2001). A cápsula parece exercer papel importante na levedura contra a dessecação e ingestão por amebas do solo. A observação de que cepas capsuladas foram capazes de sobreviver à fagocitose e de se replicar em *Acanthamoeba castellanii*, ao contrário de sua mutante, levaram os autores a sugerirem que a virulência de *C. neoformans* foi resultado de adaptações contra predadores do meio ambiente, presentes no solo e em vegetações (Casadevall *et al.*, 2003). O polissacarídeo capsular também pode desenvolver uma importante função na patogênese intracelular de *C. neoformans*, uma vez que leveduras internalizadas por macrófagos produzem e liberam vesículas contendo GXM (Rodrigues *et al.*, 2007). Além deste fato, leveduras acapsuladas não replicam intracelularmente e não apresentam citotoxicidade para células fagocíticas, contrastando com as células encapsuladas que replicam e promovem a morte de macrófagos (Feldmesser *et al.*, 2000). Posteriormente, estudos demonstraram que a cápsula está relacionada à atividade antifagocítica e imunomodulatória, sendo importante para a replicação do fungo em macrófagos, podendo afetar a apresentação de antígenos, a produção de citocinas, e ainda inibir a migração de leucócitos nos sítios infectados. Foi, ainda, observado que seu aparecimento e tamanho estão condicionados a fatores ambientais, como a presença de vitaminas, aminoácidos, CO₂, concentração de ferro, presença de íons, bem como fatores que afetam a pressão osmótica (Janbon e Doering, 2011).

Outra notável adaptação é o aumento do tamanho da cápsula após a inoculação do fungo no mamífero hospedeiro (Blackstock *et al.*, 1999). Além disso, a capacidade para sobreviver e proliferar em um ambiente tão complexo requer muitas defesas. Devido aos efeitos deletérios que as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ter sobre os componentes celulares, não é surpreendente que as células de levedura possuem mecanismos enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, e tioredoxina peroxidase) e não enzimáticos (glutathione e tioredoxina)

para neutralizar os efeitos das ROS. Estes mecanismos antioxidantes de defesa têm se mostrado importantes, não só para a resistência às espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro, mas também para a sobrevivência em hospedeiros mamíferos (Missall, T.A. *et al.*, 2004). Outros fatores que contribuem para a patogênese incluem a produção do pigmento melanina antioxidante na parede da célula, a exportação de enzimas, como a fosfolipase B, urease e superóxido dismutase (Kronstad *et al.*, 2011) e capacidade de crescer a 37°C (Perfect, 2006).

C. neoformans pode ser dividido em quatro sorotipos, A, B, C e D, com um quinto sorotipo AD ocasionalmente observado; com base na sua morfologia, bioquímica e genética, foi classificado da seguinte forma: *C. neoformans* variedade *grubii*, o sorotipo A (genótipos VNI, VNII e VNB), *C. neoformans* variedade *neoformans*, sorotipo D (genótipo VNIV) e *C. gattii*, os sorotipos B (genótipos VGI, VGII, VGIV) e C (genótipos VGIII, VGIV) e o sorotipo híbrido AD (genótipo VNIII) (Hagen *et al.*, 2010; Kwon-Chung e Varma, 2006). Várias interespecies híbridas têm sido descritas e recentemente verificou-se um híbrido entre *C. neoformans* var. *grubii* e *Cryptococcus gattii*. Quatro isolados clínicos do líquido cefalorraquidiano mostraram padrões de combinação destes sorotipos, no Brasil (n = 2), Colômbia (n = 1) e Índia (n = 1). A determinação de padrões alélicos tipo-acasalamento por PCR revelou que os isolados foram $\alpha A \ aB$ (Aminnejad *et al.*, 2012).

Os sorotipos A e D são distribuídos mundialmente e causam a maioria das infecções criptocócicas, predominantemente em indivíduos imunocomprometidos (**Figura 2**). Em contraste, *C. gattii* sorotipos B e C isolados são endêmicos em regiões tropicais e subtropicais (por exemplo, Austrália, Papua Nova Guiné e América do Sul) e causam infecções criptocócicas principalmente em hospedeiros imunocompetentes, com uma frequência muito menor (Casadevall e Perfect, 1998). Foi ainda observado que o sorotipo B causou infecções na ilha de Vancouver, demonstrando o seu habitat em regiões temperadas (Stephen *et al.*, 2002). O sorotipo A é o sorotipo predominante entre as amostras clínicas e é responsável por mais de 95% de casos de criptococose em todo o mundo (Jain *et al.*, 2005). A distribuição entre os sorotipos isolados ambientais varia consideravelmente. *C. gattii* (sorotipos B e C) é mais frequentemente isolado de árvores e *C. neoformans* (ambos os sorotipos A, D e híbridos AD) é mais frequentemente isolado de excrementos de aves (Granados e Castañeda, 2006).

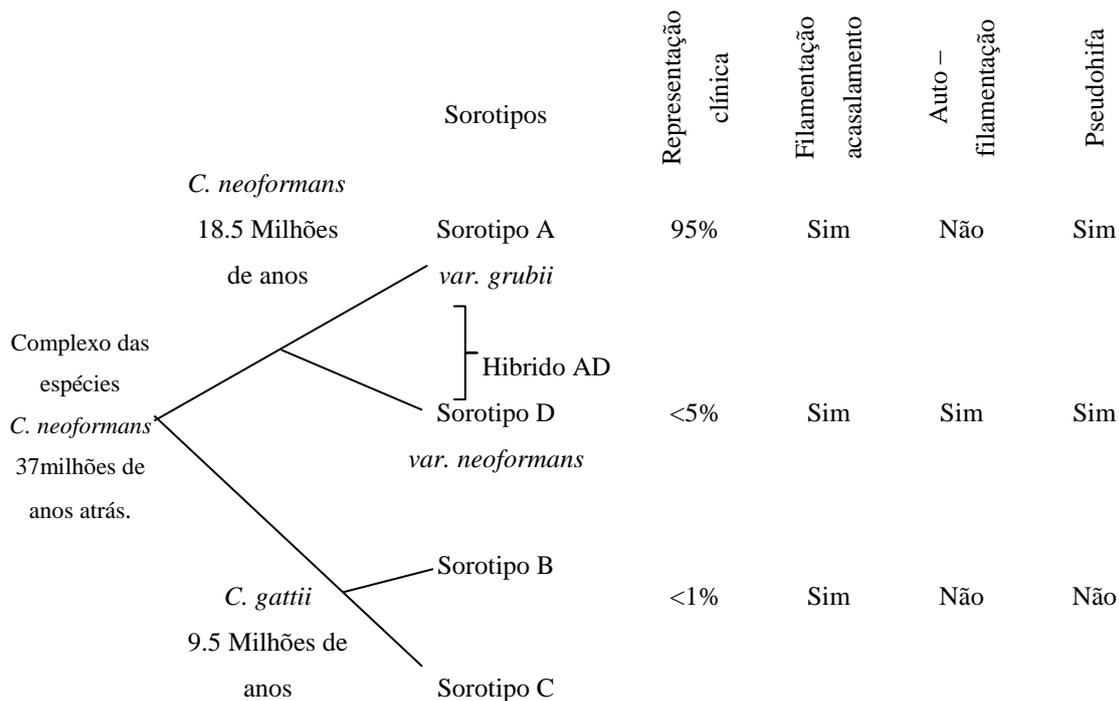


Figura 2. O complexo de espécies de *C. neoformans*. O complexo contém, pelo menos, duas subespécies: *C. neoformans* e *C. gattii*, que divergiram de um ancestral comum ~37 milhões de anos atrás. Os sorotipos A e D divergiram umas das outras ~18.5 milhões de anos atrás, enquanto os sorotipos B e C divergiram umas das outras ~9.5 milhões de anos. Eles são ainda divididos em cinco sorotipos, incluindo o sorotipo híbrido AD. O sorotipo A é predominante entre as amostras clínicas isoladas. Todos os sorotipos demonstraram filamentação durante o tradicional acasalamento a- α , mas apenas alguns isolados do sorotipo D observados sofreram auto-filamentação. As formas pseudohifa foram observadas em ambos os sorotipos A e D de *C. neoformans*. Fonte: adaptado de Lin, (2009).

1.5 Drogas antifúngicas existentes para tratar as micoses

Pacientes com imunodeficiência têm contribuído para a incidência e severidade das micoses, tendo em vista que são mais susceptíveis, apresentam formas mais agressivas das micoses clássicas, e também tendem a apresentar variedades de patógenos resistentes, sendo mais susceptíveis às infecções por fungos oportunistas (Sable *et al.*, 2008). A era de terapia utilizando antifúngicos sistêmicos iniciou-se nos anos 1950 quando o uso de anfotericina B deoxicolato se tornou acessível e resultou em muitos tratamentos bem sucedidos. No entanto, a droga demonstrou desvantagens como a dificuldade de administração e seus efeitos tóxicos. Posteriormente, surgiram novas drogas como a 5-flucitosina em 1973, fluconazol e itraconazol na década de 1990 e os triazóis nos anos 2000 (Heitman *et al.*, 2011).

Algumas drogas estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas ou superficiais, mas existe apenas um número limitado de drogas antifúngicas eficazes. Quatro classes de agentes antifúngicos, azóis, polienos, equinocandinas e fluoropiridinas, constituem o esteio da terapia antifúngica para pacientes críticos pelas micoses invasivas (Sable *et al.*, 2008). Como pode ser observado na **Figura 3** a grande maioria dos antifúngicos usa o alvo ergosterol na membrana da célula fúngica, a biossíntese do ergosterol, ou a biossíntese de (1,3) β -D-glucana, um importante componente da parede celular fúngica. Embora esses agentes antifúngicos demonstrem eficácia, melhorando a saúde do paciente na medicina humana, eles também têm deficiências devido aos efeitos colaterais tóxicos indesejáveis.

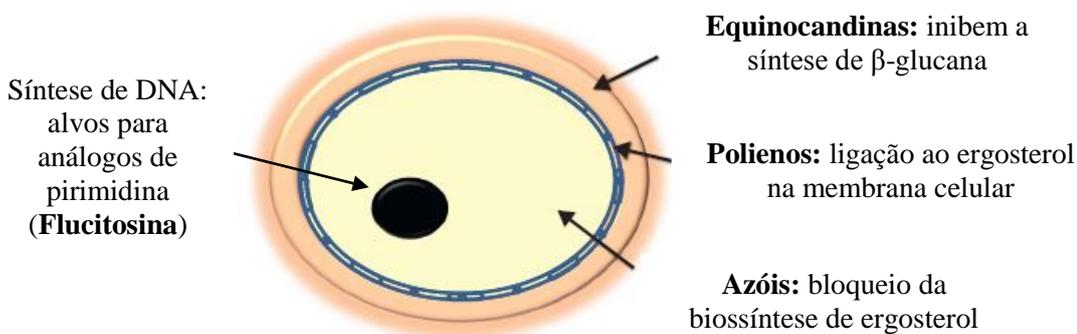


Figura 3. Agentes antifúngicos e seus alvos. Um diagrama esquemático que ilustra os mecanismos de ação, em nível celular, das mais importantes classes de agentes antifúngicos utilizados clinicamente. Polienos ligam-se ao ergosterol na membrana da célula fúngica; azóis bloqueiam a biossíntese de ergosterol; e equinocandinas inibem a síntese de β -glucana afetando a parede celular do fungo. Fonte: adaptado de Pierce *et al.*, (2013) e Brown *et al.*, (2012).

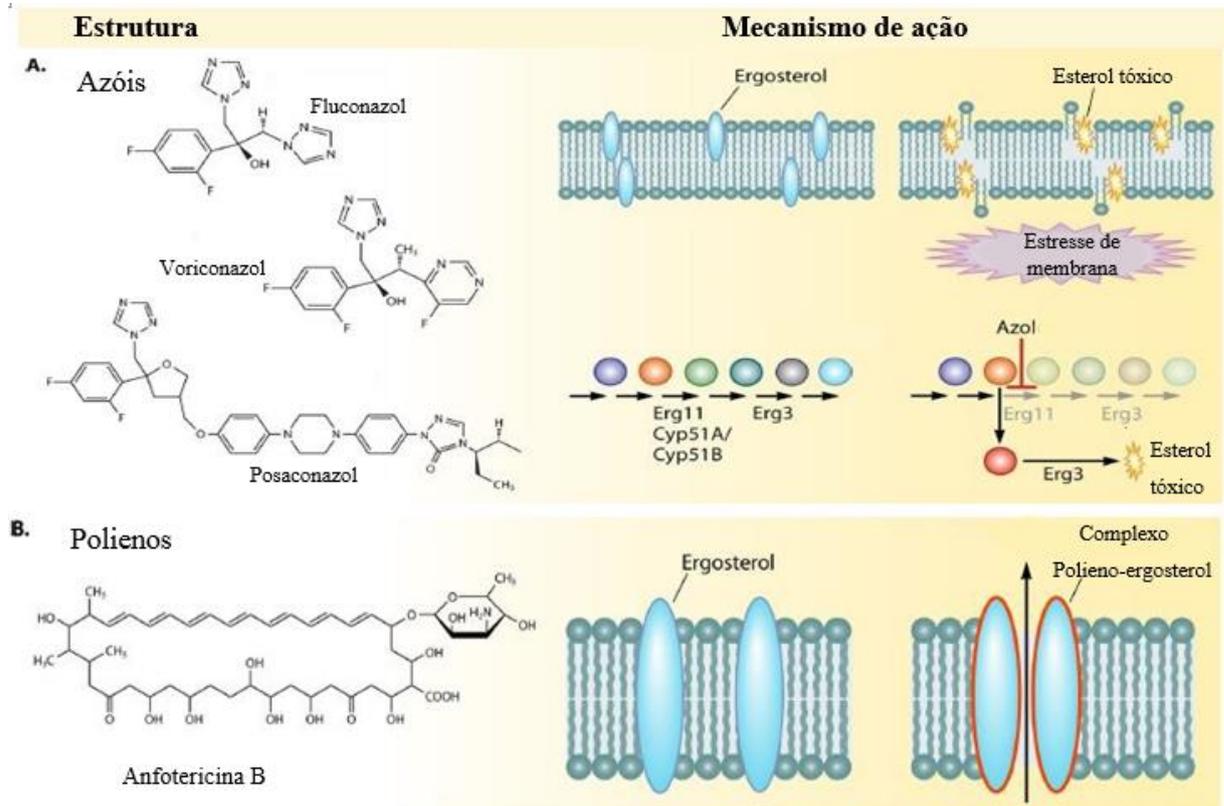
Os **azóis**, incluindo os imidazóis e triazóis, são uma classe de compostos heterocíclicos de cinco membros contendo nitrogênio, que têm sido o grupo mais amplamente utilizado de antifúngicos por aproximadamente duas décadas (Cowen e Steinbach, 2008). Atualmente, existem cinco drogas triazóis disponíveis para uso clínico, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e cetoconazol, cada um com suas propriedades farmacocinéticas. Os azóis agem inibindo a enzima biossintética 14- α lanosterol demetilase (também referida como citocromo P450), codificada pelo gene *ERG11*, da via de biossíntese do ergosterol em *C.*

albicans e *C. neoformans* (Kanafani e Perfect, 2008). Como pode ser visualizado na **Figura 4A** os azóis atuam por meio da ligação de um átomo de nitrogênio livre no anel do azol a um átomo de ferro do grupo heme localizado no sítio ativo da *ERG11*, bloqueando a demetilação do lanosterol e, acumulando o 14- α -metil-3,6-diol, um esterol tóxico produzido pela Δ -5,6-dessaturase codificada por *ERG3* (Lupetti *et al.*, 2002). Este esterol tóxico exerce um grave estresse sobre a membrana celular. Os imidazóis são mais utilizados em infecções superficiais e os triazóis em infecções sistêmicas (Kanafani e Perfect, 2008). Existem diversos azóis disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas que são utilizados de acordo com o tipo de infecção e o patógeno, alguns exemplos são cetoconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol (Kathiravan *et al.*, 2012). O fluconazol é muito utilizado em vários tipos de candidíase e criptococose, sendo efetivo, nesse último caso, para infecção pulmonar ou disseminada e ainda na meningite criptocócica aguda. O itraconazol tem um amplo espectro de atividade, mas seu uso é limitado por ter muitas interações medicamentosas com várias classes de drogas, devido à sua interferência com o citocromo P450 no fígado e no intestino. Estas interações diminuem a absorção e aumentam o metabolismo dos azóis, reduzindo assim as concentrações no sangue e nos tecidos e aumentando as taxas de recaída (Chapman *et al.*, 2008).

Os **Polienos** fungicidas são fármacos anfipáticos, com cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas, que se ligam fortemente ao ergosterol para criar complexos de droga-lipídeo, que intercalam-se na membrana da célula fúngica para formar um canal de membrana (**Figura 4B**), desestabilizando a célula em decorrência da alteração no transporte de íons de potássio pela membrana (Shapiro *et al.*, 2011) e destruindo assim o gradiente de prótons (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). O polieno anfotericina B, tem sido utilizado no tratamento das infecções fúngicas desde 1957 (Chapman *et al.*, 2008), sendo eficaz contra doenças fúngicas sistêmicas, mostrando atividade contra várias espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. Embora os polienos sejam utilizados na prática clínica há mais de 50 anos, a grande limitação da sua utilização é a toxicidade no hospedeiro, tal como a disfunção renal, que é provavelmente devida às semelhanças estruturais entre o ergosterol e o colesterol na membrana da célula de mamífero (Fanos e Cataldi, 2000).

As **equinocandinas** são uma nova classe de antifúngicos aprovados nas últimas décadas. Atualmente, existem três drogas pertencentes a esta classe que estão disponíveis para uso clínico: caspofungina, micafungina e anidulafungina (Shapiro *et al.*, 2011). As equinocandinas são moléculas lipopeptídicas grandes que atuam como inibidores não

competitivos da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase (codificada pelo *FKS1* em *C. albicans*, *C. neoformans*, e *A. fumigatus* e pelo *FKS1* e *FKS2* em *C. glabrata* e *S. cerevisiae*). A interrupção na síntese deste polissacarídeo resulta na perda da integridade da parede celular e estresse na parede celular fúngica (**Figura 4C**). A atividade antifúngica contra *Candida* e *Aspergillus* foi relatada, mas as equinocandinas não mostraram atividade antifúngica contra *C. neoformans*. Efeitos adversos como, febre, náuseas, cefaleia e aumento das enzimas hepáticas, foram observados com as equinocandinas, embora o seu alvo seja exclusivo em células fúngicas e esteja ausente em células de mamíferos (Lai *et al.*, 2008).



c. Equinocandinas

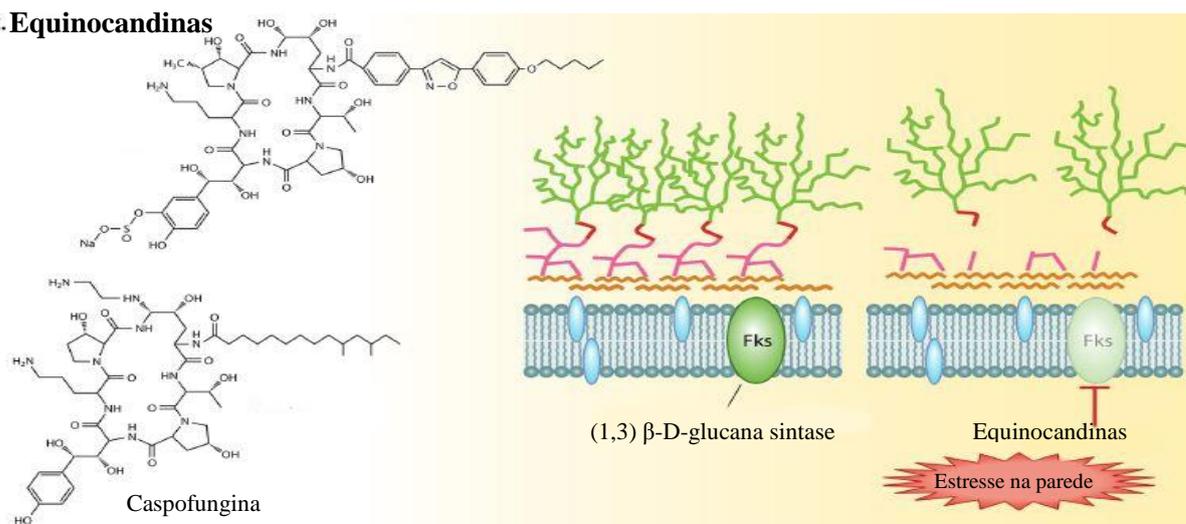


Figura 4. Antifúngicos e seus alvos. (A) Os azóis causam um bloqueio na produção de ergosterol e o acúmulo de um esteroide tóxico produzido por Erg3. (B) Os polienos fungicidas funcionam pela ligação ao ergosterol para criar complexos de droga-lipídeo. (C) A parede celular de fungos é, em geral, composta de (1,3)-β-D-glucana que se liga covalentemente a (1,6)-β-D-glucana, assim como quitina, mananas e proteínas da parede celular. As equinocandinas atuam como inibidores não-competitivos da (1,3)-β-D-glucana sintase. Fonte: adaptado de Shapiro *et al.*, (2011).

Existem ainda drogas que atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, como as **fluoropiridinas** (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009); drogas que são inibidoras da síntese de proteínas, como as sordarinas e, também, inibidores da síntese de microtúbulos, como as griseofulvinas (Kathiravan *et al.*, 2012). Por fim, inibidores da calcineurina, como tacrolimus e ciclosporina, demonstraram afetar o crescimento celular e seu uso resultou na redução da infecção no SNC de pacientes com criptococose, podendo ser utilizados como adjuvantes da terapia (Heitman *et al.*, 2011). Atualmente, existem muitos outros antifúngicos que apresentam mais vantagens em seu uso, como os novos triazóis: voriconazol, posaconazol e isavuconazol, porém ainda não se tem muitas informações de seu uso na prática clínica. A **Tabela 2** apresenta uma visão geral dos agentes antifúngicos, seu mecanismo de ação e de resistência, bem como os efeitos adversos.

Tabela 2. Drogas antifúngicas: mecanismo de ação e de resistência.

Classe	Espectro	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência observado em isolados clínicos	Efeito adverso
Azóis				
Fluconazol	Ativa contra <i>Candida spp</i> e <i>Cryptococcus spp</i> , menos ativa contra <i>C. glabrata</i> e nenhuma atividade contra <i>C. krusei</i> , nenhuma atividade contra fungos filamentosos.	Inibição da enzima biossintética 14- α lanosterol demetilase	Maior efluxo por suprarregulação de genes transportadores multidroga.	Náuseas, vômitos, dor abdominal, erupção cutânea, dor de cabeça, calvície e anorexia.
Itraconazol	Como fluconazol, mas, com reforçada atividade contra fungos filamentosos.	codificada pelo <i>ERG11</i> em <i>C. albicans</i> e	Alterações do alvo por ocorrência de mutações.	Distúrbios visuais transitórios até 30% nos ensaios, aumento das enzimas hepáticas, hepatotoxicidade severa e alucinações.
Voriconazol	Como fluconazol, mas, com reforçada atividade contra fungos filamentosos, incluindo <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium spp</i> .	<i>C. neoformans</i> ou <i>CYP51A</i> e <i>CYP51B</i> em <i>A. fumigatus</i> .	Alteração de etapas específicas da via biossintética do ergosterol.	Febre, dor de cabeça, boca seca, fadiga.
Posaconazol	Intimamente relacionado com itraconazol, mas mais ativo.			
Cetoconazol	Micoses superficiais, incluindo dermatofitoses			
Polienos				
Anfotericina B	Atividade ampla contra <i>Candida spp</i> (exceto <i>C. lusitaniae</i>) <i>C. neoformans</i> e fungos filamentosos (exceto, o <i>Aspergillus spp</i> , <i>A. terreus</i> e <i>A. flavus</i>).	Ligação ao ergosterol provocando a desestabilização das funções da membrana celular.	Alteração em passos específicos da biossíntese do ergosterol que poderia afetar a ligação da droga a esses esteróis.	Efeitos adversos relacionados à infusão (70% - 90%) náuseas, vômitos, febre, calafrios, distúrbios gastrointestinais, broncoespasmo, hipertensão, e arritmia cardíaca, toxicidade renal e hepática.
Equinocandinas				
Casposfungina	Ativa contra <i>Candida spp</i> com atividade fungicida, moderadamente	Inibição de síntese da enzima de parede celular β -1,3-Glucana sintase.	Desconhecido.	Flebite, elevação das enzimas hepáticas, cefaleia, febre, náuseas, vômitos, leucopenia e sintomas mediados por histamina, incluindo erupção cutânea, prurido, edema facial, e vasodilatação.
Micafungina	ativa contra <i>Aspergillus spp</i> , sem atividade para <i>C. neoformans</i> .			
Anidofungina				

Análogos de pirimidina

-5-fluorocitosina	Ativa contra <i>Candida spp</i> e <i>Cryptococcus spp</i> ; entretanto, surgimento de rápida resistência que pode aparecer quando 5-FC é usado como monoterapia.	Imparidade de biossíntese de ácidos nucleicos por formação de tóxicos antimetabolitos pirimidina fluorados.	Diminuição da captação de 5-FC, diminuição da formação de anti-metabolitos tóxicos.	Intolerância gastrointestinal, depressão da medula óssea, erupção cutânea, cefaleia, hepatotoxicidade, confusão, alucinações, sedação e euforia.
Alilaminas				
-Terbinafina	Ativa contra a maioria dos dermatófitos, baixa atividade contra <i>Candida spp</i> .	Inibição da esqualeno epoxidase.	Desconhecido.	Desconforto gastrointestinal e cefaleia.
Morfolinas				
-Amorolfina	Ativa contra a maioria dos dermatófitos, baixa atividade contra <i>Candida spp</i> .	Inibição da esterol Δ -redutase e Δ - isomerase.	Desconhecido.	Irritação, coceira, infecções na pele; ardência na região das unhas.
Nicomícinas				
-Nicomícina	Espectro limitado para fungos, eficaz contra as células com alto conteúdo de quitina, atividade contra dermatófitos e leveduras.	Inibidor da quitina sintase.	Desconhecido.	Não comercializadas (fase pré-clínica).

Fonte: elaborada pela autora

1.6. Resistência de *C. neoformans* aos medicamentos

A resistência a uma determinada droga pode ser primária, que se refere à capacidade intrínseca do fungo de impedir a ação do antifúngico por mecanismos endógenos, ou secundária, que é a resistência adquirida por certas cepas após o contato com a droga. Pode-se ainda observar a resistência clínica, na qual o fungo apresenta susceptibilidade à droga em testes *in vitro*, entretanto não é capaz de erradicar a infecção quando utilizada por um paciente, podendo ocorrer pela própria interação patógeno-hospedeiro (Kanafani e Perfect, 2008).

A capacidade de *C. neoformans* para desenvolver resistência aos azóis depende de vários mecanismos, incluindo alterações na interação entre a droga e o alvo Erg11, mutações (Sheng *et al.*, 2009) e a superexpressão de transportadores multidrogas, que leva a uma diminuição do acúmulo celular dos azóis. O transportador de droga melhor caracterizado em *C. neoformans* é o transportador ABC *AFRI*. A diminuição da concentração da droga parece estar relacionada a um aumento na expressão de genes transportadores da bomba de efluxo desse grupo de drogas (Posteraro *et al.*, 2003) e à modulação das vias de sinalização de estresse. Recentemente, foi utilizada uma abordagem para elucidar o mecanismo genômico molecular

pelo qual *C. neoformans* adquire altos níveis de resistência aos azóis. Nesse estudo, foi descoberto que a resistência adaptável aos azóis foi obtida pela duplicação de vários cromossomos, em resposta ao fluconazol (Sionov *et al.*, 2010). A duplicação do cromossomo 1 foi comum, resultando em um aumento do número de cópias do gene que codifica o alvo Erg11.

As ATPases do tipo-P são uma grande família de transportadores dependentes de ATP com domínio multi-transmembrana, que incluem as aminofosfolípides translocases (APTs). Em *C. neoformans*, *APT1* codifica uma proteína integral de membrana com atividade ATPase do tipo-P pertencente à família APT. Mutantes *Apt1* exibem uma distribuição alterada de actina, aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo, e hipersensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B (Hu, G. e Kronstad, 2010). *SRE1*, um homólogo de mamíferos *SREBP*, é importante na via de detecção de oxigênio, estimulando a produção de ergosterol quando a síntese do ergosterol dependente de oxigênio é limitada pela hipóxia. As funções de *SRE1* sob baixas condições de oxigênio são ativar a transcrição de numerosos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol e o transporte de ferro, cobre e outras moléculas (Chang *et al.*, 2007). Os mecanismos de resistência de *C. neoformans* aos azóis são descritos na **Figura 5**.

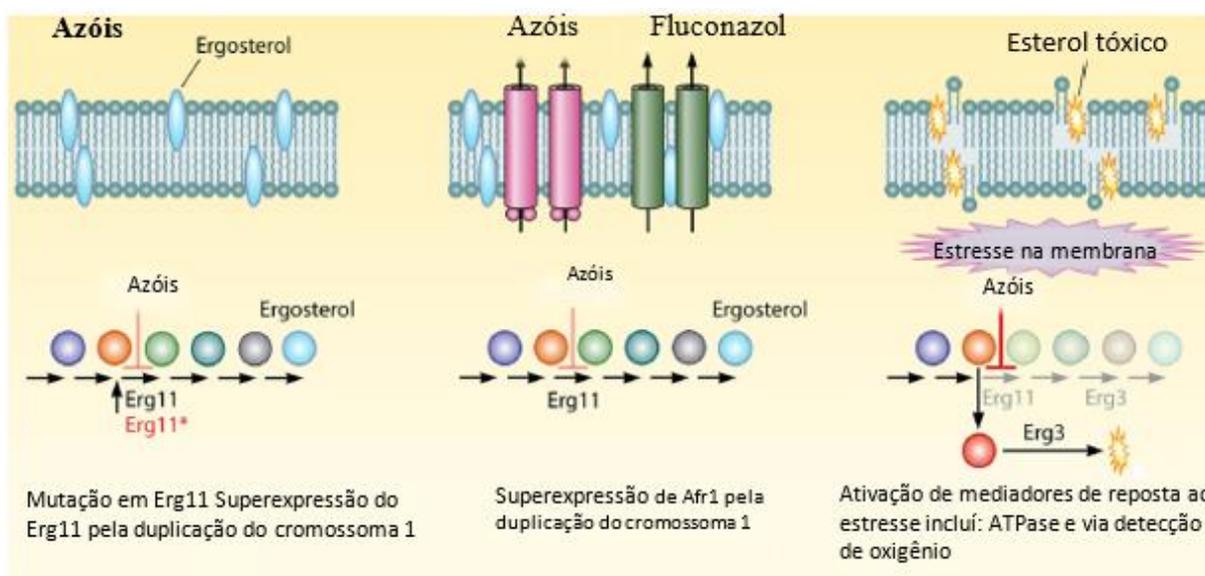


Figura 5. Mecanismos de resistência de *C. neoformans* aos medicamentos. *C. neoformans* pode adquirir resistência aos azóis através de vários mecanismos, incluindo a superexpressão ou a alteração do alvo Erg11, a superexpressão do transportador multidroga Afr1, ou a indução de numerosas respostas ao estresse celular. Em *C. neoformans* a resistência aos polienos é extremamente rara. Além disso, *C. neoformans* exibe resistência intrínseca às equinocandinas. Fonte: adaptado de Shapiro *et al.*, (2011).

A preocupação existente sobre a resistência de *C. neoformans* a antifúngicos está relacionada ao uso de fluconazol em terapias antifúngicas de manutenção, porém até o momento poucos casos de resistência a essa droga foram relatados e aqueles encontrados foram relacionados à resistência secundária em pacientes com AIDS. Essa resistência parece estar relacionada a um processo dinâmico e heterogêneo de mutações, estimando-se que cerca de 5% dos isolados clínicos apresentam um fenótipo heteroresistente ao fluconazol (Pfaller, M. A. *et al.*, 2011).

A resistência de *C. neoformans* à anfotericina B tem sido documentada analisando cepas mutantes. Isolados selecionados *in vitro* demonstraram que o mecanismo de resistência a anfotericina B parece estar relacionado a uma alteração nos esteróis das células, o que poderia afetar a ligação da droga a esses alvos. No entanto aqueles com resistência cruzada de anfotericina B e fluconazol mostraram que não havia alteração nos esteróis de membrana, mas havia uma bomba de efluxo de drogas (Joseph-Horne *et al.*, 1995). Resistência a anfotericina B em *C. neoformans* foi pouco encontrada, sendo observada raramente apenas como resistência secundária (Pfaller, M. A. *et al.*, 2011). Outro meio pelo qual *C. neoformans* pode adquirir resistência a anfotericina B é através da formação de biofilmes, que apresentam elevados níveis de resistência aos polienos e azóis (Martinez e Casadevall, 2006). *C. neoformans* é intrinsecamente resistente às equinocandinas tanto *in vitro* como *in vivo*. Embora as equinocandinas representem um importante arsenal antifúngico, devido ao seu excelente perfil de segurança, o surgimento de resistência, principalmente devido à mutação no gene *Fks1* que codifica a enzima alvo, glucana sintase, tem sido observada apesar de sua introdução na clínica relativamente recente (Pfaller, M. A. *et al.*, 2011). A explicação molecular da resistência intrínseca de *C. neoformans* permanece enigmática, no entanto, postula-se que a resistência pode ser devido ao rápido efluxo a partir da célula ou a degradação do fármaco intracelular ou extracelularmente.

1.7 Busca de potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

As infecções fúngicas constituem um problema de saúde crescente, seu impacto é cada vez maior devido ao aumento do número de pacientes criticamente enfermos, oncológicos e imunocomprometidos, que impacta fortemente o sistema de saúde pública no País. As altas taxas de mortalidade associadas a essas infecções claramente indicam que as atuais terapias antifúngicas não são eficientes: o arsenal limitado de drogas antifúngicas juntamente com os problemas de toxicidade e o surgimento de resistência destes fungos representam enormes

desafios para os cientistas que trabalham nessa área. Além disso, o desenvolvimento de drogas antifúngicas estagnou na última década, já que as grandes empresas farmacêuticas têm focado seus esforços na geração de drogas mais rentáveis para tratar condições crônicas (doenças neuro-degenerativas, câncer) (Pierce *et al.*, 2013). Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de uma nova geração de agentes antifúngicos mais específicos, visando contornar a problemática mundial de resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis (principalmente anfotericina B e derivados azólicos) e que ofereçam um tratamento seguro contra as micoses sistêmicas.

Moléculas antifúngicas potentes foram descobertas em décadas anteriores, mas apenas algumas delas passaram a ser candidatas a terapêuticas viáveis, porque provar a sua segurança é muito mais difícil que demonstrar sua atividade antifúngica (Lewis, 2011). Alguns dos principais problemas de saúde, tais como vários tipos de câncer e doenças infecciosas, diabetes e doenças neurodegenerativas necessitam de medicamentos inovadores, entretanto, o desenvolvimento de novas drogas ocorre lentamente e envolve um alto custo. De acordo com phRMA (*Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*), dentre 5.000 a 10.000 moléculas testadas, normalmente apenas uma chega ao mercado, sendo um processo que leva em média de 10 a 15 anos para ser finalizado dependendo da área terapêutica (dados atuais <http://www.phrma.org/innovation/clinical-trials>), e pode custar até 1,2 bilhões de dólares para trazer uma única droga ao mercado (Chong e Sullivan, 2007). Além disso, a resistência aos fármacos ameaça a utilidade do limitado arsenal de agentes antifúngicos.

A identificação de genes essenciais ou importantes para viabilidade celular de fungos oferece uma estratégia alternativa para a busca de novos alvos para drogas antifúngicas (Hu, W. *et al.*, 2007). O acesso às sequências genômicas completas de patógenos e do genoma humano trouxe a possibilidade de que genes-alvo possam ser racionalmente identificados (Saïdani *et al.*, 2009). Segundo Felipe e cols. (2005) a análise global do transcriptoma de *P. brasiliensis* forneceu informações sobre as sequências relacionadas ao ciclo celular, resposta ao estresse, resistência à droga, e as vias de transdução de sinais do patógeno. Uma análise por genômica comparativa permitiria identificar potenciais genes-alvo para o desenvolvimento de novas drogas (Felipe *et al.*, 2005). Em relação aos fungos patogênicos, a crescente disponibilidade de genomas completos permite abordar a estratégia de busca e desenvolvimento de novas drogas antifúngicas usando uma abordagem comparativa de diferentes genomas, visando identificar genes de relevância para a sobrevivência do patógeno (Rispaill *et al.*, 2009).

Nesse caminho, a genômica comparativa realizada recentemente pelo nosso grupo, a partir de 57 genes (sendo 55 essenciais e 2 importantes para a sobrevivência do fungo), revelou 10 genes conservados em várias espécies de fungos patogênicos humanos de relevância mundial (*Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitides*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e o gênero *Paracoccidioides* spp.) e ausentes no genoma humano. Esta análise apontou quatro potenciais genes alvo: *trr1*, *kre2*, *erg6* e *rim8*, baseados em alguns critérios, entre os quais estão: ser de preferência uma enzima; ser essencial ou importante para a sobrevivência do fungo no interior do hospedeiro; ter uma localização celular acessível para que a droga tenha sua atividade facilitada; estar presente em todos os patógenos analisados e ausentes em humanos; e não ser auxotrófico. Essa estratégia pode ser promissora para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (Abadio *et al.*, 2011).

É importante destacar que este trabalho faz parte de um projeto de pesquisa maior denominado: “Pós-genoma de fungos patogênicos humanos visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas”, na área de genética molecular e de microrganismos, com foco futuro no desenvolvimento tecnológico e inovação, que tem como objetivo geral o estudo funcional e estrutural de genes conservados em diferentes fungos patogênicos humanos visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas que possam ser utilizadas no tratamento de micoses de alta relevância mundial. Portanto, esta dissertação de mestrado se interconecta e converge para um objetivo geral comum: a caracterização de alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de drogas antifúngicas. Os proponentes têm absoluta ciência das dificuldades e gargalos que poderão ser encontrados para, em 2-3 anos, alcançar o desenvolvimento de pelo menos 1 droga antifúngica; sendo assim a estratégia paralela de modelagem molecular deverá direcionar e catalisar este processo de busca de novas drogas. As análises do sinergismo das moléculas inibitórias identificadas por varredura virtual de quimiotecas com antifúngicos, comercialmente disponíveis, poderão contribuir de modo significativo, no futuro, com o desenvolvimento de novos medicamentos com menores doses e alta eficácia, desta forma reduzindo os efeitos colaterais, tão críticos no tratamento de pacientes graves que necessitam de longos períodos de tratamento.

1.8 Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas-alvo

Duas diretrizes evoluíram para aperfeiçoar o processo de busca de drogas: uma abordagem, baseada em varredura em larga escala (HTS), e outra abordagem racional baseada na estrutura

da proteína-alvo. Historicamente, o processo de descoberta de uma droga tem sido realizado por técnicas HTS, onde testes biológicos são realizados com um grande número de compostos até identificar os que são biologicamente ativos (Congreve *et al.*, 2005). Já a abordagem envolvendo a análise da estrutura proteica baseia-se na busca por compostos que possam interagir especificamente com a proteína-alvo, e assim, inativá-la (Hillisch *et al.*, 2004).

As informações estruturais de um número razoável de macromoléculas biológicas estão disponíveis no banco de dados de estrutura de proteínas - *Protein Data Bank* (PDB) que contém ~93.000 estruturas resolvidas experimentalmente para determinadas proteínas (dados atuais, <http://www.pdb.org>). Além disso, o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) contém mais de 33 milhões de sequências gênicas a partir de uma grande variedade de espécies (dados atuais, <http://ncbi.nlm.nih.gov>).

A estrutura de proteínas pode ser atualmente determinada com técnicas experimentais de alta resolução por raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN). Entretanto em alguns casos, essas informações estruturais não são facilmente obtidas por tais métodos. A situação é particularmente complicada para proteínas de membrana; menos de 1% de estruturas experimentalmente resolvidas são proteínas de membrana, embora elas representem 30% do genoma e são alvos de mais da metade das drogas terapêuticas (Bill *et al.*, 2011). Esta deficiência nas informações estruturais de alta resolução para estas proteínas é devida principalmente a requisitos mais exigentes para a superexpressão, purificação e cristalização em comparação com as proteínas solúveis em água (Baker, 2010).

Quando se tem ausência de estrutura 3D resolvida experimentalmente para uma determinada proteína, pode-se utilizar métodos computacionais para prever modelos proteicos tridimensionais e fornecer informações estruturais dessas proteínas (Cavasotto e Phatak, 2009), desde que se tenha um molde de proteínas homólogas. A disponibilidade de programas computacionais com metodologias orientadas na predição da estrutura 3D permite usar uma estrutura 3D molde homóloga à proteína-alvo. Neste contexto, as ferramentas de modelagem molecular *in silico* podem ser utilizadas para modelar os efeitos das mutações, para prever a localização de superfícies de ligação com outras macromoléculas e pequenas moléculas efetores, para estimar a energia de ligação, e prever os movimentos locais e não-locais necessários para ligação, sinalização e catálise (Werner *et al.*, 2012). Os avanços nas técnicas computacionais e *hardware* tem habilitado os métodos *in silico* para acelerar a identificação e otimização destas possíveis novas drogas.

A modelagem molecular por homologia ou modelagem comparativa consiste na observação de que proteínas evolutivamente relacionadas (ou seja, proteínas que estão

relacionadas entre si por serem originadas de um gene ancestral comum, em termos de sequência de resíduos de aminoácidos), tendem a ter estruturas semelhantes. Como resultado, a estrutura não resolvida de uma proteína-alvo pode ser modelada utilizando a estrutura resolvida de uma proteína homóloga (molde), para prever a conformação dessa proteína que apresenta uma sequência de aminoácidos similar (Martí-Renom *et al.*, 2000). Estima-se que para cada proteína no PDB, uma média de outras 20 proteínas homólogas podem ser construídas (Vitkup *et al.*, 2001).

A modelagem molecular por homologia envolve três etapas sequenciais: construção da estrutura molde, refinamento e avaliação. A etapa de construção da estrutura molde envolve a identificação do melhor molde que pode ser utilizado na transferência de coordenadas atômicas, alinhando a sequência-alvo com as sequências molde de proteínas de estruturas conhecidas. Um único molde (*template*) ou vários moldes são escolhidos, sendo aceitável um nível de identidade no mínimo 30% entre as sequências (Cavasotto e Phatak, 2009). Entretanto deve-se empregar essa medida com cautela porque esses valores podem mascarar a identidade real no sítio de ligação. Em caso de uma baixa similaridade, alinhamentos múltiplos podem melhorar a qualidade do alinhamento entre o alvo e o molde (Craig *et al.*, 2010). Na fase de refinamento, as estruturas dos *loops* e as cadeias laterais, geralmente são refinadas por procedimentos de dinâmica molecular ou minimização de energia. Na última etapa, os modelos refinados são avaliados pela sua concordância com informações obtidas da estrutura conhecida e outros resultados experimentais que podem incluir medidas independentes de localização de ligações dissulfeto, estrutura secundária medida pelo dicroísmo circular ou espectroscopia infravermelha e dados estruturais de baixa resolução (Werner *et al.*, 2012).

Associada à bioinformática, essa abordagem pode ser expandida para a busca e desenho racional de fármacos, onde o pesquisador faz a utilização de filtros para aumentar as chances de se encontrar uma molécula biologicamente ativa. A bioinformática pode ser empregada nas etapas da pesquisa básica de um novo medicamento, diminuindo assim os gastos e o tempo necessário para o seu desenvolvimento até a sua comercialização.

1.9 Varredura virtual de compostos ativos

A identificação experimental de pequenas moléculas com atividade desejada pode ser obtida por varredura em larga escala (HTS), no entanto, as bibliotecas de drogas geralmente contêm milhões de compostos, e sua aquisição (por exemplo, através de síntese química) e

ensaio eficiente por robôs sofisticados exige vários anos de esforços e muitas vezes um enorme investimento financeiro (Plewczynski *et al.*, 2010). Tais situações forneceram a análise e desenvolvimento de técnicas alternativas. A expressão *virtual screening* ou varredura virtual (VS) foi cunhada na década de 1990. Na VS, os compostos são selecionados por predição de sua interação a um alvo macromolecular utilizando programas de informática. O *docking* computacional pode efetivamente obter complexos proteína-ligante, descartando os ligantes não viáveis ou desfavoráveis numa fase inicial, e assim promovendo um processo de descoberta de drogas mais eficientes (Forster, 2002).

A VS tem duas vantagens: (1) a velocidade em que uma grande biblioteca de compostos pode ser rastreada, e (2) o pequeno capital de investimento inicial em comparação com o custo de um programa de varredura *in vitro* (HTS de alto rendimento). O principal objetivo da VS é reduzir uma base de dados molecular para poucos compostos candidatos (*hits*) que tenham interação com um determinado alvo proteico. Os compostos candidatos são os primeiros inibidores identificados, mas não são necessariamente as moléculas ideais, já que os *leads* são inibidores potenciais. Por fim o *lead* ideal é então preparado para os testes pré-clínicos e clínicos (Stahura e Bajorath, 2004).

Com o objetivo de fornecer uma ferramenta de fácil utilização para encontrar os *hits*, Beautrait e cols. desenvolveram uma plataforma de varredura virtual chamada VSM-G (gerente de varredura virtual para redes- grids- computacionais), que usa métodos baseados na estrutura dos compostos de entrada de acordo com sua afinidade pelo alvo, podendo assim priorizá-los (Beautrait *et al.*, 2008). A metodologia de VSM-G representada na Figura 6 pode ser definida em três etapas: 1) preparação dos ligantes (molécula orgânica ou peptídeo), 2) preparação da molécula-alvo e 3) processo de *docking* baseado em estrutura.

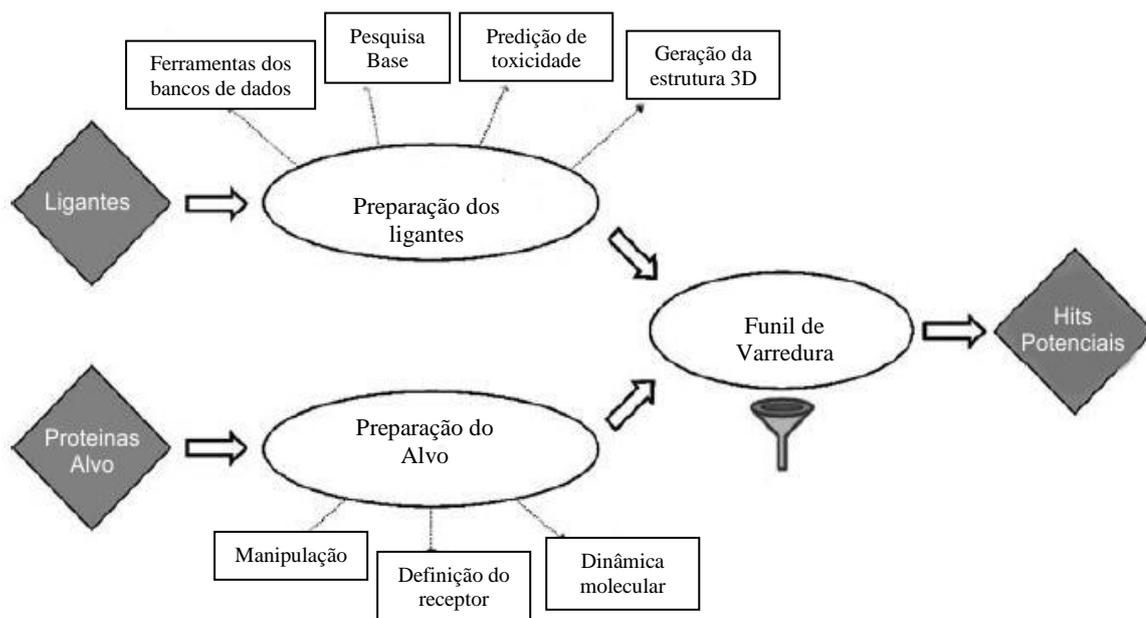


Figura 6. Estratégia de varredura virtual para a descoberta de *hits*. Fonte: adaptado de Beaudrait *et al.*, (2008), com modificações.

Os métodos de VS podem ter duas finalidades distintas, a primeira corresponde à exclusão de um grande número de compostos com pouca ou nenhuma atividade, levando a um limitado conjunto de moléculas que sejam *hits* mais prováveis (Abagyan e Totrov, 2001), pelo método conhecido como “filtro”. A segunda finalidade é identificar compostos similares na entrada de classificação, reduzindo o número de candidatos prováveis para gerar o *hit*. Os protocolos de VS são baseados em filtros que reduzem o número de compostos a serem testados experimentalmente, portanto, diminuindo o custo dos experimentos de teste *in vitro* e *in vivo* (Bleicher *et al.*, 2003). Em cada etapa do processo, o filtro descarta os compostos inadequados.

A VS usa quimiotecas de compostos ativos que são rastreados contra um ou mais alvos e retornam para uma lista ordenada de compostos candidatos com potencial de interação com proteínas-alvo (Werner *et al.*, 2012). Bancos como *Life Chemicals* e *Chimiotèque Nationale* são fontes de pequenas moléculas comercialmente disponíveis. A empresa *Life Chemicals* Inc., Burlington, Canadá, sintetiza e comercializa atualmente 830.000 compostos com alta diversidade química e dispõe de quatro tipos de bibliotecas que se diferenciam pela atividade biológica esperada do composto: biblioteca de alvos em geral; biblioteca baseada na forma do alvo; biblioteca baseada em farmacóforo e biblioteca de projetos especiais (dados atuais

<http://www.lifechemicals.com/>). A biblioteca de alvos em geral é a mais ampla com compostos baseados tanto no receptor como no ligante. Esses compostos apresentam uma variedade de alvos com diferentes atividades biológicas, como quinases, canais iônicos, receptores nucleares, peptidase, entre outros. A biblioteca baseada na forma do alvo leva em consideração a interação do composto com certa região da proteína, especialmente no seu sítio ativo. A biblioteca baseada em farmacóforo é gerada pela distribuição dos átomos extraída diretamente da topologia da molécula, ou seja, da região do ligante que está intimamente ligado ao seu receptor e que confere sua atividade terapêutica. A biblioteca de projetos especiais oferece um conjunto de compostos desenhados e sintetizados para receptores acoplados à proteína G.

1.10 Trr1 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

No citoplasma da maioria das células as proteínas se encontram no estado reduzido, em contraste com as proteínas extracelulares onde ligações dissulfeto são comumente encontradas e ajudam a manter a sua estrutura em um ambiente muito hostil. Tioredoxinas e glutaredoxinas são proteínas termoestáveis capazes de reduzir pontes dissulfeto nas proteínas-alvo. Estas oxidoreduções contêm duas cisteínas vizinhas em seu sítio ativo que após redução do dissulfeto alvo torna-se oxidada. O dissulfeto da tioredoxina é reduzido numa reação catalisada pela tioredoxina redutase a partir do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Ritz e Beckwith, 2001).

A Tioredoxina (Trx) foi descoberta por Peter Reichard e cols, quando esta pequena proteína ditiol foi isolada em sua forma pura, como doador de hidrogênio para a ribonucleotídeo redutase de *E. coli* (Moore *et al.*, 1964). A primeira função redox de Trx foi descoberta em meados dos anos 1970, quando Trx de *E. coli* mostrou ser uma subunidade do fago T7 DNA polimerase (Mark e Richardson, 1976). O sequenciamento da proteína bacteriana Trx revelou o protótipo ditiol dos motivos do sítio-ativo altamente conservado Cys-Gly-Pro-Cys, que é encontrado em todos os reinos da vida desde archaea até mamíferos (Holmgren, A, 1968), onde as cisteínas podem apresentar dois estados: oxidadas formando pontes dissulfeto ou reduzidas em forma de ditiol.

As tioredoxinas redutases (Trr) são oxidoreduções necessárias para a redução do sítio-ativo dissulfeto de Trx, portanto, responsáveis pela manutenção do conjunto de Trx reduzidas e ativas. A tioredoxina redutase é uma flavoenzima que se liga a um dinucleotídeo de flavina-adenina e NADPH, que está localizada no citoplasma das células fúngicas e desempenha um

papel crítico na manutenção do estado redox de células (Kontou *et al.*, 2004). As flavoenzimas contêm dois centros redox: um FAD e um grupo dissulfeto/ditiol em cada subunidade. A tioredoxina redutase faz parte de um complexo conhecido como sistema tioredoxina, que contém a tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (Trr) e NADPH, atuando como um sistema de dissulfeto redutase (Lennon, Brett W *et al.*, 2000). Nesse sistema, a tioredoxina redutase reduz o dissulfeto do sítio ativo da tioredoxina a ditiol usando o NADPH como doador de elétrons. Portanto, a função desse sistema é reduzir pontes dissulfeto em proteínas-alvo (Holmgren, A., 2000) (**Figura 7**). Em geral, as estruturas de Trx reduzidas e oxidadas são muito semelhantes, mas foi reconhecido em 1967, a partir de um aumento da emissão de fluorescência de Trp, que a proteína sofre algumas alterações conformacionais após a redução (Holmgren, Arne, 1995). Estas alterações sutis e locais envolvidas com pontes de hidrogênio no sítio ativo podem ter um efeito drástico sobre a atividade de ligação de Trx às outras proteínas.

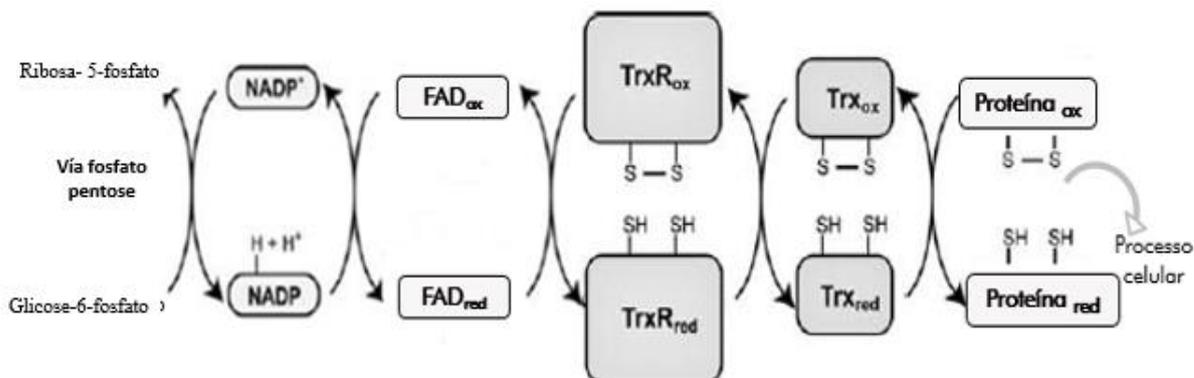


Figura 7. Cascata do sistema redox da Trx. A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) + H⁺ é gerado pela via fosfato pentose. NADPH + H⁺ reduz a Tioredoxina redutase oxidada (TrxR_{ox}), que regenera o conjunto de Trx reduzida. Trx reduzida contribui para manter um ambiente redutor para diferentes proteínas. A TrxR, possui dois centros redox, um grupo dissulfeto-ditiol, que reduz a tioredoxina, e um cofator (FAD), que recebe elétrons provenientes do NADPH. Fonte: adaptado de Lee *et al.*, (2013), com modificações.

Trr/Trx representam um sistema fundamental para defesa contra estresse oxidativo, além disso, o sistema Trx em bactérias, leveduras e mamíferos está envolvido na regulação da síntese de DNA, na modulação das vias de sinalização intracelular e extracelular, na regulação de fatores de transcrição, na modulação da resposta imunitária e no crescimento celular e apoptose (Williams, C.H. *et al.*, 2001).

Dois tipos de Trr foram caracterizados, a isoforma de alta massa molecular (H-Trr) (~55 kDa), presente em mamíferos e alguns parasitas (Sandalova *et al.*, 2001) e a isoforma de baixa massa molecular (L-Trr) (~35 kDa) encontrada na maioria das bactérias, plantas e fungos (Hirt *et al.*, 2002). Entretanto, a identidade de sequência entre L-Trr e H-Trr é de apenas ~20%. Além disso, H-Trr tem um centro redox-ativo (com um padrão CXXXXC) no domínio de ligação ao FAD, que não tem equivalente no domínio de ligação ao FAD das L-Trr. Na L-Trr, o dissulfeto redox ativo (motivo CXXC) está localizado no domínio de NADPH. Como também, as H-Trr possuem um domínio C-terminal (o domínio de interface), ausente em L-Trr, que é responsável pela dimerização e está envolvido na catálise (Hirt *et al.*, 2002). Estas duas isoformas parecem ter evoluído independentemente, de modo que os mecanismos enzimáticos são muito diferentes. Embora estas isoformas apresentem funções semelhantes, as estruturas das proteínas são muito diferentes, e conseqüentemente a tioredoxina redutase pode ser um alvo terapêutico seletivo contra fungos patogênicos (Williams, C.H. *et al.*, 2001). Em eucariotos superiores, a distância entre esses domínios e sua orientação permite a transferência de elétrons a partir de NADPH para o dissulfeto da Trx sem a necessidade de uma grande alteração na conformação da Trr (Sandalova *et al.*, 2001). Em procariotos e fungos, os domínios de ligação ao NADPH e ao FAD estão localizados em lados opostos da molécula, necessitando de uma alteração conformacional significativa para que ocorra o transporte de elétrons (Lennon, B.W. *et al.*, 2000). Além disso, os centros redoxi dissulfeto-ditiol estão enterrados dentro da cadeia polipeptídica, criando uma barreira estérica para redução da tioredoxina. Em *E. coli*, a tioredoxina redutase pode adotar uma conformação alternativa, denominada FR (flavina reduzida, em que os domínios de ligação ao NADPH e ao FAD sofrem uma rotação de 67°, permitindo assim a transferência de elétrons (Lennon *et al.*, 2000). Esta rotação permite a transição entre as conformações FO e FR, colocando o NADPH e o centro dissulfeto próximos ao anel da flavina e expõe, assim, os resíduos de cisteína para interagirem com a tioredoxina. Dessa forma, a tioredoxina redutase na conformação FR permite a redução do FAD pelo NADPH e a da tioredoxina pela tioredoxina redutase (Oliveira *et al.*, 2010).

A análise estrutural de Trr e Trx propicia a identificação do arranjo tridimensional da proteína que permite sua interação com moléculas que são importantes para a função. Embora, as Trr isoladas de eubactérias e dos eucariotas inferiores têm sido extensivamente caracterizadas, não existe informação disponível sobre a estrutura tridimensional de Trr1 e Trx1 em fungos patogênicos humanos. Em *S. cerevisiae*, há duas enzimas tioredoxina

redutase localizadas em diferentes compartimentos, ScTrxR1 no citoplasma e ScTrxR2 na mitocôndria. A deleção do gene TrxR1 de *S. cerevisiae* gerou células mutantes não viáveis, refletindo assim a essencialidade do gene (Giaever *et al.*, 2002). Em relação à tioredoxina de *S. cerevisiae*, há duas citosólicas (ScTrx1 e ScTrx2) e uma mitocondrial (ScTrx3) (Zhang *et al.*, 2009). ScTrx1 e ScTrx2 apresentam 78% de identidade de sequência de aminoácidos e demonstram 46% (ScTrx1) e 43% (ScTrx2) de identidade de sequência de aminoácidos com ScTrx3 (Oliveira *et al.*, 2010). Em decorrência dessa homologia, esses autores mostraram que ScTrxR1 citosólica é capaz de reduzir as três tioredoxinas, Trx1, Trx2 e Trx3 de *S. cerevisiae*, com eficiência. Entretanto, ScTrxR1, não foi capaz de reduzir tioredoxinas de *E. coli* e *Homo sapiens*. Dessa forma, ScTrxR1 apresenta uma atividade espécie específica com a tioredoxina de levedura.

A análise da estrutura de TrxR1, em *S. cerevisiae*, mostrou que o monômero (**Figura 8**) é composto por dois domínios β - α - β - α - β que formam os sítios de ligação ao NADPH e ao FAD (Oliveira *et al.*, 2010). O domínio de ligação ao FAD é composto pelos resíduos 1-121 e 253-318. Uma molécula de FAD está ligada à estrutura ScTrxR1 sendo estabilizada pelas interações com Pro13, Glu45, Asn54, Gln136, Asp288 e Gln296. O domínio de ligação ao NADPH é uma sequência contínua (do resíduo 123 - 250). Os dois domínios estão ligados por uma pequena folha β . Os resíduos de cisteína (Cys142-Ala-Val-Cys145) são encontrados em um loop que contém o sítio de ligação ao NADPH e formam uma ligação dissulfeto, que está próxima ao FAD. Na modelagem molecular por homologia, as estruturas homólogas da proteína TrxR1 de *P. lutzii* (Pb01) no PDB: 3ITJ (PDB ID) de *S. cerevisiae* e 1VDC (PDB ID) de *A. thaliana* apresentaram uma sequência de identidade de 65% e 57%, respectivamente. A construção dos modelos tridimensionais de TrxR1 foi realizada a partir destas estruturas homólogas (Abadio *et al.*, 2011).

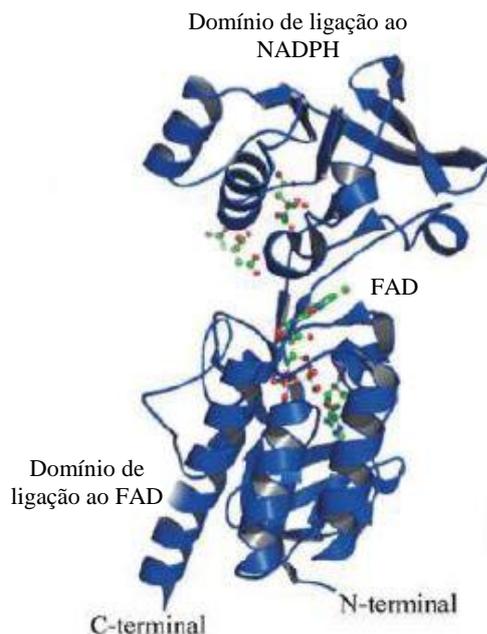


Figura 8. Estrutura global do monômero TrxR1 de *S. cerevisiae*. Fonte: adaptado de Oliveira *et al.*, (2010).

A tioredoxina redutase tem sido estudada em diversos organismos, incluindo bactérias e fungos. O aumento da transcrição dos genes do sistema tioredoxina em *Staphylococcus aureus* é observado pelo estresse ao diamide, menadiona e t-butil hidroperóxido, mas não com o peróxido de hidrogênio (Uziel *et al.*, 2004). Tanto a *TRR1* como *TRR2* são induzidos em resposta ao stress pelo H_2O_2 em *S. cerevisiae* (Godon *et al.*, 1998) Em *Candida albicans*, *TRR1* é induzido durante estresse ao H_2O_2 e ao estresse osmótico (Enjalbert *et al.*, 2003). Segundo Missall e Lodge (2005) como *C. neoformans*, ao contrário de *S. cerevisiae* não codifica para um sistema tioredoxina mitocondrial por separado, parece que a única enzima tioredoxina redutase funciona para ambas as formas citoplasmática e mitocondrial. Estes autores, ao substituir o promotor endógeno *TRR1* com um promotor induzível por cobre, demonstraram que Trr1 é essencial para a viabilidade do fungo patogênico *C. neoformans*, tornando-o um alvo potencial antifúngico (Missall, Tricia A e Lodge, 2005b). Além disso, foi demonstrado que a tioredoxina mais altamente expressa, *TRX1*, é necessária para a sobrevivência de *C. neoformans* no ambiente oxidativo de macrófagos e importante para a virulência deste patógeno (Missall, Tricia A e Lodge, 2005a). Zaki e cols. (2012) demonstraram que a deleção da perda da função de um único alelo de *TRR1* é suficiente para reduzir a virulência de *C. albicans* em camundongos. Além disso, a perda de um alelo diminui a capacidade de *C. albicans* para sobreviver ao estresse oxidativo. A incapacidade para gerar mutantes homozigotos *trr1* sugere que o produto do gene *TRR1* é essencial para a viabilidade

celular. Devido que a tioredoxina redutase é altamente conservada entre as espécies de fungos (ausente no ser humano) e *TRR1* demonstrou ser essencial para a sobrevivência de *C. albicans*, este gene pode ser um novo alvo promissor para terapia antifúngica (Zaki *et al.*, 2012). Em *C. albicans* Trx1 é necessária para a ativação da proteína cinase Hog1 e para modulação da atividade do fator de transcrição Ap-1 em resposta ao estresse oxidativo (da Silva Dantas *et al.*, 2010). O parasita da malária *Plasmodium falciparum* possui uma grande enzima homodimérica, com dois resíduos de cisteína, ativos redox na região C-terminal. A acessibilidade da tioredoxina recombinante de *T. brucei* permitiu a caracterização da primeira tioredoxina redutase tripanossomatídeo. A deleção do gene *trx* em *T. brucei* revelou se a tioredoxina é essencial para a viabilidade e virulência do parasita (Reckenfelderbäumer *et al.*, 2000). Em *Aspergillus nidulans* foi demonstrado o impacto do sistema tioredoxina redutase na diferenciação, o desenvolvimento sexual e a resposta ao estresse oxidativo neste organismo. Foi criada uma cepa de deleção da tioredoxina em *A. nidulans*, que demonstrou uma diminuição do crescimento, um aumento da atividade da catalase, e a incapacidade de formar estruturas reprodutivas como conidióforos quando foi cultivada em condições normais (Thön *et al.*, 2007).

Uma estratégia para a busca de novos antifúngicos se baseia na identificação de genes essenciais ou importantes para a viabilidade celular de fungos (Hu *et al.*, 2007). Como resultado preliminar em nosso grupo, já foi realizado uma busca prévia dos genes anotados na Rede Genoma Regional do *P. brasiliensis* para a identificação de possíveis genes-alvos. Esta busca *in silico* utilizou como base 35 genes de *A. fumigatus* e 23 genes de *C. albicans*, previamente descritos como genes essenciais nestes dois patógenos humanos (Hu *et al.*, 2007; Roemer *et al.*, 2003). Baseando-se em parâmetros de seleção, foram selecionados 4 (quatro) genes preliminarmente. Os alinhamentos múltiplos entre as sequências da proteína Trr1 de diferentes fungos patogênicos humanos mostraram a presença de domínios conservados. Isso sugere a possibilidade de identificar novas moléculas capazes de inibir a enzima tioredoxina redutase. A **Figura 9** mostra um alinhamento múltiplo das sequências proteicas Trr1 dos patógenos *P. lutzii* Pb01, *P. brasiliensis* Pb3, *P. brasiliensis* Pb18, *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. immitis*, *C. neoformans* e *H. capsulatum*. O alinhamento múltiplo da Trr1 mostrou a conservação do motivo AVPI (Ala-Val-Pro-Ile), bem como as duas cisteínas (Cys145 e Cys148) em todos os fungos analisados. (Abadio *et al.*, 2011).

Domínio de ligação FAD

```

Trr1Pb3      SETVSRVDLSCRPFKLWKEFS DGPDDAPAHTADALI IATGANARRLDL PGEQQYWQNGIS 108
Trr1Pb18    SETVSRVDLSCRPFKLWKEFS DGPDDAPAHTADALI IATGANARRLDL PGEQQYWQNGIS 147
Trr1Pb01    SETVSRVDLSCRPFKLWKEFS DGPDDAPAHTADALIVATGANARRLDL PGEQQYWQNGIS 143
Trr1Hc      TETVSRIDLSSRPFKLWKEYADGPN DGPAAHTTDAII IATGANARRLDL PGEERYWQNGIS 108
Trr1Bd      TETVSRVDLSSRPFKVWKEYSDGPN DAAAHTADALI IATGANARRLDL PGEQQYWQNGIS 180
Trr1Ci      TETISRVDLSSRPFKLWKEWSDGPN DAPAHTADALI IATGANARRLDL PGEDKYWQNGIS 143
Trr1Af      TETISRVDLSSKPFKLWTEWNDGPDKE PAC TADAVI IATGANARRLML PGEETYWQNGIS 162
Trr1Ca      TETISKVDFSKRPFKLWTEWNN---EDAEPITTD AVI IATGASAKRMHLPGEDTYWQQGIS 140
Trr1Cn      TETVARVDLSVRPFKYWTEGEE--EEHEFMTAD TII MATGASAKRFLPGEDTYWQSGIS 167
:***::*: * :*** *.* :. *:*::*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

Trr1Pb3      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIGGGDSAAEEAMFLTKY GSKVTVLVR RDKLRASKTMAKRLL 168
Trr1Pb18    ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIGGGDSAAEEAMFLTKY GSKVTVLVR RDKLRASKTMAKRLL 207
Trr1Pb01    ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIGGGDSAAEEAMFLTKY GSKVTVLVR RDKLRASKTMAKRLL 203
Trr1Hc      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIGGGDSAAEEAMFLTKY GSKVTVLVR RDKLRASKTMAKRLL 168
Trr1Bd      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIGGGDSAAEEAMFLTKY GSKVTVLVR RDKLRASKTMAKRLL 240
Trr1Ci      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIGGGDSAAEEAMFLTKY GSSVTVLVR RDKLRASKTMAKRLL 203
Trr1Af      ACAVCDGAVPIFRNKPLYVIGGGDSAAEEAMFLAKY GSSVTVLVR RDKLRASKAMAKRLL 222
Trr1Ca      ACAVCDGAVPIFRNNPLAVIGGGDSACEEA IFLTKYASKVFLVLR RDVLRASTIMQKRVT 200
Trr1Cn      ACAVCDGAVPIFRQKPLAVIGGGDSAAEEATYLTKY GSHVYVLR RDDELRAKIMAKRLL 227
*****::*: * *****.*** :*:*:* * * :***:* ****. * .*:

Trr1Pb3      ANPKVEVKFNTVAVEVQGEPA PRGLMTHLKIKNVVS GGEEVVPANGLF YAVGHPATALV 228
Trr1Pb18    ANPKVEVKFNTVAVEVQGEPA PRGLMTHLKIKNVVS GGEEVVPANGLF YAVGHPATALV 267
Trr1Pb01    VMPKVEVKFNTVAVEVQGEPA PRGLVTHLKIKNVVS GVVEVVPANGLF YAVGHPATALV 263
Trr1Hc      ANPKVEVKFNTVALEVLGDPA PRGLMTHLKIKNVVS GAEEVVPANGLF YAVGHPATALV 228
Trr1Bd      ANPKVEVKFNTVALEVLGEPE PRGLMTHLKIKNVVS GMEEVVPANGLF YAVGHPATALV 300
Trr1Ci      NHPKVEVKFNTVAVEVQGEPP RGLMTHLKIKNVVTGN EEVVPANGLF YAVGHEPATGLI 263
Trr1Af      AHPKVTVRFNTVATEVLGEKKPNGLMTHLR IKNVTGEE EIVDANGLF YAVGHPATALV 282
Trr1Ca      NNEKIEVLWNTAEALAKGDGK---LLKSLR IVNNKT KKEKDLQVNGLF YAI GHPATKIF 257
Trr1Cn      SHPKVTVLWNTVATEAKGDGE---VLTSLT IKD TKTGKIRDL PVNGLF YAI GHPATALV 284
: * : * :*** * * . * : :. * * : : : .*****:* ** * * :

```

Figura 9. Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína Trr1. Pb3 (*P. brasiliensis* isolado 3), Pb18 (*P. brasiliensis* isolado 18), Pb01 (*P. lutzii* isolado 01), Hc (*H. capsulatum*), Bd (*B. dermatitidis*), Ci (*C. immitis*), Af (*A. fumigatus*), Ca (*C. albicans*) e Cn (*C. neoformans*). As posições com identidade completa são indicadas com um asterisco, dois pontos indicam substituições conservativas, e um ponto indica substituição semi-conservativa. Fonte: adaptado de Abadio *et al.*, (2011).

Além disso, foram identificadas moléculas inibidoras de Trr1 de *P. lutzii* (Abadio *et al.*, comunicação pessoal). Entretanto, essas moléculas não foram efetivas para o *C. neoformans*, ou seja, não foram capazes de inibir seu crescimento. Isso pode ser devido às pequenas diferenças nas sequências proteicas dos sítios de ligação, além da característica de seletividade espécie-específica do sistema tioredoxina. Portanto, um modelo de Trr1 de *C. neoformans* precisava ser obtido para buscar novas moléculas antifúngicas específicas que possam atuar no tratamento da Criptococose.

Na ausência de estruturas 3D resolvidas experimentalmente, métodos computacionais são utilizados para prever modelos tridimensionais de proteínas e fornecer informações sobre suas estruturas (Cavasotto e Phatak, 2009). A primeira etapa de modelagem por homologia

para a obtenção da estrutura teórica da proteína alvo é a identificação de estruturas tridimensionais que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da sequência-alvo. As estruturas homologas da proteína Trr1 com maior porcentagem de identidade de sequência primária e maior score são escolhidas. Três moldes foram selecionados (Anexo). Um de *S. cerevisiae* na conformação oxidada: 3ITJ (PDB ID) e dois de *E. coli* na conformação reduzida: 1CLO (PDB ID) e 1F6M (PDB ID). No molde 1CLO, a estrutura tridimensional deposita no PDB contém uma proteína na conformação reduzida, já no molde 1F6M a estrutura 3D da tioredoxina redutase está complexada a tioredoxina. A Trr1 de *Cryptococcus neoformans* apresentou identidade de sequência primária de 66,5%, 47,5% e 47,1% com as sequências das estruturas 3D escolhidas e depositadas no PDB: 3ITJ, 1CLO e 1F6M respectivamente, quando foi feito um alinhamento múltiplo utilizando o programa ClustalIW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (**Figura 10**).

```

Trr1_Cn                MSPIANGHPHGSSFCVREPKRTGEVSKKMHKSVVIGSGPGGHTAAIYLA 50
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  MGSSHHHHHHSSGLVPR-----GSHVHNKVTIIGSGPAAHTAAIYLA 42
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  -----GTTKHSKLLILGSGPAGYTAADVAA 25
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  -----GTTKHSKLLILGSGPAGYTAADVAA 25
.. *.: *.:*****.:***** *

Trr1_Cn                RANLEPVLYEGMLANGFAPGGQLTTTIDVENFPGFPEGVTGTETEMDKFRA 100
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  RAEIKPILYEGMMANGIAAGGQLTTTTEIENFPGFPDGLTGSELMDRMRE 92
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  RANLQPVLTIGMEK-----GGQLTTTTEVENWPGDPNDLTGPLLERMHE 70
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  RANLQPVLTIGMEK-----GGQLTTTTEVENWPGDPNDLTGPLLERMHE 70
*.:*.:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Trr1_Cn                QSERFGTKIITETVARVDLSVRPFKYWTEGEEEEHEFMTADTIILATGAS 150
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  QSTKFGTEIITETVSKVDLSSKPFKLWTEFN-EDAEPVTTDAIILATGAS 141
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  HATKFETEIIFDHINKVDLQNRPFRLNGDNG-----EYTCDALIATGAS 115
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  HATKFETEIIFDHINKVDLQNRPFRLNGDNG-----EYTCDALIATGAS 115
.: * * * * * : : * * * . : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Trr1_Cn                AKRFLPGEETYWQSGISACAVCDGAVPIFRQKPLAVIGGGDSAAEEATY 200
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  AKRMHLDPGEETYWQKGISACAVCDGAVPIFRNKPLAVIGGGDSACEEAQF 191
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  ARYLGLPSEEAFFKGRGVSACATCDG--FFYRNQKVAVIGGGNTAVEEALY 163
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  ARYLGLPSEEAFFKGRGVSASATCDG--FFYRNQKVAVIGGGNTAVEEALY 163
*.: * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Trr1_Cn                LTKYGSHVYVLRDELRAKIMAKRLT---SHPKVTVLWNTVATEAKGD 247
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LTKYGSKFVFLVRKDHLEASTIMQKRAE---KNEKIEILYNTVALEAKGD 238
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LSNIASEVHLIHRRDGFRAEKILIKRLMDKVENGNIIILHTNRTLEEVTD 213
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LSNIASEVHLIHRRDGFRAEKILIKRLMDKVENGNIIILHTNRTLEEVTD 213
*.: * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Trr1_Cn                GEVLTSLTIKNTKTGE-TGDLVPVNGLFYAIGHEPATSLVKSQVELDSDGY 296
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  GKLLNALRIKNTKNE-ETDLPVSGLFYAIGHTPATKIVAGQVDTDEAGY 287
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  QMGVTGVRRLRDTQNSDNIESLDVAGLFVAIGHSPNTAIFEGQLELEN-GY 262
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  QMGVTGVRRLRDTQNSDNIESLDVAGLFVAIGHSPNTAIFEGQLELEN-GY 262
.: : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Trr1_Cn                IKTVPGTS----QTSVHGVAAGDVQDKKYRQAITSAGSGCIAALEAERL 342
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  IKTVPGSS----LTSVPGFFAAGDVQDSKYRQAITSAGSGCMAALDAEKY 333
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  IKVQSGIHGNATQTSIPGVFAAGDVMMDHIYRQAITSAGTGCMAALDAERY 312
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  IKVQSGIHGNATQTSIPGVFAAGDVMMDHIYRQAITSAGTGCMAALDAERY 312
*.: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Trr1_Cn                ISEEEADDES�QTEDVHVPAEHYLGTIDKE 371
3ITJ_D | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LTSLE----- 338
1CLO_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LDGLADAK----- 320
1F6M_E | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  LDGLADAK----- 320
:

```

Figura 10. Alinhamento múltiplo realizado entre as sequências da proteína Trr1 de *C. neoformans* e as estruturas molde 3ITJ, 1CLO e 1F6M depositadas no PDB. As posições com identidade completa são indicadas com um asterisco, dois pontos indicam substituições conservativas, e um ponto indica substituição semi-conservativa.

2. JUSTIFICATIVA

A infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm aumentado ao longo das últimas duas décadas. As ferramentas de diagnóstico foram melhoradas, mas o número de pacientes imunossuprimidos aumenta dramaticamente. Algumas drogas estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas ou superficiais, mas existe apenas um número limitado de drogas antifúngicas viáveis, muitas delas com efeitos secundários indesejáveis. Embora a terapia antirretroviral contribua com uma diminuição significativa na incidência de criptococose em países desenvolvidos, agentes antifúngicos convencionais são tóxicos, apresentam baixa atividade antifúngica sendo menos eficazes. Além disso, a resistência destes fungos representa uma limitação nas atuais terapias, demonstrando uma necessidade urgente de uma nova geração de agentes antifúngicos mais específicos, que ofereçam um tratamento seguro contra as micoses sistêmicas. Atualmente, a pesquisa e o desenvolvimento de drogas são abrangentes, dispendiosos, consomem muito tempo e apresentam altos riscos; porém, o planejamento baseado em estruturas tem se mostrado uma estratégia eficiente para o desenvolvimento de novos fármacos. Recentemente, nosso grupo identificou genes ortólogos, por genômica comparativa, presentes em fungos patogênicos humanos de relevância mundial e ausentes no genoma humano. A partir desta análise, foram selecionados quatro genes candidatos como alvos antifúngicos (entre eles *TRR1*). Por varredura virtual, foram identificadas pequenas moléculas (*small molecules*) inibidoras utilizando a sequência do gene *TRR1* de *P. lutzii*. Estas moléculas foram testadas contra *P. lutzii* e outros fungos, incluindo *C. neoformans*. Os resultados dos testes *in vitro* destes potenciais inibidores contra estes fungos patogênicos humanos têm sido promissores especialmente nas espécies do gênero *Paracoccidioides* spp. Entretanto, nenhuma das 11 moléculas testadas foi capaz de bloquear o crescimento do patógeno *C. neoformans*. No contexto dessa proposta, está dissertação de mestrado encontra-se centrada na caracterização do alvo Trr1 e seu substrato Trx1, e na obtenção de possíveis moléculas candidatas que inibam a atividade da proteína Trr1, especificamente na viabilidade do fungo patogênico *C. neoformans* utilizando as metodologias de modelagem molecular e varredura virtual (Anexo). Adicionalmente, é relevante a busca de novos alvos antifúngicos já que o arsenal disponível no momento está focado na inibição da síntese e desorganização do ergosterol presente na membrana celular dos fungos, estrutura muito semelhante às células animais; e as drogas colocadas no mercado que atuam sobre a parede celular, apesar de serem menos tóxicas, apresentam limitações quanto ao espectro de ação. A escolha da enzima Trr1 e seu substrato Trx1 para expressão e purificação em *C. neoformans* se deve ao fato de o gene ser exclusivo de fungos e ser um

gene essencial para o fungo *C. neoformans*. Dessa forma, este estudo possibilitou o início do projeto de desenvolvimento de novas drogas antifúngicas para o *C. neoformans*, pois permitiu a expressão e purificação da proteína recombinante, e sua caracterização enzimática para posteriores estudos de estrutura 3D desta enzima. Em paralelo, o trabalho em colaboração com a Dra. Erika Kioshima e Dr. Bernard Maigret permitiu a identificação de moléculas pequenas potencialmente inibidoras da Trr1 de *C. neoformans* na busca de potenciais antifúngicos eficazes no tratamento de micoses.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Gerar informações básicas de estrutura-função da proteína-alvo Tio redoxina redutase (Trr1) visando desenvolver novas drogas para o tratamento de infecções fúngicas de relevância mundial.

3.2 Objetivos específicos

Parte I:

- Realizar a expressão heteróloga dos genes *TRR1* e *TRX1* de *C. neoformans*.
- Purificar as proteínas recombinantes Trr1 e Trx1.
- Realizar os ensaios enzimáticos do sistema tio redoxina e validar a atividade enzimática da proteína recombinante Trr1.
- Estabelecer as condições iniciais para obtenção de cristais das proteínas recombinantes purificadas, Trr1 e Trx1 de *C. neoformans*.
- Realizar ensaios *in vitro* dos inibidores selecionados, utilizando a proteína Trr1 recombinante (teste inicial).

Parte II: realizado em colaboração.

- Realizar a modelagem molecular da proteína alvo Trr1 de *C. neoformans*, em colaboração com o grupo do LORIA – França (Dr. Bernard Maigret) (Anexo).
- Selecionar moléculas potencialmente inibidoras de Trr1, por varredura virtual de quimiotecas (*docking*), em colaboração com o grupo do LORIA – França (Dr. Bernard Maigret) (Anexo).

4. MATERIAIS

Tabela 3. Linhagens de *E. coli* para clonagem e expressão das proteínas recombinantes.

Linhagens	Genótipo
DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> .M15 .(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-,mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -
BL21(DE3)	B F – <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B</i> – <i>m_B</i> –) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21(DE3)pLysE	B F – <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B</i> – <i>m_B</i> –) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysE (Cm ^R)

Fonte: elaborada pela autora.

4.1 Reagentes

Os reagentes (qualidade P.A.), kits e anticorpos utilizados foram adquiridos da Merck (S/A), Synth, Amersham Biosciences, Sigma Chemical Co. Os meios de cultivo foram adquiridos da DifcoTM e Sigma. Enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (New England BioLabs, EUA).

4.2 Meios de cultura

- **Meio LB (Luria-Bertani):** 1% de peptona de caseína (p/v), 0,5% extrato de levedura (p/v) e 1% de NaCl (p/v).
- **Meio LB Amp:** meio LB acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina. As soluções de antibióticos foram adicionadas em meio com ágar antes de solidificar (temperatura inferior a 40 °C).
- **Meio LB Amp/Cam:** meio LB acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina e 20 μ g/mL de cloranfenicol. As soluções de antibióticos foram adicionadas em meio com ágar antes de solidificar (temperatura inferior a 40 °C).
- **Meio 4YT:** 3,2% de peptona de caseína (p/v), 2,0% extrato de levedura (p/v) e 0,5% de NaCl (p/v).

Os meios foram preparados com água bidestilada, pH 7,2 e esterilizados por autoclavagem a 120 °C por 15 min. Aos meios sólidos foram adicionados 1,5% de ágar.

4.3 Antibióticos para seleção das células transformadas

- **Solução estoque de Ampicilina (100 mg/mL):** Ampicilina sódica foi dissolvida em água bidestilada, esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,2 µm e armazenada a -20 °C. Concentração final de uso: 100 µg/mL.
- **Solução estoque de Cloranfenicol (20 mg/mL):** Cloranfenicol foi dissolvido em etanol, esterilizado por filtração em membrana Millipore 0,2 µm e armazenado a -20 °C. Concentração final de uso: 20 µg/mL.

4.4 Meios com glicose

- **Solução estoque de glicose 40% (p/v):** Solução de D-glicose em água bidestilada, estéril. Armazenada à 4 °C. Concentração final de uso: 0,5%.

4.5 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

As soluções aqui descritas foram preparadas com água bidestilada ou com padrão *Milli-Q* e com reagentes de padrão analítico.

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE:** Tris-HCl 62 mM, pH 8,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptoetanol 50 mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol.
- **Solução estoque de acrilamida/bis 30% para gel de proteína:** 30% de acrilamida, 0,8% de bis-acrilamida e água bidestilada 100 mL q.s.p.
- Tampão para gel de proteína (separação): Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8.
- Tampão para gel de proteína (concentrador): Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 0,4%.
- Solução de SDS 12%: 12% de SDS (p/v).
- **Tampão de corrida para SDS-PAGE:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,3, e 0,1% de SDS (p/v).
- **Tampão de transferência:** Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol (v/v).

4.6 Soluções para coloração/descoloração de gel de poliacrilamida com *Coomassie Blue*

- **Corante:** 40% de metanol (v/v), 10% de ácido acético glacial (v/v) e 0,25% de “Coomassie Blue R250” (p/v).
- **Descorante:** 40% de metanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v).

4.7 Soluções para o *western-blot*

- **Solução estoque de tampão fosfato-salina (PBS):** NaCl 2,7378 M, KCl 0,053 M, Na₂HPO₄ 0,1301 M e K₂HPO₄ 0,0229 M. A solução estoque foi diluída 20 vezes para o uso (PBS 1X).
- **PBS-Tween:** 0,05% de Tween-20 (v/v) em PBS 1X concentrado.

4.8 Componentes dos ensaios de atividade enzimática da Tioredoxina redutase

- **Trr1** (Tioredoxina redutase recombinante de *C. neoformans*).
- **Trx1** (Tioredoxina recombinante de *C. neoformans*).
- **DTNB** (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico).
- **NADPH** (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-reduzido).
- **BSA** (Albumina de soro bovino).
- **EDTA** (Ácido etilenodiamino tetra-acético).

4.9 Levedura para o teste de suscetibilidade a antifúngicos

- *Cryptococcus neoformans* (H99).

4.10 Meios de cultura, soluções e solvente usados no teste de suscetibilidade a antifúngicos

- **Meio RPMI:** RPMI-1640 sem bicarbonato, com L-glutamina, suplementado com 2% de glicose e tamponado (pH 7.0) com 0,165M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich).
- **Meio YPD:** (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) ágar (Yeast Peptone Dextrose; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD).
- **Solução salina:** Cloreto de sódio 0,85%.
- **DMSO** (Dimetilsulfóxido).

4.11 Drogas utilizadas no teste de suscetibilidade antifúngica

- **Candidato A** (*Life Chemicals*).
- **Candidato B** (*Life Chemicals*).

- **Candidato C** (*Life Chemicals*).
- **Fluconazol** (Sigma-Aldrich).
- **Anfotericina B** (Sigma-Aldrich).

4.12 Componentes para cristalização das proteínas recombinantes

Kit Crystal Screen I e II (Hampton Research).

5. MÉTODOS

5.1 Síntese química dos genes *TRR1* e *TRX1* para expressão heteróloga

Com a finalidade de otimizar o processo de expressão heteróloga das proteínas, o gene alvo *TRR1* e o seu substrato *TRX1* de *C. neoformans* (H99) foram sintetizados quimicamente pela empresa Epoch Biolabs. O Laboratório de Biologia Molecular da UnB tem utilizado a síntese química de genes para a realização de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Os genes foram desenhados com sítios de restrição nas extremidades para as enzimas *NdeI* e *XhoI* e, selecionados os códons preferenciais (*codon usage*) para *E. coli* com o objetivo de reduzir os baixos níveis de expressão. O gene foi clonado no vetor de expressão bacteriano pET21a (Novagen) sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase. A **Figura 11** mostra a sequência otimizada dos genes sintetizados.

A.

> Gene *TRR1* de *C. neoformans* otimizado para expressão em *E. coli*.

```

CATATGTCTCCCATCGCCAACGGCCATCCCCACGGCAGCTCTTTCGGCGTCAGGGAACCCAAGAGAACC GGCGAGGTAAGC
AAGAAGATGCACTCCAAGGTTGTTATCATCGGCTCTGGTCCC GGTTGGTCACACCGCCGCCATCTACTTGGCCCGAGCCAAC
CTCGAGCCTGTCTCTACGAGGGTATGCTTGCCAACGGTTTTCGCCCCTGGCGGTCAACTCACCACCACTACTGACGTCGAG
AACTTCCCTGGTTTTCCCCGAAGGCGTTACCGGTACCGAAATGATGGATAAGTTCGGAGCTCAGAGTGAGCGATTTCGGCACC
AAGATCATCACCAGACTGTTGCGCGTGTGACCTCTCTGTCCGACCTTCAAGTACTGGACTGAGGGTGAGGAGGAGGAA
CACGAGTTCATGACCGCCGATACTATCATCCTGGCTACCGGTGCTTCTGCCAAGCGACTTTTCCTTCCTGGTGAGGAGACC
TATTGGCAGICTGGIATCTCTGCCTGTGCCGTTTGCAGCGGTGCCGTCCCCATCTTCAGGCAAAAAGCCCTTGCCGTTATT
GGTGGTGGTGACAGTGCTGCCGAGGAAGCTACTTACCTCACC AAGTACGGTTCTCACGTTTACGTCCTCGTCAGAAGAGAC
GAGCTCCGAGCTTCCAAGATTATGGCTAAGCGACTCACTTCTCACC CCAAGGTTACCGTCCTTTGGAACACTGTTGCTACT
GAGGCCAAGGGTGACGGTGAAGTCTCACATCACTTACCATCAAGAACACCAAGACTGGTGAGACCGGAGACCTCCCCGTC
AACGGTCTTTTCTATGCTATCGGCCACGAGCCCGCCACTTCCCTCGTCAAGTCTCAAGTCGAGCTTGACAGCGATGGATAC
ATCAAGACTGTTCCC GGTTACCTCCAGACTTCTGTCCATGGTGTCTTCGCCCGCGGTGACGTACAGGACAAGAAGTACAGG
CAGGCTATCACATCTGCTGGTTCCGGTTGTATTGCTGCCCTTGAGGCTGAAAGGCTTATCAGCGAGGAGGAGGCTGATGAC
GAGAGCCTCCAGACCGAAGATGTGCATGTCCCTGCCGAGCACTACTTGGGCACTGACAAGGAGTAACTCGAG

```

B.

> Gene *TRX1* de *C. neoformans* otimizado para expressão em *E. coli*

```
CATATGGTCAAGGCTATTGAATCTTACGACGAGTGGGAAGACTCTCACTTCTGGCTCCGATGTTGTCTGTCGTCGACTACTGG
GCGACTTGGTGC GGTCCTTGCAAGATGATCTCTCCCATTTTGCCAAGCTTGAGGGCAAGTTCCTCAATGTC AAGTTTGCT
AAGGTCGATGTTGAGGAGCAAGAGGACATTGCCAAGGAGGCTCAAATCAAGGCCATGCCTACTTTTGTGCGCTACAAAGAC
GGCAAGGTGATCGAGACTGTTACCGGCGCTGTCCCGCAAAGATCAATGCTTTGCTCGACAAGGTTGCTGCTTAACTCGAG
```

Figura 11. Sequências de nucleotídeos dos genes *TRR1* (A) e *TRX1* (B) de *C. neoformans* otimizadas para expressão heteróloga em *E. coli*. Os nucleotídeos em vermelho representam os sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* (CAT) e *XhoI* (CTCGAG).

5.2 Expressão heteróloga dos genes selecionados

5.2.1 Vetor plasmídial - *pET21a*

Vários vetores comerciais encontram-se disponíveis para a expressão de genes em *E. coli*. Um dos mais importantes sistemas de expressão são aqueles pertencentes à série pET (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*, Novagen). Os genes alvo são clonados nos plasmídeos pET sob o controle transcricional do bacteriófago T7 e a expressão é induzida pela T7 RNA polimerase da célula hospedeira.

Os vetores da série pET são plasmídeos desenhados para permitir a rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse. Contêm vários elementos importantes: o gene *lacI* que codifica a proteína repressora *lac*; o promotor T7 que é altamente específico para T7 RNA polimerase (e não para RNA polimerase de bactérias) e que não aparece em genoma de procariotos; um operador *lac* que serve para bloquear a transcrição; um sítio de policlonagem; uma origem *f1* de replicação; e um gene de resistência a um determinado antibiótico (**Figura 12**).

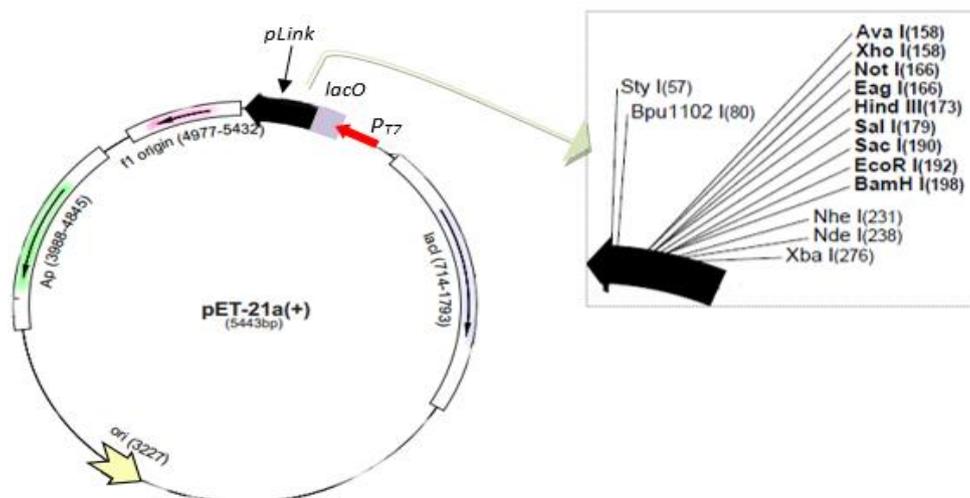


Figura 12. Esquema do vetor da série pET. O plasmídeo contém a região marcadora para resistência à ampicilina (verde), o gene *lac I* (azul), o promotor de transcrição T7 (vermelho), a região do operador lac (roxa) e um sítio de policonagem (pLink) em preto. Fonte: www.novagen.com, com modificações.

5.2.2 Cepas de *E. coli*

Dentre os vários sistemas de expressão disponíveis para produção de proteínas heterólogas, a bactéria *E. coli* é muito utilizada devido a sua capacidade de crescer rapidamente com altas concentrações celulares e em substratos baratos, além de sua genética ser bem conhecida e ter disponibilidade de vetores e cepas mutantes (Demain e Vaishnav, 2009). Duas cepas de *E. coli* foram usadas no desenvolvimento deste trabalho, dependendo da finalidade da construção. A cepa **DH5α** foi usada para a clonagem e amplificação dos plasmídeos. As cepas **BL21(DE3)** e **BL21(DE3)pLysE** foram utilizadas para a produção das proteínas recombinantes pela indução com IPTG.

Quando a T7 RNA polimerase está presente, e o operador *lac* não está sendo reprimido, a transcrição do gene de interesse procede rapidamente. Neste trabalho as células utilizadas como hospedeiras para o plasmídeo pET21a foram *E. coli* BL21(DE3), com lisogene DE3 que contém o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lacUV5*, o qual requer IPTG para induzir a expressão, e *E. coli* BL21(DE3)pLysE, que provê uma estabilidade adicional ao expressar os genes alvo em cepas hospedeiras contendo um plasmídeo compatível de resistência ao cloranfenicol que produz uma pequena quantidade de lisozima T7 para reduzir o nível da expressão basal do gene de interesse (**Figura 13**).

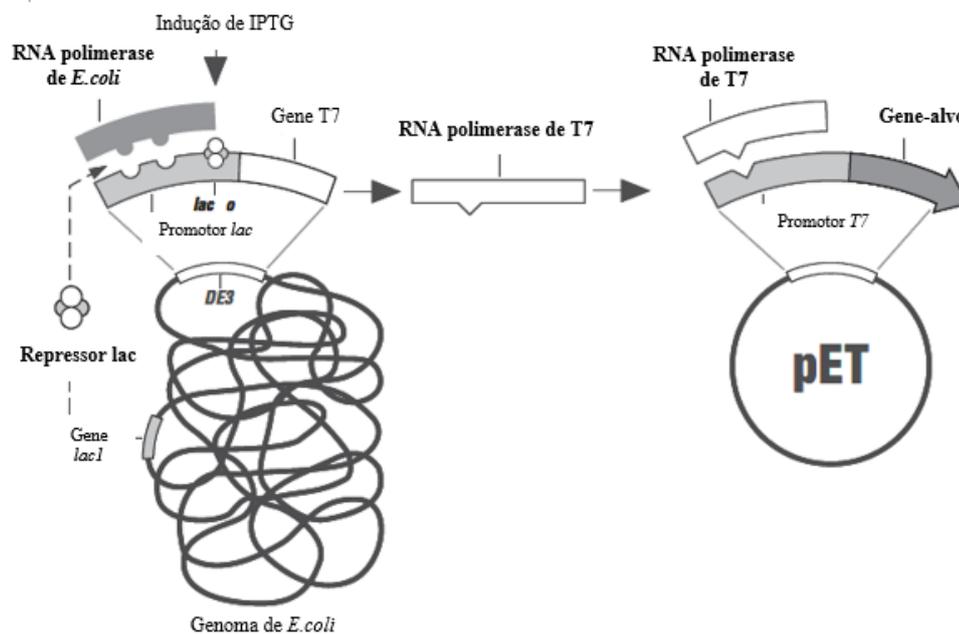


Figura 13. Esquema da indução da expressão gênica no vetor pET por IPTG. A T7 RNA polimerase está sob controle do operon lac. O gene de interesse está sob regulação do promotor do fago T7. (Fonte: www.novagen.com).

A T7 RNA polimerase é tão ativa e seletiva que quase toda a maquinaria da bactéria é convertida para a expressão do gene de interesse. Este sistema mantém os genes transcricionalmente silenciados no período anterior à indução, permitindo o crescimento bacteriano, já que, muitas vezes, a proteína de interesse é tóxica para a célula dificultando ou impedindo o metabolismo celular normal (Jonasson *et al.*, 2002).

5.2.3 Células bacterianas competentes por choque térmico

Uma colônia isolada de *E. coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB (1% de peptona de caseína (p/v), 0,5% extrato de levedura (p/v), 1% de NaCl (p/v) e 1,5% de ágar, pH 7,2) em tubo cônico (Falcon) de 15 mL e incubada por 16 h, a 37 °C, 200-250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). Foi adicionado 0,3% desta cultura a 30 mL de meio LB, em um frasco *Erlemmeyer* de 250 mL previamente estéril e colocada a 37°C, 200-250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). Após atingir a densidade ótica de 0,3 (600 nm), as células foram coletadas em um tubo de 50 mL gelado e mantidas no gelo por 15 minutos. As células foram então centrifugadas por 10 min a 4 °C, 5000 xg. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspensão em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e em seguida, mantido em gelo por 15 min. As células foram centrifugadas novamente por 10 min a 4 °C, 5000 xg. O

sobrenadante foi novamente removido e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de CaCl₂ 100 mM com glicerol 15%. As células foram coletadas em alíquotas de 100 µL, congeladas e estocadas a -80 °C.

5.2.4 Transformação de *E. coli* por choque térmico

Esta técnica foi descrita por Sambrook e cols (2001). À cepa termocompetente (DH5α) foram adicionados 25 ng do sistema de ligação (vetor pET21a::inserto). Os sistemas de transformação foram mantidos no gelo durante 30 min e, posteriormente, foram incubados 90 sec, a 42°C (choque térmico), e mantidos no gelo por 10 min. A seguir foi adicionado 1 mL de meio LB e incubado por 1 h, a 37 °C, invertendo os tubos a cada 15 min. Foram plaqueados 20 µL e 50 µL de células transformadas em meio LB ágar acrescido de antibiótico (Amp). Para garantir a obtenção de clones transformados, o volume restante foi centrifugado a 13.000 xg, por 2 min e descartado 800 µL do sobrenadante. As células foram ressuspensas e 20 µL foram plaqueados em meio LB ágar. As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C (Sambrook, J. e Russell, 2001).

5.2.5 Extração de DNA plasmidial e verificação da presença dos sítios de restrição e do inserto

As colônias que cresceram na placa foram selecionadas e, com auxílio de um palito de dente estéril, foram inoculadas em 5 ml de meio LB (Sambrook, Joseph, 1989) com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C sob agitação de 240 RPM por aproximadamente 16 h. a extração plasmidial foi feita utilizando-se o kit comercial *Plasmid Miniprep Kit* (Invitogen), conforme instruções do fabricante. Ao final, o DNA foi eluído em 50 µL de água desmineralizada estéril. O DNA obtido foi quantificado no “*GeneQuantTMpro*” (GE healthcare). Para a confirmação dos clones, os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão. A digestão foi realizada para confirmar a presença do gene no plasmídeo e para confirmar a ligação do inserto de maneira correta. Para isto foram selecionadas as enzimas de restrição de maneira que uma fosse capaz de digerir o gene e outra de dirigir o vetor, formando dois fragmentos identificáveis em eletroforese de gel de agarose.

Para a digestão foram utilizadas as enzimas *NdeI* e *XhoI* (Invitrogen), pois o vetor pET21a possui esses sítios de restrição nas regiões flanqueadoras do inserto. A digestão utilizando *NdeI* foi realizada para um volume final de 20 µL, sendo 8 µL de DNA (~200 ng), 2 µL de

NEB4 (10X) (New England BioLabs), 2 μL de enzima (10 U/ μL) e 8 μL de água *milli-Q* para completar o volume. Para a digestão com *XhoI*: 8 μL de DNA (~ 200 ng), 2 μL de NEB4 (10X), 2 μL de enzima (10 U/ μL), 0,2 μL de BSA (100X) e 7.8 μL de água *milli-Q* para completar o volume final de 20 μL . As reações de digestão com as duas enzimas foram realizadas utilizando 16 μL de DNA (1 μg), 2 μL da enzima *NdeI*, 2 μL da enzima *XhoI*, 0,4 μL de BSA 100X, 4 μL de tampão NEB4 (10X), e 15,6 μL de água *milli-Q* para completar o volume final de 40 μL . As digestões permaneceram em banho a 37 °C por 4 h. A liberação do inserto foi analisada em gel de agarose 1%, com brometo de etídeo (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando TAE 1X (TAE 50X para 1 L, 242 g Trizma Base, 18,6 g sal sódico de ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 8,0 a uma voltagem de 70 V por 1 h. Foi utilizando o marcador *1Kb Plus DNA Ladder* (invitrogen) e visualizado em radiação UV.

5.2.6 Indução da expressão das proteínas *Trr1* e *Trx1* recombinantes

Para realizar a indução da expressão heteróloga das proteína recombinantes *Trr1* e *Trx1* foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysE respectivamente. Inicialmente, foram preparadas células termocompetentes e realizada a transformação por choque térmico para inserção do vetor (Sambrook *et al.*, 2001). A cepa *E. coli* BL21(DE3) transformada foi semeada em placas contendo LB ágar e ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e a cepa BL21(DE3)pLysE transformada foi semeada em placas contendo LB ágar, ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e cloranfenicol 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma indução em pequena escala foi realizada para verificar a capacidade da cepa de *E. coli* expressar as proteína desejadas. Foram escolhidos aleatoriamente três clones transformantes e cada um foi inoculado em 5 mL de meio LB como respectivo antibiótico. Os inóculos cresceram por aproximadamente 16 h a 37 °C, 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). Foram inoculados 1,25 mL do pre-inoculo em 25 mL de meio LB contendo devido antibiótico e suplementação com glicose. Os inóculos foram incubados por aproximadamente 60 min. a 37 °C, 250 RPM, até atingir uma densidade ótica de 0,6 a 600 nm. Em seguida, foram coletados 2 mL das culturas (tempo 0), controle negativo, e adicionado riboflavina 0,1 mM. Para a indução de expressão foi adicionado ao meio IPTG variando as concentrações (0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM), e retornou-se a incubação por aproximadamente 16 h a 20 °C, 250 RPM. Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 2, 4, 6 e 16 h de incubação. As amostras retiradas nos respectivos tempos foram centrifugadas por 2 minutos, 13.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 50 μL de tampão de amostra TEB 2X. O material de indução restante, foi centrifugado por 20 min, a 4

°C, o precipitado com a bactéria foi guardado no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado. Os clones desta cepa foram confirmados e a partir deles foi preparado um lote de trabalho, estocado em glicerol 50%. Os estoques foram armazenados a -80 °C. Um esquema geral dos procedimentos realizados para fazer a expressão das proteínas heterólogas é mostrado na **Figura 14**.

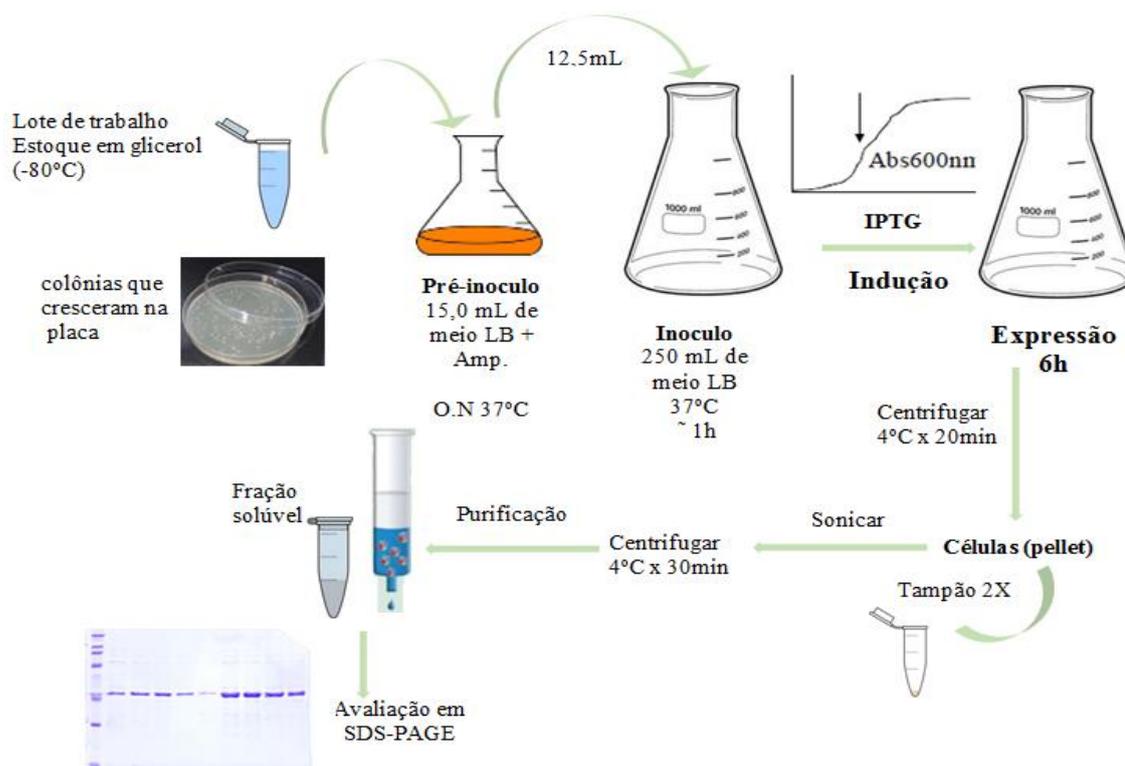


Figura 14. Esquema geral de expressão e purificação das proteínas recombinantes.

5.2.7 Meios contendo glicose

Ao meio de cultura para a expressão heteróloga da proteína Trr1 recombinante foi adicionado 5% de glicose para as induções em pequena escala e em grande escala.

5.2.8 Análise da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%)

As proteínas recombinantes foram analisadas em gel de poliacrilamida contendo SDS segundo Sambrook e cols. (1986), com modificações. Inicialmente, preparou-se a solução de gel separador 12%, sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% de persulfato de amônio e 0,075% de TEMED. A solução de poliacrilamida foi vertida com auxílio de micropipeta entre os conjuntos de placas de vidro, já devidamente montados no aparato de

eletroforese, conforme as especificações do fabricante do sistema de minigéis (BIO-RAD), e cobertas com água *Milli-Q*. A solução de gel concentrador 4% foi preparada, sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,12% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED. Em seguida, a solução de gel concentrador foi vertida sobre o gel separador, após remoção da água *Milli-Q* com papel absorvente. Foram colocados pentes para permitir a formação dos poços. Após a completa polimerização, o sistema de géis foi acoplado a cuba apropriada. As amostras foram fervidas por 5 min e 10 μ L de cada uma delas e os marcadores de massa molecular foram aplicados no gel de poli(acrilamida). As condições de corrida foram de 100 V até a entrada das amostras nos géis separadores e de 120 V até o final da corrida eletroforética em tampão Tris-glicina. Terminada a eletroforese, o gel foi corado para visualização da proteína, ou transferido para membrana para procedimentos de western-blot.

5.2.9 Coloração e visualização do gel

Ao final da corrida eletroforética um dos géis foi corado com *Coomassie Blue* para a visualização do perfil proteico, por 1 hora, sob agitação. Em seguida, procedeu-se à descoloração do gel de poli(acrilamida) com solução descorante. O perfil proteico foi imediatamente analisado em transiluminador de luz branca, em seguida escaneado para documentação.

5.2.10 Western-blot

Para comprovar a eficiência da purificação, foi realizado um *western-blot*, utilizando o anticorpo monoclonal polyHis conjugado com fosfatase alcalina. Este mostrou que a proteína está realmente presente, já que o tamanho da banda confere com a banda purificada. O gel foi incubado por 30 min em solução de transferência e a partir da utilização do equipamento *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BIO-RAD) foi feita a transferência da proteína para a membrana de nitrocelulose, conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante da membrana (Amersham Pharmacia Biotech). O sistema de transferência foi formado por um papel de filtro, sob os quais se colocou a membrana de nitrocelulose, o gel de poli(acrilamida) e outro papel de filtro, sendo todos previamente embebidos em tampão de transferência. Posteriormente, foram removidas todas as bolhas, pressionando com um tubo de ensaio sobre os papéis e gel. Este sistema foi montado entre dois eletrodos e submetido a uma corrente elétrica de 15 V durante 15 min. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado comercial (5%) em PBST 1X por 1 h a temperatura

ambiente, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 1X por 5 min e, então, incubada durante 3 horas a temperatura ambiente, sob leve agitação, com o anticorpo monoclonal anti-polyHis conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:1000 em solução PBS. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes de 5 min com PBST 1X. Em seguida, a membrana foi imersa em solução APB e submetida ao tratamento com a solução reveladora de *western-blot* (NBT e BCIP) até o aparecimento das bandas. A membrana foi finalmente lavada com água destilada, seca a temperatura ambiente e fotografada.

5.3 Purificação das proteínas Trr1 e Trx1 recombinantes por cromatografia de afinidade

A construção gênica foi conduzida de modo a adicionar uma cauda de seis histidinas (His-Tag) às sequências proteicas tendo em vista proceder à purificação em colunas de cromatografia de afinidade. A cauda de histidina, confere à enzima, e pH apropriado, afinidade por íons bivalentes carregados positivamente. A resina utilizada nesta etapa possui como matriz (conjunto ligante-polímero) íons de níquel ligados a agarose. Após a indução da expressão dos genes *TRR1* e *TRX1*, o material de indução foi centrifugado por 20 min, 4 °C, 8.000 xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensado em 8 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM). As células bacterianas foram rompidas utilizando o aparelho *Vibra Cell* (Sonics). Foi utilizada uma amplitude de 60%, aplicando 10 pulsos de 10 sec com intervalos de 1 min. Durante a sonicação as amostras foram mantidas sempre no gelo. Após a sonicação, o extrato foi centrifugado por 30 min. a 4 °C, 8.000 xg. O sobrenadante, contendo a proteína solúvel expressa, foi separado para realizar a purificação em coluna contendo a resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare). Antes de iniciar a purificação da proteína recombinante em coluna contendo 1 mL de resina, foi preparada a resina *Ni Sepharose Fast Flow* de cromatografia de afinidade por meio de três lavagens com 10 mL de água destilada. Durante a purificação a fração *flow-through* foi coletada. Em seguida, foram realizadas três lavagens (contendo imidazol 40 mM), com 4 mL de solução de lavagem. Posteriormente, foi realizada a etapa de eluição da proteína, onde foram realizadas cinco eluições com 1 mL de solução de eluição (contendo imidazol 250 mM). A concentração de proteína foi determinada a partir da curva de calibração de BSA utilizando a metodologia de Bradford (Bradford, 1976). Para a dosagem da proteína foram utilizados 1 mL da solução de Bradford com 20 µL da amostra purificada, e a leitura feita a

A595 nm. Todas as proteínas foram produzidas na forma solúvel e a pureza das amostras foi verificada por SDS-PAGE 12%.

5.4 Determinação da concentração das proteínas

Para a quantificação das proteínas recombinantes utilizamos duas técnicas. A primeira consiste na utilização de reagente Bradford. É um método colorimétrico medido baseado no comprimento de onda 595 nm utilizando uma curva de calibração com BSA (Cf BSA x Abs). O segundo método baseia-se na leitura de absorvância direta da proteína e do coeficiente de extinção para a predição da massa molecular da proteína. A concentração foi determinada por espectrometria a 280 nm. A concentração das proteínas foi obtida pela equação de Beer-Lambert (equação 1).

$$A = \epsilon \times l \times C \text{ (equação 1)}$$

Onde, A é a leitura de absorvância; ϵ é o coeficiente de extensão molar; l é o comprimento do caminho ótico em centímetros; C é a concentração em mol/L. A concentração molar determinada foi multiplicada pelo fator de diluição. O valor encontrado de ϵ a 280 nm para Trr1 foi $33015 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com um peso molecular de 39868.7; e para Trx1 o valor de ϵ a 280 nm foi $21095 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com um peso molecular de 11451.2; esses dados foram determinados a partir da sequência de aminoácidos das proteínas pelo programa ExPaSy e a ferramenta *Protparam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Em ambos os protocolos de medição, as proteínas foram quantificadas em triplicata a $\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.5 Ensaio enzimático da atividade de Trr1 recombinante

Os estudos cinéticos foram realizados com a enzima tioredoxina redutase (Trr1) recombinante de *C. neoformans*. Como substrato dessa enzima, foi utilizada a tioredoxina (Trx1) recombinante do mesmo fungo. Para a determinação dos parâmetros cinéticos, os ensaios de atividade da tioredoxina redutase foram realizados através de um ensaio colorimétrico que monitora sua atividade sobre os substratos, a Trx1 e o NADPH. O ensaio baseia-se na redução do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) gerando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que produz uma coloração amarela medida a $A_{412 \text{ nm}}$ (Arner e Holmgren, 2000).

O experimento foi realizado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu). A reação foi iniciada pela adição de tioredoxina redutase $0,1 \text{ } \mu\text{M}$, o substrato Trx1 em concentrações

variadas de 0,5 a 15 μM e NADPH 0,2 mM a uma solução contendo tampão de fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, DTNB 3 mM, BSA 0,1 mg/mL e EDTA 1 mM para um volume final de 1 mL. O aumento da $A_{412\text{ nm}}$ foi monitorado nos 300 sec iniciais. Os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m foram determinados a partir da equação de Michaelis- Menten, traçando o gráfico dos duplos recíprocos de Lineweaver-Burk (inverso da velocidade inicial x inverso da concentração do substrato) e usando o programa GraphPad Prism. A atividade da enzima Trx1 foi medida em todos os ensaios subtraindo as velocidades das reações do controle (sem Trx1), e três experimentos independentes foram realizados para cada concentração de Trx1.

5.6 Cristalização das proteínas recombinantes

Para a realização do experimento de cristalização as proteínas recombinantes Trx1 e Trx2 foram dialisadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,5 e NaCl 0,03 M. Posteriormente foram ajustadas para uma concentração maior ou igual a 10 mg/mL usando o *Ultra-Amicon* concentrador de 30 kDa e 5 kDa (Millipore) e o concentrador *Vivaspin* para as amostras com volumes pequenos e finalmente foram congeladas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. No início dos ensaios para obtenção de cristais, as proteínas foram mantidas em banho de gelo e depois centrifugadas por 5 min a 13000 xg.

Foi utilizado o método de difusão de vapor em gota sentada (*sitting drop*), e foram testadas inicialmente soluções disponíveis na forma de kits comerciais, contendo uma combinação de diferentes agentes precipitantes em concentrações variadas e em diferentes pH. Os experimentos de cristalização foram determinados em sala com controle de temperatura a 20°C . A confirmação de que os cristais eram de proteína foi feita com o corante *Izit* da Hampton Research. A partir do refinamento das condições será possível encontrar uma solução ideal para a cristalização de cada proteína.

5.7 Testes de suscetibilidade aos antifúngicos

Para avaliar o perfil de susceptibilidade dos fungos patogênicos aos antifúngicos, foi realizado o teste de microdiluição em caldo, segundo o método proposto pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005*), de acordo com o protocolo M27-A2 (antigo NCCLS- *National Committee for clinical laboratory Standars*). O teste de susceptibilidade *in vitro* foi realizado em *C. neoformans* (H99). A cepa foi subcultivada em meio YPD ágar; a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 dias. As colônias isoladas foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (0,85%). As

células foram contadas utilizando câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 1×10^6 células/mL, que foi diluída 1:50 e 1:20 em meio RPMI, resultando em uma concentração 2X equivalente a 1×10^3 células/mL. As células e as concentrações das drogas foram diluídas 1:1, atingindo a concentração final de 1X. Os testes foram realizados em placas descartáveis estéreis de 96 poços, fundo chato, sendo o volume final utilizado em cada poço de 200 μ L, sendo 100 μ L das diluições da droga e 100 μ L das diluições com o fungo. As concentrações das drogas variaram de 512 a 0,25 μ g/mL. Em cada placa, foi feito controle positivo inoculando as leveduras em meio sem droga e meio sem droga contendo DMSO, quando este foi utilizado como solvente e controle negativo contendo apenas o meio RPMI. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h e então analisadas visualmente e por leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm.

5.7.1 Agentes antifúngicos

As 3 moléculas selecionadas por varredura virtual no banco de dados da *Life Chemicals* (Life Chemicals INC., Burlington, ON, Canadá) e duas drogas controle: Fluconazol (Sigma-Aldrich), Anfotericina B (Sigma-Aldrich) foram testadas. As drogas foram diluídas em meio RPMI [RPMI-1640 sem bicarbonato, com L-glutamina, suplementado com 2% de glicose e tamponado (pH 7.0) com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich)]. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como diluente para as moléculas. Os fungos foram incubados na ausência e presença de DMSO 1% (v/v) para confirmar que a exposição a esse solvente não influencia no crescimento dos isolados testados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Seleção do gene alvo *TRR1*

Estudos recentes de alvos potenciais para drogas baseado em genomas de fungos mostraram genes essenciais ausentes no genoma humano (Hu, W. *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006; Roemer *et al.*, 2003). Uma seleção de genes foi realizada previamente pelo nosso grupo, utilizando ferramentas de bioinformática e dados disponíveis na literatura. Levando em consideração alguns critérios de seleção na abordagem de genômica comparativa, o gene *TRR1* foi definido como potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (Abadio *et al.*, 2011). *TRR1* é um gene essencial para a sobrevivência do *C. neoformans* (Missall, Tricia A e Lodge, 2005b), está presente na maioria dos fungos patogênicos humanos analisados, para a

busca de drogas com amplo espectro de ação, e está ausente no genoma humano para que, em princípio, possa minimizar os efeitos colaterais da futura droga desenvolvida.

6.2. Expressão heteróloga dos genes *TRR1* e *TRX1* em linhagens de *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

Proteínas podem ser obtidas empregando-se a tecnologia de síntese proteica em sistemas heterólogos, uma vez que esta técnica permite que somente a parte desejável da proteína seja sintetizada, além de fornecer grande quantidade de proteína funcional. *E. coli* foi o primeiro organismo utilizado como célula hospedeira e é frequentemente a primeira escolha para a produção de proteínas recombinantes, que não dependem de modificações pós-traducionais para exercerem sua atividade biológica. Além de ser o organismo padrão em laboratórios de biologia molecular no mundo inteiro para expressar proteínas, uma parcela significativa de proteínas comercializadas para fins terapêuticos, aproximadamente 40%, é feita em sistemas de expressão em *E. coli* (Ni e Chen, 2009).

Os genes *TRR1* e *TRX1* foram sintetizados com códons otimizados para *E. coli* no vetor pET21a na forma de um inserto contendo nas extremidades sítios *NdeI-XhoI*. Entre o sítio de clonagem *XhoI* e o códon de parada da transcrição do gene (*stop codon*), existe uma sequência de seis histidinas, que permite que as proteínas recombinantes contenham uma cauda de polyHis na porção C- terminal. A escolha do sistema de expressão pET baseou-se nas várias características vantajosas apresentadas por ele, entre elas, destaca-se o veículo bacteriano de clonagem e expressão. A linhagem DH5 α foi escolhida como cepa de clonagem; após a verificação do bom rendimento da extração do plasmídeo (pET21a::inserto) em pequena escala, seguiu-se com a reação de digestão enzimática com as enzimas para liberação do fragmento e para linearização do vetor.

6.2.1 Digestão para confirmar os sítios de restrição e o gene sintético clonado no vetor

A partir do plasmídeo contendo o gene sintético foram realizados ensaios confirmatórios da presença dos sítios de restrição e correta liberação do inserto. Foram extraídos os DNAs plasmidiais de vários clones contendo o inserto e foi feita uma digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Analisando o mapa físico do vetor pET21a, estes sítios de restrição devem estar, exclusivamente, no início e fim da sequência desenhada liberando o inserto de maneira correta, sem que ocorra clivagem no meio da sequência. Em gel de agarose 1% foram confirmados os testes de clivagem com liberação dos insertos (**Figura 15**). Na **Figura 15A**

foi possível observar duas bandas, uma correspondente ao gene alvo *TRRI* (1116bp) e outra correspondente ao vetor plasmidial (5443bp). Na **Figura 15B** também foi possível observar duas bandas, uma correspondente ao gene *TRXI* (315bp) e a outra ao vetor (5443bp). Essa figura mostra que os plasmídeos::insertos foram digeridos nos sítios únicos para *NdeI* e *XhoI*.

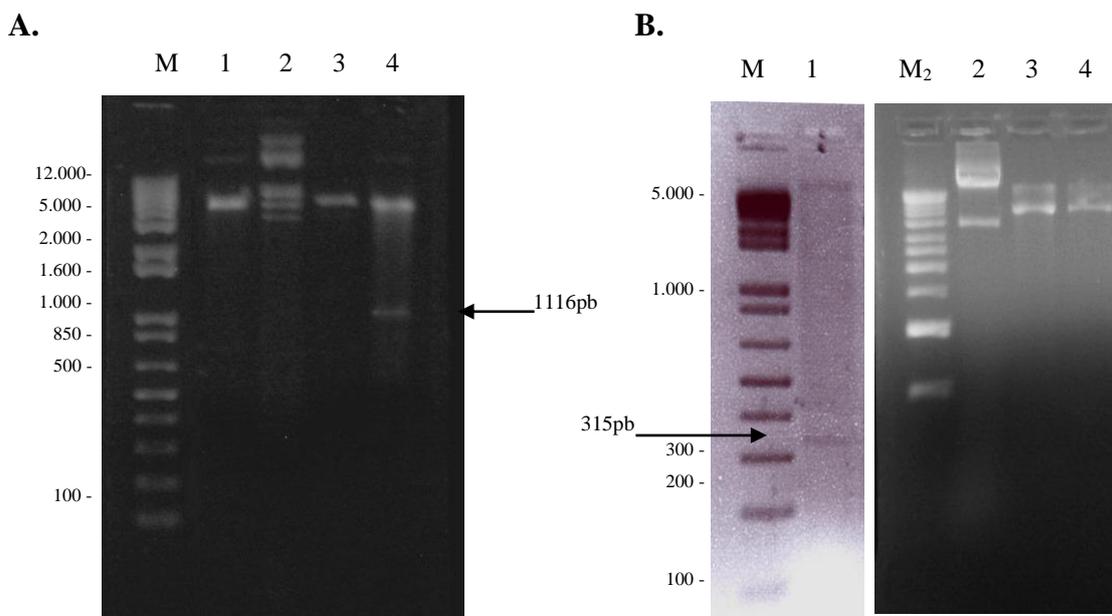


Figura 15. Confirmação dos sítios de restrição e a presença do sistema de ligação (vetor pET21a::inserto). Gel de agarose 1% em Tampão TAE 1X mostrando as digestões com as enzimas e o DNA genômico de *C. neoformans* inserido no vetor. **(A)** Sistema de ligação pET21a::*TRRI*: 1. Plasmídeo clivado com a enzima *NdeI*. 2. DNA plasmidial intacto. 3. Plasmídeo clivado com enzima *XhoI*. 4. Digestão dupla com *NdeI* e *XhoI*. M, marcador de massa molecular *1Kb Plus DNA Ladder* (invitrogen). A seta indica a banda correspondente ao inserto *TRRI* com 1116 bp. **(B)** Sistema de ligação pET21a::*TRXI*: 1. Digestão dupla com *NdeI* e *XhoI*. 2. DNA plasmidial intacto. 3. Plasmídeo clivado com a enzima *XhoI*. 4. Plasmídeo clivado com a enzima *NdeI*. M₂. Marcador de massa molecular de *1Kb*. A seta indica a banda correspondente ao inserto *TRXI* com 315 bp.

6.2.2 Obtenção de células competentes, transformação em *E. coli* e expressão heteróloga

E. coli já tem seu genoma conhecido e seu cultivo é facilmente mantido e economicamente viável para a produção em larga escala de proteínas recombinantes. Atualmente, estão disponíveis diversos sistemas de expressão, bem como linhagens geneticamente modificadas desta bactéria, para atender às mais diversas condições de expressão recombinante (Baneyx, 1999; Jana e Deb, 2005). Os vários sistemas de expressão gênica utilizados nessa bactéria

apresentam muitas características atrativas, como controle da expressão gênica e estratégias que facilitam a purificação de proteínas (Terpe, Kay, 2006).

Através do tratamento químico com cloreto de cálcio foram obtidas bactérias competentes das cepas de *E. coli*: DH5 α , BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysE. Os estoques de bactérias e o protocolo de transformação foram testados e apresentaram boas condições de uso; sendo desse modo, utilizados durante o período de realização do trabalho. A transformação das cepas com o plasmídeo pET21a contendo o gene *TRR1* ou *TRX1* também deu-se de forma satisfatória, permitindo a purificação de novas cópias do plasmídeo (*E. coli* DH5a) e a expressão das proteínas recombinantes utilizando *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysE.

Inicialmente foram realizadas testes de expressão, empregando diferentes meios de cultura (LB, 4YT), temperaturas de 25 °C e 37 °C, variando o tempo de indução (2h, 4h, 6h, 16h), a adição ou não de glicose e a concentração de IPTG (0.5 mM, 1 mM, 2 mM) para as duas proteínas recombinantes (**Tabela 4**).

Tabela 4. Condições de expressão realizadas para obtenção das proteínas recombinantes Trr1 e Trx1.

Estratégia	Condição experimental
Cepas	BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysE.
Meios de cultura	LB e 4YT
Temperatura de expressão	16, 25 e 37 °C
Concentração de IPTG	0,5 mM, 1 mM, 2 mM
Tempo de indução	0 h, 2 h, 4 h, 6 h e 16 h

Fonte: elaborada pela autora

A melhor condição para a expressão das proteínas recombinantes Trr1 e Trx1 pode ser visualizada na **Figura 16**. O tempo de 6 h de indução (37 °C) e uma concentração de 1 mM de IPTG foram escolhidos e padronizados para a expressão e purificação das proteínas recombinantes. As células transformadas de *E. coli* foram cultivadas em meio LB contendo o respectivo antibiótico até o final da fase exponencial.

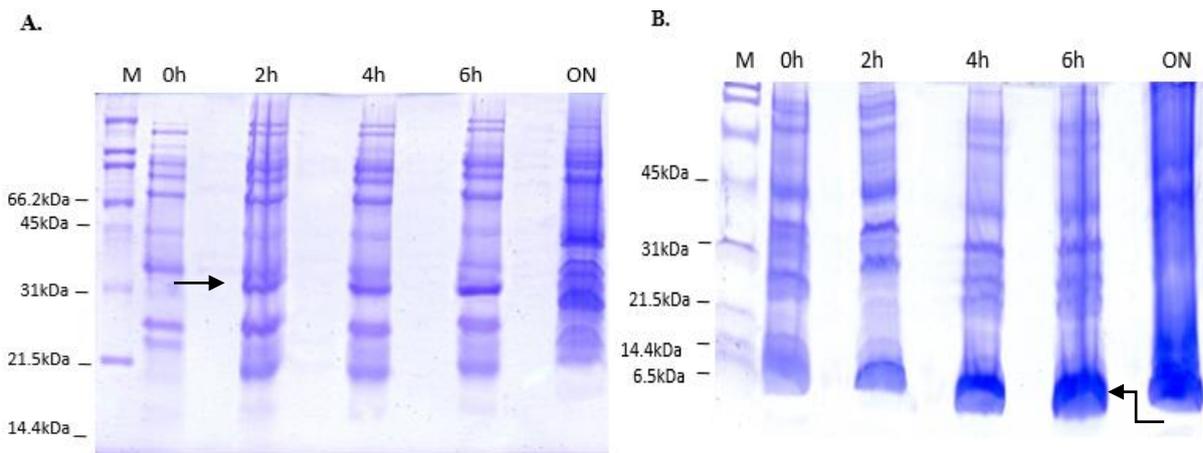


Figura 16. Análise da expressão das proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% ao longo do tempo de indução. As culturas foram crescidas a 37 °C em meio LB. A partir da adição de 1 mM IPTG, foram coletadas alíquotas da cultura sob indução até o tempo de 16 h (overnight - O.N). (A) A seta indica a banda correspondente à proteína Trr1 com adição de glicose 0.5%. (B) A seta indica a banda correspondente à proteína Trx1 sem adição de glicose. (M) Marcador de massa proteica *SDS-Page Broad Range*.

Na figura anterior é observado que após a quarta hora de indução a taxa de produção das proteínas se aproxima de uma fase estacionária. Pode-se concluir que tempos de expressão mais longos não seriam vantajosos já que a concentração da proteína se manteria constante, reduzindo a produtividade do processo. No tempo 0 h (antes da indução da expressão) não há visualização das bandas correspondentes às proteínas Trr1 ou Trx1, pois não ocorreram “vazamentos” na expressão, já que o sistema do promotor do bacteriófago T7 RNA polimerase utilizado é fortemente regulado e permite a expressão das proteínas recombinantes apenas quando adicionado o indutor. Os níveis de expressão foram semelhantes nos diferentes clones e as proteínas foram produzidas em forma solúvel, sem a formação de corpos de inclusão. De acordo com Baneyx, (1999) um dos problemas da superprodução de proteínas heterólogas dentro do citoplasma desta bactéria é a formação de proteínas insolúveis em forma de agregados (corpos de inclusão) ocasionados pela perda da conformação da proteína (Baneyx, 1999), no entanto esses problemas não se apresentaram neste trabalho. Apesar do tempo de 16 h apresentar bandas correspondentes a Trr1 e Trx1 visualmente maiores, isso não reflete em sua solubilidade, que fica diminuída quando um excesso de proteína é produzida. Essa é a razão pela escolha do melhor tempo de indução de apenas 6 h.

Muitas publicações descrevem com sucesso a utilização desses sistemas de expressão, inclusive, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Abadio *et al.*, comunicação pessoal) também apresentaram bons resultados utilizando o vetor pET21a. Diante dos bons resultados alcançados, esse sistema de expressão apresentou-se como uma alternativa promissora para a obtenção da tioredoxina redutase recombinante do microrganismo *C. neoformans*.

A **Figura 17** indica que a melhor condição para produção do maior nível de proteína recombinante solúvel Trr1, foi conseguida na linhagem *E. coli* BL21(DE3). Os ensaios de expressão em grande escala foram realizados a 37 °C, com a adição de IPTG 1mM e glicose 0,5%. As amostras da cultura de 2 clones, selecionados aleatoriamente, foram coletadas nos tempos de indução de 0 h e 6 h e analisados por SDS-PAGE. Na **Figura 17A** é possível identificar na fração solúvel uma banda de aproximadamente 39 kDa correspondente à proteína recombinante Trr1. Os resultados indicam que a proteína recombinante não apresenta regiões hidrofóbicas expostas em sua superfície. Desta forma, a ausência de regiões hidrofóbicas na enzima Trr1 poderia inicialmente explicar a solubilidade apresentada.

Antes de iniciar a etapa de purificação, foi confirmado que a proteína produzida em maior quantidade no perfil de expressão da bactéria após a indução com IPTG corresponde realmente a Trr1 (**Figura 17B**). Uma alíquota do precipitado bacteriano obtido após indução da expressão foi submetido à análise por *western blot* utilizando anticorpo anti-His e como resultado deste teste observou-se uma banda na altura de aproximadamente 39 kDa, correspondente à Trr1.

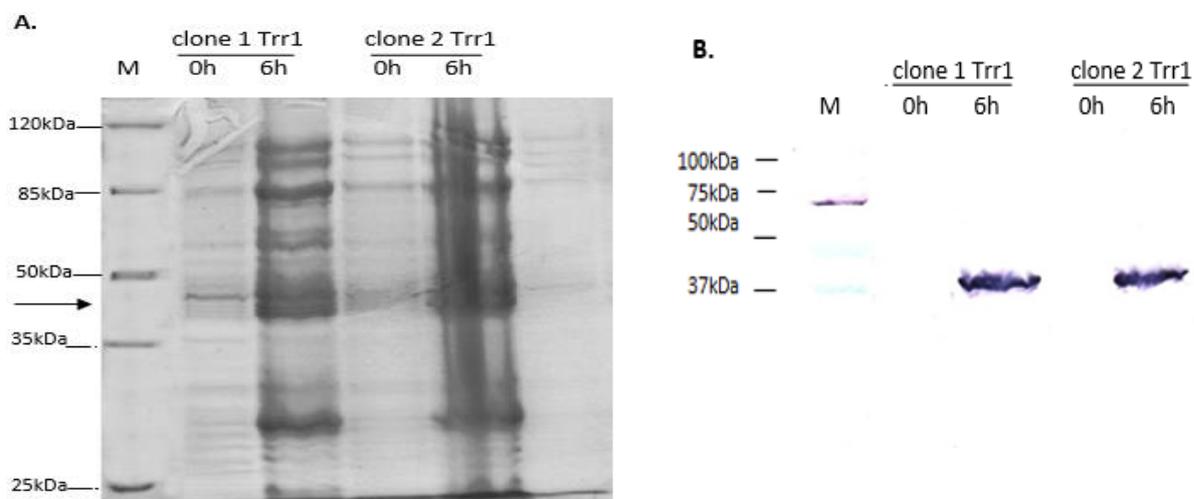


Figura 17. Análise da expressão da proteína Trr1 em clones de *E. coli* BL21(DE3) transformados. (A) As culturas foram crescidas a 37 °C até atingirem uma densidade ótica de 0,6 a 600 nm. A proteína recombinante foi fracionada por eletroforese no gel de poliacrilamida SDS-PAGE

12% e corada com *Coomassie Blue*, após 6 h de indução com IPTG (1 mM) e glicose 0.5%. (M) Marcador de massa proteica *Pierce Prestained* (Thermo Scientific). A banda correspondente à proteína Trr1 está indicada pela seta. (B) *Western-blot* para confirmação da expressão da proteína. A proteína foi transferida à membrana de nitrocelulose e reconhecida por anticorpo monoclonal anti-polyHis. (M) Marcador de massa molecular pré-corado *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD).

Segundo Hannig e Makrides, os promotores utilizados na construção dos vetores de expressão devem possuir níveis mínimos de transcrição basal, pois a proteína produzida pode ser tóxica para a bactéria, diminuindo a eficiência na produção (Hannig e Makrides, 1998). Para inibir a transcrição basal, um guia da Amersham Pharmacia Biotech (Capítulo: 2 “*The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification*”), sugere a utilização de um meio LB com adição de 2% de glicose para vetores que utilizam promotor *lac*, como é o caso. Níveis basais de expressão podem ser minimizados por repressão catabólica, como, por exemplo, a adição de glicose, que não afeta a expressão após a indução. Quando comparado com a expressão que utilizou apenas meio LB e IPTG, foi possível observar um aumento na expressão no meio LB com 2% de glicose. A incorporação de 1% de glicose no meio de cultivo reduz os níveis de cAMP e aumenta a repressão do promotor significativamente (cAMP é produzido como resposta a baixos níveis de glicose) (Khlebnikov e Keasling, 2002).

Na literatura existem muitos experimentos relacionados com a expressão de Trr de diferentes organismos e o uso de vetores de expressão também é variado. Isso indica que esta proteína pode ser avaliada usando diferentes estratégias com o objetivo de identificar as melhores condições para reproduzi-la eficientemente. Alguns desses estudos são citados a seguir: os genes *TRR* de espécies do gênero *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. berghei* e *P. yoelii* e *TRX* de *P. falciparum* e *Rattus norvegicus* foram otimizados e sintetizados com códons preferenciais para expressão em *E. coli*. Os vetores foram transformados em *E. coli* BL21(DE3), e as células foram cultivadas a 37 °C em meio LB (*TRR* de *P. vivax* e *TRX* de *P. falciparum*) ou em meio *Turbo Broth*, suplementado com glicose 1% (v/v) (*TRR* de *P. falciparum* e *P. berghei*) e induzidas com IPTG 0,5 mM (Theobald *et al.*, 2012). Thon e cols. (2007) descreveram a caracterização do sistema tioredoxina do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. A tioredoxina A (AnTrxA) e a tioredoxina redutase (AnTrr) possuem massa molecular de 11,6 kDa e 72,2 kDa, respectivamente. Ambas foram expressas com cauda PolyHis em *E. coli* BL21(DE3) e purificadas (Thön *et al.*, 2007).

Neste trabalho, a proteína recombinante Trx1 foi também expressa na linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Os resultados de expressão em grande escala indicam que o maior

rendimento é obtido quando a expressão é induzida com IPTG 1 mM por 6 h a 37 °C e sem adição de glicose, em contraste com Trx1 recombinante. A **Figura 18** corresponde à expressão heteróloga eficiente de Trx1 na fração solúvel, com uma banda de aproximadamente 12 kDa. Para confirmar se a banda na altura de aproximadamente 12 kDa correspondia a Trx1, também foi realizado um ensaio de *western blot*. O resultado deste procedimento assegurou que a banda na altura de 12 kDa corresponde a Trx1.

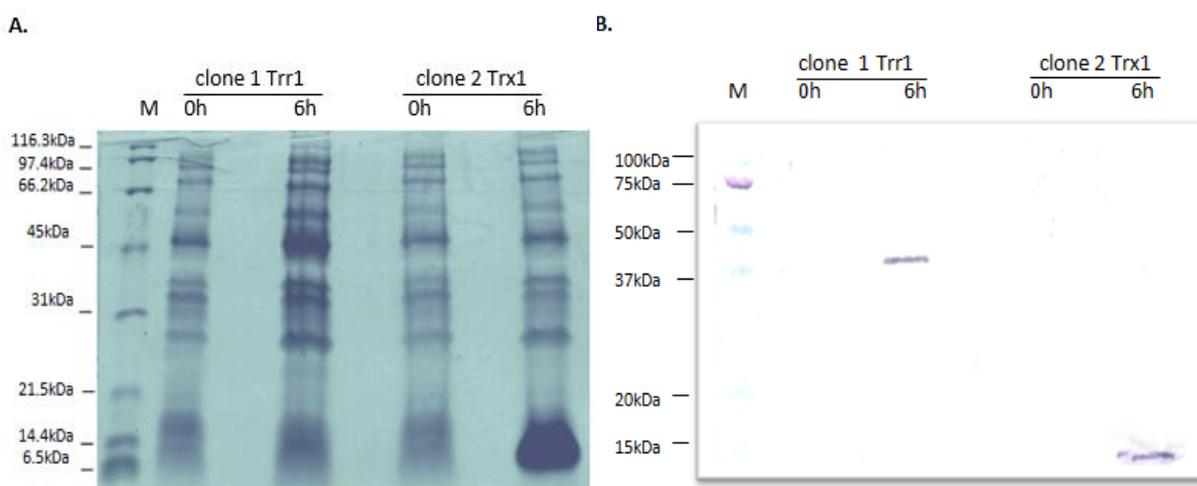


Figura 18. Análise da expressão da proteína Trx1 em clones de *E. coli* BL21(DE3)pLysE transformados. (A) As culturas foram crescidas a 37 °C até atingirem uma densidade ótica de 0,6 a 600 nm. A proteína recombinante foi fracionada por eletroforese no gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e corada com *Coomassie Blue*, após 6 h de indução com IPTG (1 mM) (M) Marcador de massa proteica *SD-Page Broad Range*. (Clone 1 controle positivo Trr1, clone 2 é a banda que correspondente à proteína Trx1 indicada por uma seta (B) *Western-blot* para confirmação da expressão da proteína Trx1. A proteína foi transferida à membrana de nitrocelulose e reconhecida por anticorpo monoclonal anti-polyHis (M) Marcador de massa molecular pré-corado *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD).

Wang e cols. (2013) clonaram e expressaram o gene *TRX* da bactéria *Pseudoalteromonas* sp. AN178 (PsTrx), isolada do gelo marinho antártico, em *E. coli*. Este gene foi clonado no plasmídeo pET28a e introduzido em *E. coli* BL21, codificando uma proteína de fusão contendo Trx precedida por His-tag. A expressão de Trx foi induzida pela adição de IPTG 0,2 g/mL por 5 h a 37 °C. O gel SDS-PAGE mostrou uma banda de aproximadamente 17 kDa (Wang *et al.*, 2013). Boumis e cols. (2011) expressaram o gene Trx de *Schistosoma mansoni* (SmTrx), um parasita intravascular. O gene foi clonado no vetor de expressão pGEX-4T-1 através de sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI*. A proteína fusionada com GST-tag foi produzida

em células bacterianas BL21(DE3) pela indução com IPTG 0,3 mM, a 20 °C por ~16 h. A proteína solúvel foi confirmada por SDS-PAGE, destacando uma banda de ~40 kDa (Boumis *et al.*, 2011).

O sistema pET21 é uma ferramenta de expressão de proteína, controlando fortemente a expressão da proteína com o promotor T7/T7lac, com os hospedeiros pLysS ou pLysE, e com a adição de glicose, baseado nas características da proteína-alvo. Portanto, é possível aumentar a regulação deste sistema para diminuir os níveis de expressão basal da proteína. Por isso, é importante compreender as ferramentas para determinar empiricamente qual é a combinação mais adequada para cada proteína de interesse (Novagen, 2006). A estabilidade adicional da expressão de genes com a cepa hospedeira pLysE é devida à lisozima T7 que se liga à T7 RNA polimerase e inibe a transcrição do gene (Figura 19). Quando o IPTG é adicionado, a quantidade de T7 lisozima é inferior à da T7 RNA polimerase produzida. Consequentemente, esta polimerase se liga ao promotor T7 presente no vetor pET ativando a expressão do gene heterólogo.

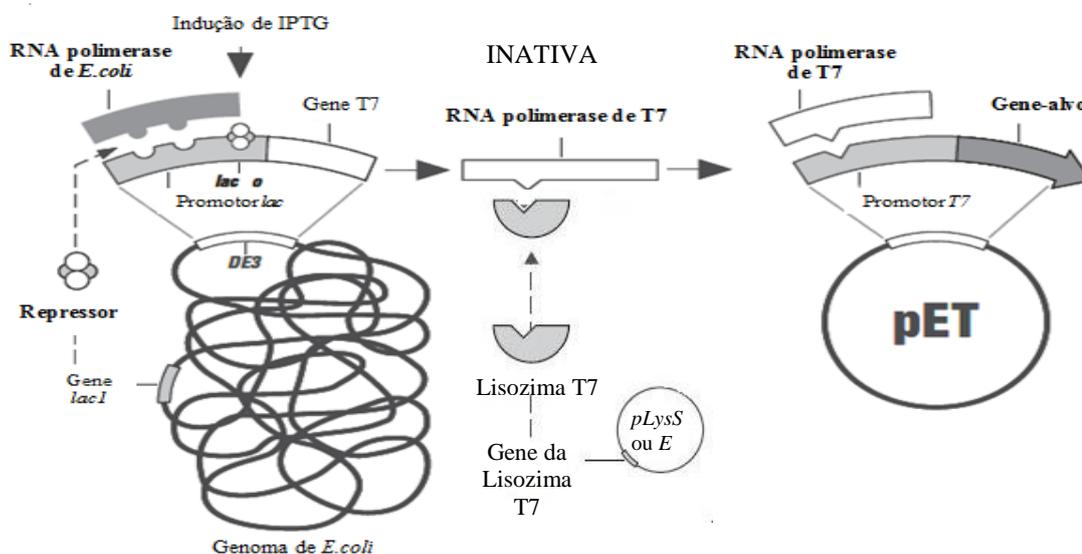


Figura 19. Representação esquemática da regulação da expressão proteica no sistema pET com a cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysE. (Fonte: www.novagen.com).

No presente estudo a indução da expressão da Trx1 com IPTG em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysE gerou uma quantidade significativa de proteína recombinante. Embora a proteína tinha alto nível de expressão proteica, ela não tendeu a formar corpos de inclusão, ficando na fração solúvel. Os corpos de inclusão formam-se através de um evento passivo que

ocorre por interação hidrofóbica nas cadeias desdobradas, ou por mecanismos de agregação específica é desconhecido (Villaverde e Carrió, 2003). A agregação em sistemas de recombinação é minimizada através do controle de parâmetros tais como: a temperatura, taxa de expressão, metabolismo do hospedeiro, exclusão de genes de protease, ou engenharia para a superexpressão de códons raros na proteína de interesse, foldases ou chaperonas codificadas no plasmídeo (Jonasson *et al.*, 2002).

Em condições normais, as regiões conhecidas como “*hot spots*” de agregação, regiões da sequência da proteína que viabilizam a formação de corpos de inclusão, estão bloqueadas na forma globular da proteína. Hipoteticamente neste trabalho, nossas proteínas recombinantes tinham essas regiões bloqueadas, pois suas cadeias laterais encontravam-se escondidas em seu núcleo hidrofóbico ou já estavam envolvidas em interações na mesma cadeia ou com outra subunidade. Desta forma, foi promovida a estabilização conformacional da proteína (Ventura, 2005). Alguns autores demonstraram também que as interações intermoleculares que promovem a formação de corpos de inclusão envolvem interações tipo folha beta pregueada, embora a exata natureza desta interação seja ainda desconhecida (Ventura, 2005).

6.2.3 Purificação das proteínas recombinantes

A técnica de IMAC (*Immobilized metal-ion affinity chromatography*) baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como a histidina do imidazol, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico. Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico do agente quelante e das condições cromatográficas tais como pH, força iônica, tipo de tampão e velocidade superficial (Chaga, 2001).

O uso de sequências curtas de histidina ou his-tags, tipicamente colocados como marcadores (“*tags*”) de afinidade, na extremidade N-terminal ou C-terminal, permitem a purificação da proteína desejada a partir do extrato bruto das células hospedeiras em um único passo. Diferentes suportes e estratégias cromatográficas estão disponíveis para IMAC (Abdullah e Chase, 2005). O IMAC mais difundido usa o ácido nitrilotriacético (NTA) como um ligante para imobilizar metais como níquel em cromatografia de afinidade (Ni-NTA), ou

matrizes diferentes de Sepharose quelante. Este método de purificação possui algumas vantagens, como a ligação específica e reversível da proteína alvo na coluna, além de alta seletividade e rendimento. Além disso, uma vantagem na adição da cauda é a fácil identificação da proteína por anticorpos *anti-His* em técnicas de imunoensaio.

Após incubação da coluna, sob agitação, foi coletado o *flow-through* (FT); duas lavagens com tampão de lavagem e cinco eluições da proteína ligada à coluna foram feitas, para avaliar em qual fração haveria uma maior concentração da proteína de interesse. As **Figuras 20 e 21** mostram o gel SDS-PAGE da purificação otimizada das proteínas por cromatografia de afinidade, o sobrenadante e as eluições com imidazol. O protocolo de purificação foi otimizado com relação à eluição, ficando determinada a concentração de 250 mM de imidazol para completa eliminação das proteínas recombinantes da matriz. As proteínas foram produzidas na forma solúvel e o rendimento foi em média de 16 mg de Trr1 e 23 mg de Trx1 por litro de cultura bacteriana (calculado após realização de uma curva de indução em função do tempo, utilizando o valor de absorvância em 280 nm para 1mL de proteína eluída). Anteriormente, foi descrito para Trr1 recombinante de *P. lutzii* (Pb01) um alto grau de pureza e um bom rendimento (25 mg/litro de cultura) na purificação desta proteína induzida com IPTG 0,5 mM por 6 h (Abadio *et al.*, comunicação pessoal).

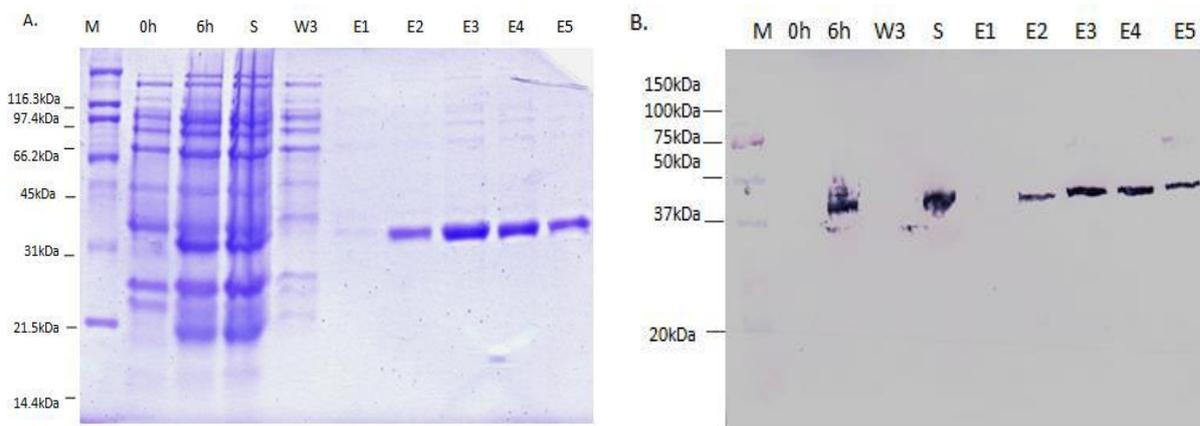


Figura 20. Análise da proteína Trr1 recombinante purificada por cromatografia de afinidade, em coluna sepharose acoplada ao níquel da GE Healthcare. (A) Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE 12%. (S) Fração solúvel do lisado de *E. coli* (BL21DE3, PET21a:TRR1) induzida com IPTG (1 mM) e glicose (0,5 mM) por 6 h; (W1, W3) etapas de lavagem de 4 mL (imidazol 40 mM); (E1-E5) etapas de eluição (imidazol 250 mM) com frações de 1mL; (M) Marcador de massa molecular *Unstained Protein*. Presença de Trr1 nas etapas de eluição com uma banda de aproximadamente 39 kDa. (B) Western-blot para confirmação da purificação da proteína Trr1. (M) Marcador de massa molecular pré-corado *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD).

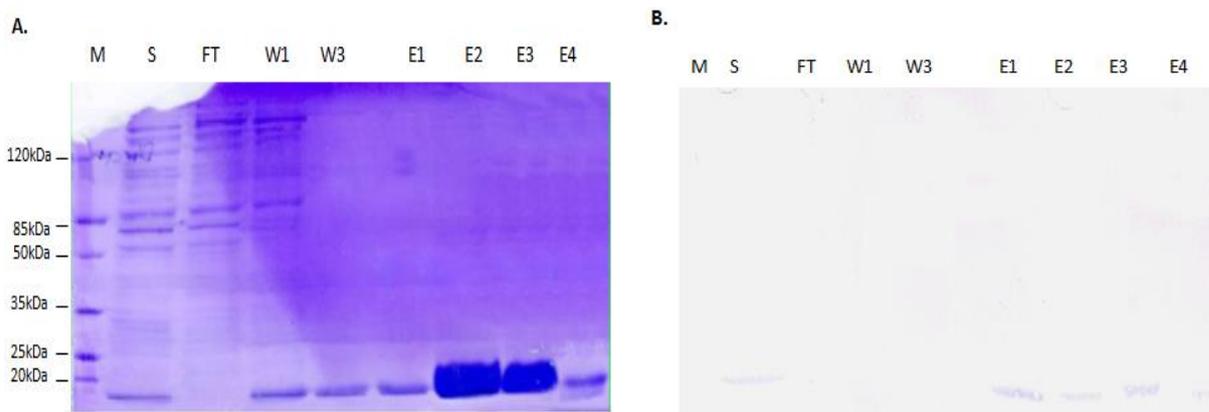


Figura 21. Análise da proteína Trx1 recombinante purificada por cromatografia de afinidade, em coluna sepharose acoplada ao níquel da GE Healthcare. (A) Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE 12%. (S) Fração solúvel do lisado de *E. coli* (BL21DE3 pLysE, PET21a:trx1) induzida com IPTG (1 mM) sem glicose por 6 h; (FT) Flow-through; (W1, W3) etapas de lavagem de 4 mL (imidazol 40 mM); (E1-E4) etapas de eluição (imidazol 250 mM) com frações de 1 mL; (M) Marcador de massa proteica *Pierce Prestained* (Thermo Scientific). Presença de Trx1 nas etapas de eluição com uma banda de aproximadamente 12 kDa conforme esperado. (B) Western-blot para confirmação da purificação da proteína Trx1. (M) Marcador de massa molecular pré-corado *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD).

A histidina possui afinidade por íons metálicos e a presença de seis histidinas na região C-terminal das proteínas recombinantes possibilitou sua purificação baseado na afinidade por íons metálicos imobilizados na resina ou coluna. A massa molecular correspondente aos 6 resíduos de histidina é de aproximadamente 0.84 kDa (Terpe, K, 2003), provavelmente não interferindo assim com a conformação e a atividade biológica da proteína alvo.

Para eluir a proteína da matriz, existem duas metodologias, na primeira, pode ser empregado um gradiente de pH, uma vez que a histidina (6xHis-tag) possui um pKa de aproximadamente 6,0 e torna-se protonada quando o pH é reduzido (4,5-5,3), como resultado ocorre sua liberação do íon metálico. A segunda metodologia, como foi o caso, se a concentração de imidazol é aumentada para 100-250 mM, as proteínas 6xHis-tag também são dissociadas porque elas não podem mais competir por locais de ligação na Resina Ni-NTA (QIAexpressionist, 2002).

Diversas estratégias foram usadas para tentar aumentar a pureza das proteínas recombinantes purificadas. Primeiramente, foi determinada a relação entre a quantidade de resina e de proteína recombinante. Um excesso de resina em relação à proteína recombinante resulta em sítios livres para uma interação inespecífica com outras proteínas. A melhor relação observada foi de 1 mL de resina Ni sepharose para cada 250 mL de cultura

ressuspendido em 30 mL de tampão de ligação. O pH da amostra também pode ser um ponto chave na remoção de contaminantes, uma vez que pHs alcalinos (acima de 8,0) facilitam a interação de proteínas com o metal. Em pHs mais baixos, apenas proteínas que interagem fortemente com o metal permanecem ligadas (Sambrook, J. e Russell, 2001).

No presente trabalho, a purificação não foi realizada sob condições desnaturantes, ou seja, não foi preciso usar tampão com uréia para solubilizar as proteínas. A solubilização da proteína expõe totalmente a cauda de histidina, favorecendo sua ligação com o íon metálico e consequentemente aumenta a eficiência da purificação (Novagen, 2006).

Na literatura, a metodologia utilizada para expressão e purificação de proteínas recombinantes é muito variável. Zhang e cols. (2009) expressaram e purificaram a proteína Trr1 de *S. cerevisiae*. O plasmídeo contendo o inserto foi transformado em *E. coli* BL21(DE3). As células transformadas foram cultivadas a 37 °C em meio LB durante 20 h a 18 °C com IPTG 0.2 mM. A proteína foi purificada utilizando uma coluna de afinidade de Ni-NTA (Qiagen), porque no vetor de expressão pET28b foi adicionado um His-tag N-terminal para a purificação por afinidade (Zhang *et al.*, 2009). De igual forma, Oliveira e cols. (2010) expressaram e purificaram a Trr1 de *S. cerevisiae* (ScTrr1). O sobrenadante resultante foi aplicado numa coluna de afinidade ao níquel (Hi-Trap da GE Healthcare). A proteína ligada foi eluída com um gradiente linear de 0-0,5 M de imidazol (Oliveira *et al.*, 2010).

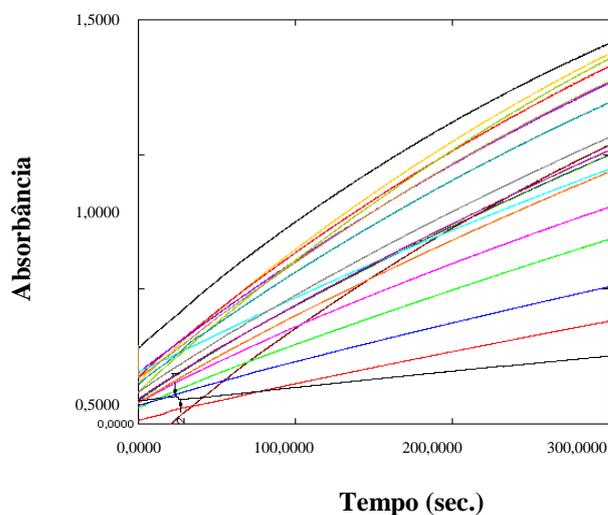
A purificação da proteína recombinante “geralmente” é feita mediante apenas um passo de cromatografia, utilizando os *tags* fusionados às proteínas. Wang e cols. (2013) clonaram e expressaram o gene Trx da bactéria *Pseudoalteromonas* sp. AN178. A proteína recombinante PsTrx com a adição de His, foi purificada utilizando cromatografia de afinidade Ni-NTA em resina. As proteínas foram eluídas numa forma gradual, com 5 volumes de resina de 40 e 100 mM de tampão de eluição com imidazol numa taxa de fluxo de 0,5-1,0 ml/min (Wang *et al.*, 2013).

As frações das eluições contendo as proteínas recombinantes purificadas por afinidade foram dialisadas para retirada do imidazol. A diálise foi feita em três etapas diminuindo gradualmente o imidazol, pois a eliminação em uma única etapa leva à precipitação da proteína. Em seguida, as proteínas foram concentradas por ultra filtração (Amicon - Millipore 4 °C), suas concentrações foram determinadas e a pureza das amostras verificadas por SDS-PAGE. As proteínas purificadas encontram-se, no momento, em fase de experimentos de cristalização para resolução da sua estrutura 3D.

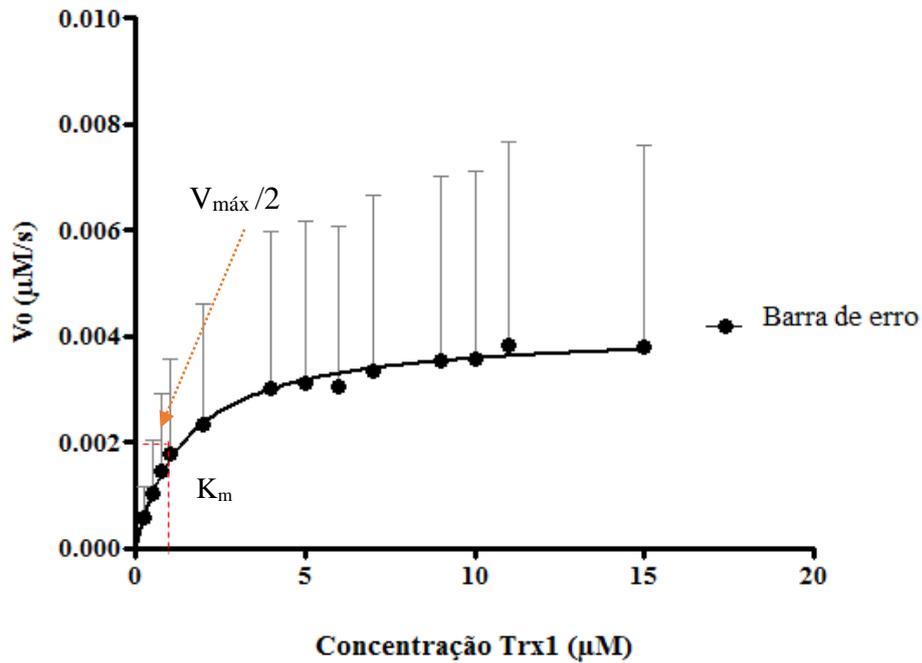
6.3 Ensaio de atividade enzimática de Trr1 recombinante

Ensaio de atividade preliminares foram necessários para determinar o melhor intervalo de concentração e tempo de cinética a serem utilizados para cada concentração de substrato durante a reação de catálise. Os estudos cinéticos da enzima Trr1 recombinante de *C. neoformans* foram realizados com o substrato Trx1 recombinante do mesmo organismo. Os ensaios enzimáticos para determinação dos parâmetros cinéticos basearam-se na redução de DTNB gerando TNB (Abadio *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2010). Os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m foram determinados variando a concentração de Trx1 de 0.25 μM a 15 μM (**Figura 22**), traçando o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. A curva de atividade da enzima foi monitorada pela formação de TNB, para diferentes concentrações do substrato. Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram 0,004109 $\mu\text{M/s}$ e 1,479 μM , respectivamente. A velocidade de reação aumentou gradualmente à medida que a concentração de substrato aumentava, mostrando assim a capacidade de Trr1 em reduzir Trx1. Esses ensaios possibilitaram avaliar a atividade enzimática desta proteína alvo.

A.



B.



C.

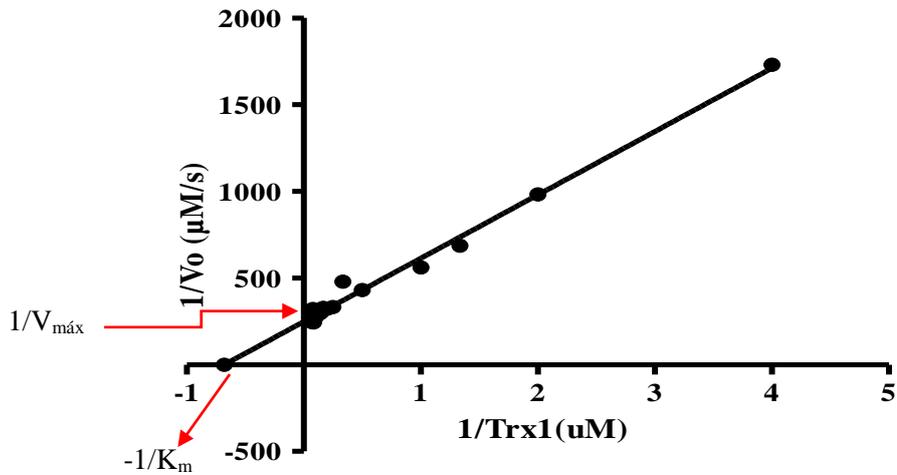


Figura 22. Determinação de K_m e $V_{\text{máx}}$ de Trx1 utilizando o substrato Trx1. (A) Medida de redução de tioredoxina a 412nm a temperatura ambiente. Reação iniciada com a adição de Trx1 0,1 μM . As cores representam a concentração do substrato que varia de 0,25 μM a 15 μM . (B) Curva de Michaelis-Menten para determinar K_m e $V_{\text{máx}}$ para o substrato Trx1. A curva foi ajustada usando regressão não-linear. (C) Duplo-recíproco Lineweaver-Burk. O K_m é a concentração do substrato μM , na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima. $K_m = 1,479 \mu\text{M} \pm 0,1201$, $V_{\text{máx}} = 0,004109 \pm 8,222\text{e-}005 \mu\text{M/s}$.

DTNB é um substrato dissulfeto artificial da Trx, sendo frequentemente utilizado no ensaio de atividade enzimática da tioredoxina redutase. O DTNB é convertido em duas moléculas de TNB pela Trx reduzida (Holmgren, Arne, 1985). Ruocco e cols. (2004) com o método de

redução de DTNB e a formação do produto (TNB) avaliado por espectrofotometria (absorbância a 412 nm) determinaram a atividade da tioredoxina redutase de *Sulfolobus solfataricus* (SsTrxR). A reação continha DTNB 5 mM, NADPH 0,25 mM, FAD 0,05 mM e EDTA 10 mM em 1 mL de volume final de solução. O método de redução de tioredoxina redutase reporto a mais alta atividade que foi observada usando ao NADPH e o FAD como cofatores (k_m : 1,7 μ M). O mesmo comportamento foi observado no caso de redução de DTNB, embora a atividade específica foi reduzida (k_m : 44,1 μ M) quando a tioredoxina de *E. coli* (Ectrx) foi usada como substrato. (Ruocco *et al.*, 2004). Durante o procedimento de purificação de SsTrxR provavelmente ocorreu a perda de FAD, por isso foi necessário adicionar esse cofator na reação (Ruocco *et al.*, 2004). Similarmente, em nosso experimento de atividade enzimática de Trr1 de *C. neoformans* foi adicionado FAD 2 mM.

Abadio e colaboradores realizaram estudos cinéticos da enzima tioredoxina redutase recombinante de *P. Lutzzi* (Pb01) com o substrato tioredoxina de *S. cerevisiae* (Trx3), e foi possível pelo fato da proteína Trr1 (Pb01) possuir 65% de identidade com a proteína tioredoxina redutase de *S. cerevisiae*. Apesar de não ter sido feito com o substrato enzimático obtido do mesmo organismo e, embora o valor de K_m (4,12 μ M) ser maior demonstrando uma menor afinidade, o ensaio possibilitou avaliar a atividade enzimática de Trr1. Apesar da interação entre a tioredoxina redutase e a tioredoxina ser espécie-específica, a conservação de *loop 2* entre as tioredoxinas desses fungos pode explicar os resultados obtidos com Trr1 de *P.lutzii* (Abadio *et al.*, 2011)

Gustafsson e cols. (2012) expressaram e determinaram a atividade enzimática do sistema tioredoxina de *Bacillus anthracis*, agente causador do antraz. A tioredoxina redutase (TR1) foi mantida constante a 15 nM, enquanto que as concentrações de redoxina variaram na faixa de 2-100 μ M para Trx1 (BA4758), 5-150 μ M para Trx2 (BA4945) e 5-200 μ M para NrdH (BA4201), uma redoxina importante na via tioredoxina redutase e NADPH, sendo restrita a bactérias (Gon *et al.*, 2006) . O valor de K_m de TR1 com Trx1 foi de 8,4 μ M. A eficiência catalítica TR1 como um redutor de Trx2 foi de aproximadamente um terço daquela usando Trx1, devido a um aumento no K_m (em 2,3 vezes). Usando BaNrdH como substrato, a eficiência catalítica foi de apenas 5%, comparado a BaTrx1, devido ao grande aumento no K_m (10 vezes). Os parâmetros catalíticos, as atividades enzimáticas e os níveis relativos de proteína em extratos celulares demonstraram que o sistema dissulfeto redutase geral em *B. anthracis* é composto de Tioredoxina redutase (TR1) e Trx1, e que Trx1 representa o doador de elétrons fisiologicamente relevante (Gustafsson *et al.*, 2012). A **Tabela 5** mostra uma

comparação do parâmetro cinético (K_m) para a redução de diferentes redoxinas como substrato para a tioredoxina redutase nos estudos anteriormente citados.

Tabela 5. Parâmetro cinético (K_m) de diferentes redoxinas como substrato para a tioredoxina redutase.

Proteínas	K_m μ M	Autores
<i>Cn</i> Trx1-Trr1	1,479 \pm 0,1201	Bravo <i>et al.</i> , comunicação pessoal
<i>Ba</i> Trx1-TR1	8,41 \pm 0,32	Gustafsson <i>et al.</i> , 2012
<i>Ba</i> Trx2-TR1	19,2 \pm 1,39	
<i>Ba</i> NrdH-TR1	85,5 \pm 5,98	
<i>Sc</i> Trx3-Trr1	4,12	Abadio <i>et al.</i> , comunicação pessoal
NADPH- <i>Ss</i> TrxR	1,7	Ruocco <i>et al.</i> , 2004
<i>Ec</i> Trx- <i>Ss</i> TrxR	44,1	

O parâmetro cinético foi determinado pela curva de Michaelis-Menten na Figura 21 usando a regressão não linear. *Cn*: *C. neoformans*, *Ba*: *Bacillus anthracis*, *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, *Ss*: *Sulfolobus solfataricus* e *Ec*: *Escherichia coli*. Fonte: elaborada pela autora.

6.4 Obtenção de cristais da proteína recombinante Trx1

A necessidade de conhecer a estrutura tridimensional de Trr1 e Trx1 por cristalografia vem da informação de que o arranjo tridimensional dos átomos na molécula pode ser um fator determinante na descoberta de novos fármacos mais específicos, mesmo na presença de um modelo obtido por homologia de sequência. Para a realização do experimento de cristalização inicialmente foram concentradas as proteínas recombinantes Trr1 e Trx1 a uma concentração inicial de 10 mg/mL e 8,65 mg/mL respectivamente. Foram usados os *Kits Crystal Screen 1* e *2* da Hampton Research para buscar as condições de cristalização. No kit *Crystal Screen 1*, foi identificado o crescimento dos cristais para a proteína recombinante Trx1 de *C. neoformans*, quando o experimento aconteceu na condição nº32 que tinha 300 μ L sulfato de amônio 2 M no poço e 2 μ L da proteína Trx1 a uma concentração de 8,65 mg/mL que se encontrava diluída em Tris-HCl 10 mM pH 8,5 e NaCl 0,03 M (**Figura 23**). A proteína foi confirmada com o corante *Izit* da Hampton Research. A partir do refinamento das condições será possível

encontrar uma solução ideal para a difração dos cristais de cada proteína. Atualmente a parte experimental de cristalização do alvo Trr1, está sendo testada no laboratório de Biofísica da UnB e espera-se dar continuidade aos experimentos durante o curso de doutorado.

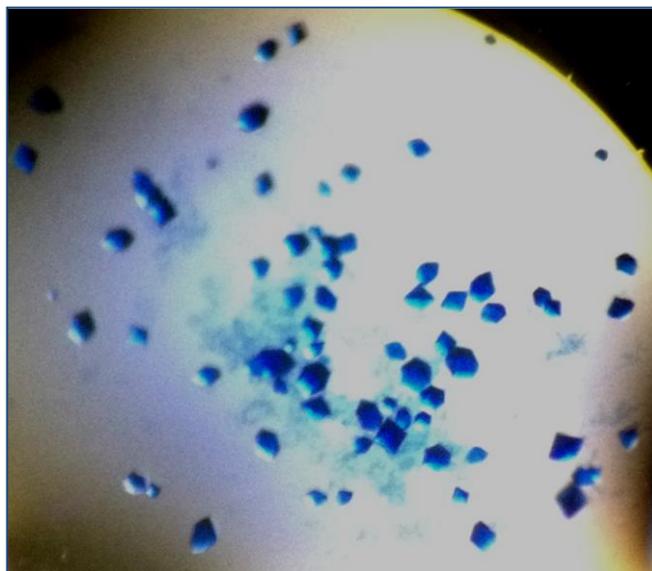


Figura 23. Condições de crescimento dos cristais da proteína recombinante Trx1 do fungo patogênico *C. neoformans* (Sulfato de amônio 2M).

Embora as Trrs tenham sido isoladas a partir de organismos pertencentes a todos os três domínios da vida, archaea, eubactérias e os eucariotas, as diferenças entre as Trr isoladas a partir de diferentes fontes têm emergido (Williams, Charles H *et al.*, 2000). As Trrs isoladas de eubactérias e dos eucariotas inferiores têm sido extensivamente caracterizadas, no entanto, não existe informação disponível sobre a Trr isolada e seu substrato Trx em fungos patogênicos humanos. Oliveira e cols. apresentaram uma análise preliminar de difração de raios X de ScTrr1 no estado oxidado de *S. cerevisiae*, que representou a primeira estrutura descrita em leveduras (de Oliveira *et al.*, 2005).

Atualmente, no banco de dados de proteínas, existem apenas 2 proteínas de *C. neoformans* com estrutura cristalográfica resolvida: 1- A proteína inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), cuja deleção resulta em um crescimento lento do fungo e defeitos de virulência (Morrow *et al.*, 2012). 2- A proteína farnesiltransferase (FTase) que catalisa a lipidação pós-traducional de proteínas chaves na transdução de sinal e é essencial nesse fungo; existem outras 7 estruturas cristalográficas da proteína farnesiltransferase (FTase) em complexo com peptídeos, inibidor transferase ou outras moléculas (Hast *et al.*, 2011). Estas proteínas podem ser consideradas alvos para antifúngicos promissores contra o fungo patogênico humano *C.*

neoformans. Estes estudos estruturais são um elemento essencial porque manifestam “insights” sobre a resistência às drogas e sugerem estratégias para o desenvolvimento de inibidores fungo-específicos, revelando semelhanças e diferenças entre o patógeno e o hospedeiro que podem ser exploradas. Morrow e cols. (2012) e Hast e cols. (2011) desenvolveram seus trabalhos anteriormente citados, onde as proteínas foram expressas em *E. coli* nas cepas de expressão BL21 (DE3)pLysS, e BL21(DE3) induzidas com IPTG 1 mM por 5 e 3 h, respectivamente, e as proteínas recombinantes foram utilizadas nos ensaios de cristalografia.

No ano de 2010, Oliveira e cols. demonstraram que as interações de Trr1 de *S. cerevisiae* com o FAD são muito similares as encontradas em Trr de baixa massa molecular em outros organismos como *Mycobacterium tuberculosis* (Akif *et al.*, 2008), *Arabidopsis thaliana* (Dai *et al.*, 1996), *Helicobacter pylori* (Gustafsson *et al.*, 2007), e *E. coli* (Waksman *et al.*, 1994) (Oliveira *et al.*, 2010). Zhang e cols. (2009) relataram a estrutura cristalográfica de ScTrr1 citoplasmática de *S. cerevisiae*. A análise estrutural revelou poucas variações (2 resíduos) nos sítios de ligação da Trx potenciais em comparação com Trr de *E. coli* que pode contribuir para o reconhecimento espécie-específico da Trx. Além disso, as estruturas de ScTrr1 e seus substratos darão mais esclarecimentos da transferência de elétrons entre as moléculas durante o estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2009).

Estudos posteriores a este trabalho serão realizados para dar continuidade às análises das estruturas Trr1 e Trx1 de *C. neoformans*. Será realizado o refinamento das condições para a formação de material cristalino ideal para a resolução da estrutura 3D de cada proteína. O conhecimento do arranjo tridimensional dos átomos na molécula vai permitir conhecer com precisão a forma com que cada proteína exerce sua função e fornecerá informações sobre os mecanismos enzimáticos da proteína e seu substrato.

6.5 Ensaios de atividade antifúngica *in vitro*

Três das quatro moléculas que interagem com a proteína Trr1 de *C. neoformans*, selecionadas por varredura virtual (Anexo), foram utilizadas em ensaios *in vitro* para avaliar suas atividades antifúngicas. Estas 4 moléculas inibidoras foram recentemente adquiridas e três foram testadas contra *C. neoformans* (H99). O protocolo utilizado foi o de microdiluição em caldo para determinação da sensibilidade da levedura aos compostos inibidores. No entanto, problemas de precipitação das moléculas que encontravam-se a uma concentração de 25 mg/ml ocorreram nestes ensaios quando foram diluídas em meio RPMI 1640 pH 7.0 com

0,165 M de MOPS a temperatura ambiente, e por essa razão não foi possível avaliar a atividade antifúngica em *C. neoformans*. Ensaios de inibição serão realizados em experimentos futuros por meio de modificações no protocolo (adição de pequenas quantidades da droga para evitar a turbidez da solução ou aquecer a mistura até dissolver) para impedir a precipitação das drogas e verificar se estas moléculas apresentarão atividade antifúngica.

7. CONCLUSÕES

- Os genes *TRR1* e *TRX*, sintetizados com códons preferenciais para *E. coli*, foram confirmados inseridos no vetor pET21a::inserto
- Foi feita a transformação das cepas de *E. coli* com o plasmídeo pET21a contendo os genes *TRR1* ou *TRX1* de *C. neoformans* (H99).
- Os genes *TRR1* e *TRX1* foram expressos utilizando *E. coli* BL21(DE3) e BL21 (DE3)pLysE, respectivamente.
- A melhor condição encontrada para a expressão dos genes foi a 37 °C, em meio LB e com a indução de 1mM de IPTG por 6 horas.
- As proteínas recombinantes Trr1 e Trx1 foram produzidas em forma solúvel.
- As proteínas recombinantes Trr1 e Trx1 foram isoladas e purificadas com sucesso a partir do uso de cromatografia por afinidade em coluna de Ni-Sepharose.
- A enzima recombinante Trr1 apresentou atividade catalítica. Os valores das constantes catalíticas, K_m e $V_{máx}$, para o substrato Trx1 foram determinados, $K_m = 1,479 \mu M$; $V_{máx} = 4,109 \text{ nM/s}$.
- As condições iniciais para obtenção dos cristais da proteína Trx1 foram estabelecidas a uma concentração de 8,65 mg/mL com sulfato de amônio 2 M, aquelas condições para cristalização da proteína Trr1 ainda estão em fase de procura.
- A estrutura da proteína-alvo Trr1 de *C. neoformans* foi predita por modelagem molecular por homologia em colaboração com o Prof. Bernard Maigret da França (**Anexo**).
- A partir de varredura virtual de quimiotecas, 4 moléculas que interagem com Trr1 foram selecionadas (**Anexo**).

8. PERSPECTIVAS

Considerando as discussões realizadas acima, esta dissertação ainda contém vários passos que devem ser realizados:

- A expressão e purificação de Trr1 e Trx1 aqui descritas permitirão a caracterização estrutural da enzima e seu substrato. A resolução da estrutura tridimensional destas proteínas será um aporte importante para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.
- Obter quantidades suficientes de proteína purificada para futuros ensaios de cristalização das proteínas. Até o momento a parte experimental está sendo realizada no Laboratório de Biofísica da UnB e os resultados prévios que se encontram nesta dissertação serão intensificados para a confirmação e determinação da estrutura cristal da proteína Trr1 e seu substrato Trx1 de *C. neoformans*.
- Caracterização das propriedades físico-químicas das proteínas Trr1 e Trx1 através das técnicas de dicroísmo circular (CD) e espalhamento dinâmico de luz (DLS).
- Realização dos ensaios de inibição da atividade enzimática Trr1 com as moléculas selecionadas que apresentarem atividade antifúngica contra *C. neoformans*.
- Testes da atividade antifúngica *in vitro* para determinar o MIC das moléculas selecionadas que interagem com *C. neoformans*.
- Testes *in vivo* para determinar a atividade antifúngica das moléculas no modelo de infecção animal pelo patógeno *C. neoformans*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadio, A. K. R., Kioshima, E. S., Teixeira, M. M., *et al.* (2011). Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC genomics*, 12(1), 75.
- Abadio *et al.* (2012). Pós-genoma de fungos patogênicos humanos: identificação de novas drogas contra os alvos moleculares TRR1 e KRE2 de *Paracoccidioides lutzii*. Tese de doutorado desenvolvida no laboratório de Biologia molecular da UnB. Programa de Pós-graduação em Biologia molecular. Brasília.
- Abagyan, R., e Totrov, M. (2001). High-throughput docking for lead generation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 375-382.
- Abdullah, N., e Chase, H. A. (2005). Removal of poly-histidine fusion tags from recombinant proteins purified by expanded bed adsorption. *Biotechnology and bioengineering*, 92(4), 501-513.

- Akif, M., Khare, G., Tyagi, A. K., Mande, S. C., e Sardesai, A. A. (2008). Functional studies of multiple thioredoxins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7087-7095.
- Aminnejad, M., Diaz, M., Arabatzis, M., *et al.* (2012). Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*, 173(5-6), 337-346.
- Arnér, E. S., e Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6102-6109.
- Baker, M. (2010). Making membrane proteins for structures: a trillion tiny tweaks. *Nature methods*, 7(6), 429.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 411-421.
- Beautrait, A., Leroux, V., Chavent, M., *et al.* (2008). Multiple-step virtual screening using VSM-G: overview and validation of fast geometrical matching enrichment. *Journal of molecular modeling*, 14(2), 135-148.
- Bii, C. C., Makimura, K., Abe, S., *et al.* (2007). Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*, 50(1), 25-30.
- Bill, R. M., Henderson, P. J., Iwata, S., *et al.* (2011). Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature biotechnology*, 29(4), 335-340.
- Blackstock, R., Buchanan, K. L., Cherniak, R., *et al.* (1999). Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* is associated with quantitative differences in multiple virulence factors. *Mycopathologia*, 147(1), 1-11.
- Bleicher, K. H., Böhm, H.-J., Müller, K., e Alanine, A. I. (2003). Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nature reviews Drug discovery*, 2(5), 369-378.
- Boumis, G., Angelucci, F., Bellelli, A., *et al.* (2011). Structural and functional characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Protein Science*, 20(6), 1069-1076.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N., *et al.* (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4(165), 165rv113.
- Casadevall, A., e Perfect, J. R. (1998). *Cryptococcus neoformans* (Vol. 595): ASM press Washington, DC.
- Casadevall, A., Steenbergen, J. N., e Nosanchuk, J. D. (2003). ‘Ready made’ virulence and ‘dual use’ virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current opinion in microbiology*, 6(4), 332-337.

- Cavasotto, C. N., e Phatak, S. S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today*, 14(13), 676-683.
- Congreve, M., Murray, C. W., e Blundell, T. L. (2005). Keynote review: Structural biology and drug discovery. *Drug discovery today*, 10(13), 895-907.
- Cowen, L. E., e Steinbach, W. J. (2008). Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic cell*, 7(5), 747-764.
- Craig, I. R., Essex, J. W., e Spiegel, K. (2010). Ensemble docking into multiple crystallographically derived protein structures: an evaluation based on the statistical analysis of enrichments. *Journal of chemical information and modeling*, 50(4), 511-524.
- Chaga, G. S. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1), 313-334.
- Chang, Y. C., Bien, C. M., Lee, H., Espenshade, P. J., e Kwon-Chung, K. J. (2007). Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 64(3), 614-629.
- Chapman, S. W., Sullivan, D. C., e Cleary, J. D. (2008). In search of the holy grail of antifungal therapy. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 119, 197.
- Chong, C. R., e Sullivan, D. J. (2007). New uses for old drugs. *Nature*, 448, 645-646.
- da Silva Dantas, A., Patterson, M. J., Smith, D. A., *et al.* (2010). Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. *Molecular and cellular biology*, 30(19), 4550-4563.
- Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., *et al.* (1996). Crystal Structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH Dependent Thioredoxin Reductase at 2.5 Å Resolution. *Journal of molecular biology*, 264(5), 1044-1057.
- de Oliveira, M. A., Discola, K. F., Alves, S. V., *et al.* (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(4), 387-390.
- Demain, A. L., e Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297-306.
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet*, 362(9390), 1142-1151.
- Doering, T. L. (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual review of microbiology*, 63, 223.

- Enjalbert, B., Nantel, A., e Whiteway, M. (2003). Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Molecular biology of the cell*, 14(4), 1460-1467.
- Erjavec, Z., Kluin-Nelemans, H., e Verweij, P. (2009). Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(7), 625-633.
- Fanos, V., e Cataldi, L. (2000). Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *Journal of chemotherapy*, 12(6), 463-470.
- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., e Casadevall, A. (2000). *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infection and immunity*, 68(7), 4225-4237.
- Felipe, M. S. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., *et al.* (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24706-24714.
- Forster, M. J. (2002). Molecular modelling in structural biology. *Micron*, 33(4), 365-384.
- Gasteiger, J., Rudolph, C., e Sadowski, J. (1990). Automatic generation of 3D-atomic coordinates for organic molecules. *Tetrahedron Computer Methodology*, 3(6), 537-547.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387-391.
- Giles, S. S., Dagenais, T. R. T., Botts, M. R., Keller, N. P., e Hull, C. M. (2009). Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 77(8), 3491-3500.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., *et al.* (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22480-22489.
- Gon, S., Faulkner, M. J., e Beckwith, J. (2006). In vivo requirement for glutaredoxins and thioredoxins in the reduction of the ribonucleotide reductases of *Escherichia coli*. *Antioxidants & redox signaling*, 8(5-6), 735-742.
- Granados, D. P., e Castañeda, E. (2006). Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992–2004. *FEMS yeast research*, 6(4), 636-644.
- Gustafsson, T. N., Sahlin, M., Lu, J., Sjöberg, B.-M., e Holmgren, A. (2012). *Bacillus anthracis* thioredoxin systems, characterization and role as electron donors for ribonucleotide reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39686-39697.
- Gustafsson, T. N., Sandalova, T., Lu, J., Holmgren, A., e Schneider, G. (2007). High-resolution structures of oxidized and reduced thioredoxin reductase from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(7), 833-843.

- Hagen, F., Illnait-Zaragozi, M.-T., Bartlett, K. H., *et al.* (2010). In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 5139-5145.
- Hannig, G., e Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 16(2), 54-60.
- Hast, M. A., Nichols, C. B., Armstrong, S. M., *et al.* (2011). Structures of *Cryptococcus neoformans* protein farnesyltransferase reveal strategies for developing inhibitors that target fungal pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 35149-35162.
- Havlickova, B., Czaika, V. A., e Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51(s4), 2-15.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- Heitman, J., Kozel, T., Kwon-Chung, K., Perfect, J., e Casadevall, A. (2011). *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*: ASM press Washington, DC.
- Hillisch, A., Pineda, L. F., e Hilgenfeld, R. (2004). Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug discovery today*, 9(15), 659-669.
- Hirt, R. P., Müller, S., Martin Embley, T., e Coombs, G. H. (2002). The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends in parasitology*, 18(7), 302-308.
- Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *European Journal of Biochemistry*, 6(4), 475-484.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 237-271.
- Holmgren, A. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 3(3), 239-243.
- Holmgren, A. (2000). Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxidants & redox signaling*, 2(4), 811-820.
- Hu, G., e Kronstad, J. W. (2010). A putative P-type ATPase, Apt1, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 9(1), 74-83.
- Hu, W., Sillaots, S., Lemieux, S., *et al.* (2007). Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens*, 3(3), e24.
- Humphrey, W., Dalke, A., e Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.

- Idnurm, A., Bahn, Y.-S., Nielsen, K., *et al.* (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 753-764.
- Jain, N., Wickes, B., Keller, S., *et al.* (2005). Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5733-5742.
- Jana, S., e Deb, J. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(3), 289-298.
- Janbon, G., e Doering, T. (2011). Biosynthesis and genetics of the *Cryptococcus* capsule. *Cryptococcus. From human Pathogen to Model Yeast*, 27-41.
- Jarvis, J. N., e Harrison, T. S. (2007). HIV-associated cryptococcal meningitis. *Aids*, 21(16), 2119-2129.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P. A., e Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 35(2), 91-105.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D., Loeffler, R., e Kelly, S. L. (1995). Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(7), 1526-1529.
- Kairys, V., Fernandes, M. X., e Gilson, M. K. (2006). Screening drug-like compounds by docking to homology models: a systematic study. *Journal of chemical information and modeling*, 46(1), 365-379.
- Kanafani, Z. A., e Perfect, J. R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 120-128.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., e Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211.
- Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., *et al.* (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(19), 5678-5698.
- Khlebnikov, A., e Keasling, J. D. (2002). Effect of lacY Expression on Homogeneity of Induction from the Ptac and Ptrc Promoters by Natural and Synthetic Inducers. *Biotechnology progress*, 18(3), 672-674.
- Kontou, M., Will, R. D., Adelfalk, C., *et al.* (2004). Thioredoxin, a regulator of gene expression. *Oncogene*, 23(12), 2146-2152.
- Kraemer, O., Hazemann, I., Podjarny, A. D., e Klebe, G. (2004). Virtual screening for inhibitors of human aldose reductase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(4), 814-823.

- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., *et al.* (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 193-203.
- Kwon-Chung, K. J., e Varma, A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS yeast research*, 6(4), 574-587.
- Lai, C.-C., Tan, C.-K., Huang, Y.-T., Shao, P.-L., e Hsueh, P.-R. (2008). Current challenges in the management of invasive fungal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 14(2), 77-85.
- Lee, S., Kim, S. M., e Lee, R. T. (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), 1165-1207.
- Lennon, B. W., Williams, C. H., e Ludwig, M. L. (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science*, 289(5482), 1190-1194.
- Lewis, R. E. (2011). *Current concepts in antifungal pharmacology*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 401-416.
- Lin, X., e Heitman, J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 69-105.
- Liu, M., Healy, M. D., Dougherty, B. A., *et al.* (2006). Conserved fungal genes as potential targets for broad-spectrum antifungal drug discovery. *Eukaryotic cell*, 5(4), 638-649.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Tacca, M. D., e Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in molecular medicine*, 8(2), 76-81.
- Mark, D. F., e Richardson, C. C. (1976). *Escherichia coli* thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(3), 780-784.
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., *et al.* (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29(1), 291-325.
- Martinez, L. R., e Casadevall, A. (2006). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(3), 1021-1033.
- Maxson, M. E., Dadachova, E., Casadevall, A., e Zaragoza, O. (2007). Radial mass density, charge, and epitope distribution in the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Eukaryotic cell*, 6(1), 95-109.

- McFadden, D., e Casadevall, A. (2001). Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, 39(1), 19-30.
- Missall, T. A., e Lodge, J. K. (2005a). Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. *Molecular microbiology*, 57(3), 847-858.
- Missall, T. A., e Lodge, J. K. (2005b). Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 4(2), 487-489.
- Missall, T. A., Pusateri, M. E., e Lodge, J. K. (2004). Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*, 51(5), 1447-1458.
- Moore, E. C., Reichard, P., e Thelander, L. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, 239(10), 3445-3452.
- Morrow, C. A., Valkov, E., Stamp, A., *et al.* (2012). De novo GTP Biosynthesis Is Critical for Virulence of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS pathogens*, 8(10), e1002957.
- Ni, Y., e Chen, R. (2009). Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, 31(11), 1661-1670.
- Nosanchuk, J. D., e Casadevall, A. (1997). Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infection and immunity*, 65(5), 1836-1841.
- Olivares, L. C., Martínez, K. M., Cruz, R. B., *et al.* (2009). Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Medical Mycology*, 47(7), 713-721.
- Oliveira, M. A., Discola, K. F., Alves, S. V., *et al.* (2010). Insights into the Specificity of Thioredoxin Reductase– Thioredoxin Interactions. A Structural and Functional Investigation of the Yeast Thioredoxin System. *Biochemistry*, 49(15), 3317-3326.
- Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C., e Rex, J. H. (2010). An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature reviews Drug discovery*, 9(9), 719-727.
- Palumbi, S. R. (2001). Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293(5536), 1786-1790.
- Pappas, P. G., Perfect, J. R., Cloud, G. A., *et al.* (2001). Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 33(5), 690-699.

- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., *et al.* (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525-530.
- Pemán, J., e Salavert, M. (2012). [General epidemiology of invasive fungal disease]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 30(2), 90-98.
- Perfect, J. R. (2006). *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS yeast research*, 6(4), 463-468.
- Pfaller, M., e Diekema, D. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133-163.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Diekema, D. J., Messer, S. A., e Jones, R. N. (2011). Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 71(3), 252-259.
- Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., e López-Ribot, J. L. (2013). Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*.
- Plewczynski, D., Philips, A., von Grotthuss, M., Rychlewski, L., e Ginalski, K. (2010). HarmonyDOCK: the structural analysis of poses in protein-ligand docking. *Journal of Computational Biology*.
- Posteraro, B., Sanguinetti, M., Sanglard, D., *et al.* (2003). Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Molecular microbiology*, 47(2), 357-371.
- Pyrgos, V., Seitz, A. E., Steiner, C. A., Prevots, D. R., e Williamson, P. R. (2013). Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997–2009. *PloS one*, 8(2), e56269.
- QIAexpressionist, A. (2002). A handbook for high-level expression and purification of 6xhis-tagged proteins. *Qiagen*. p1–125.
- Reckenfelderbäumer, N., Lüdemann, H., Schmidt, H., Steverding, D., e Krauth-Siegel, R. L. (2000). Identification and functional characterization of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7547-7552.
- Rispail, N., Soanes, D. M., Ant, C., *et al.* (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium–calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 46(4), 287-298.
- Ritz, D., e Beckwith, J. (2001). Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 21-48.

- Rodrigues, M. L., Nimrichter, L., Oliveira, D. L., *et al.* (2007). Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic cell*, 6(1), 48-59.
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., *et al.* (2003). Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular microbiology*, 50(1), 167-181.
- Ruocco, M., Ruggiero, A., Masullo, L., Arcari, P., e Masullo, M. (2004). A 35 kDa NAD (P) H oxidase previously isolated from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is instead a thioredoxin reductase. *Biochimie*, 86(12), 883-892.
- Sable, C. A., Strohmaier, K. M., e Chodakewitz, J. A. (2008). Advances in antifungal therapy. *Annu. Rev. Med.*, 59, 361-379.
- Saïdani, N., Grando, D., Valadié, H., Bastien, O., e Maréchal, E. (2009). Potential and limits of *in silico* target discovery—Case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(3), 359-367.
- Sambrook, J. (1989). Fritsch. EF and Maniatis. T.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*, 267, 9289-9293.
- Sambrook, J., e Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 1): CSHL press.
- Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., e Schneider, G. (2001). Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9533-9538.
- Shapiro, R. S., Robbins, N., e Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 213-267.
- Sheng, C., Miao, Z., Ji, H., *et al.* (2009). Three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(8), 3487-3495.
- Sionov, E., Lee, H., Chang, Y. C., e Kwon-Chung, K. J. (2010). *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS pathogens*, 6(4), e1000848.
- Stahura, F. L., e Bajorath, J. (2004). Virtual screening methods that complement HTS. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 7(4), 259-269.
- Stephen, C., Lester, S., Black, W., Fyfe, M., e Raverty, S. (2002). British Columbia: Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *The Canadian Veterinary Journal*, 43(10), 792.

- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 523-533.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211-222.
- Theobald, A. J., Caballero, I. n., Coma, I., *et al.* (2012). Discovery and biochemical characterization of plasmodium thioredoxin reductase inhibitors from an antimalarial set. *Biochemistry*, 51(23), 4764-4771.
- Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., e Brakhage, A. A. (2007). The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* impact on development and oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 27259-27269.
- Uziel, O., Borovok, I., Schreiber, R., Cohen, G., e Aharonowitz, Y. (2004). Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. *Journal of bacteriology*, 186(2), 326-334.
- Ventura, S. (2005). Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 11.
- Villaverde, A., e Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters*, 25(17), 1385-1395.
- Vitkup, D., Melamud, E., Moulton, J., e Sander, C. (2001). Completeness in structural genomics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(6), 559-566.
- Voelz, K., e May, R. C. (2010). Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic cell*, 9(6), 835-846.
- Waksman, G., Krishna, T. S., Williams Jr, C. H., e Kuriyan, J. (1994). Crystal Structure of *Escherichia coli* Thioredoxin Reductase Refined at 2 Å Resolution: Implication for a Large Conformational Change during Catalysis. *Journal of molecular biology*, 236(3), 800-816.
- Wang, Q., Hou, Y., Qu, J., *et al.* (2013). Molecular cloning, expression, purification and characterization of thioredoxin from Antarctic sea-ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. AN178. *Molecular biology reports*, 1-5.
- Werner, T., Morris, M. B., Dastmalchi, S., e Church, W. B. (2012). Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions. *Advanced drug delivery reviews*, 64(4), 323-343.
- Williams, C. H., Arscott, L. D., Müller, S., *et al.* (2001). Thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6110-6117.
- Williams, C. H., Arscott, L. D., Müller, S., *et al.* (2000). Thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), 6110-6117.

- Zaki, N., Bakar, F., Mahadi, N., e Murad, A. (2012). *Candida albicans* TRR1 heterozygotes show increased sensitivity to oxidative stress and decreased pathogenicity. *African Journal of Microbiology Research*, 6(8), 1796-1805.
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., *et al.* (2009). The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*, 68, 133-216.
- Zhang, Z., Bao, R., Zhang, Y., *et al.* (2009). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic thioredoxin reductase Trr1 reveals the structural basis for species-specific recognition of thioredoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(1), 124-128.

10. ANEXO

Estudos de modelagem molecular e varredura virtual para determinar moléculas com potencial inibitório do alvo molecular Trr1 de *C. neoformans*.

Esses estudos foram realizados pelas Doutoradas Erika Seki Kioshima e Ana Karina Rodrigues Abadio em colaboração com o Prof. Dr. Bernard Maigret do grupo do LORIA na França, na Universidade Henri Poincaré, Nancy I. Todos os dados mostrados ainda não foram publicados, mas os autores autorizam a divulgação dos resultados nesse anexo da dissertação de mestrado.

Estes resultados do anexo junto com os anteriormente citados nesta dissertação de mestrado, encontram-se alinhados e são dependentes de o projeto de pesquisa maior: “Pós-genoma de fungos patogênicos humanos visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, PRONEX/FAP-DF/CNPq”, que busca o desenvolvimento de novas drogas baseado na problemática mundial de resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis ou ainda na incapacidade destes atuarem em alguns fungos patogênicos, bem como no grave problema de toxicidade/efeitos colaterais causados pelas drogas existentes.

RESUMO

Três moldes foram selecionados para modelagem por homologia da proteína tioredoxina redutase (Trr1): um de *S. cerevisiae* na conformação oxidada e dois de *E. coli* na conformação reduzida. Na segunda conformação reduzida, a estrutura 3D da tioredoxina redutase está complexada a tioredoxina, análogo de NADP⁺ é AADP⁺. Desta forma, três modelos de TRR1 foram construídos para *Cryptococcus neoformans*.

Os modelos foram submetidos à simulações de dinâmica molecular (DM). As análises dos valores de RMSd ao longo das simulações de DM mostram-se estáveis. As estruturas secundárias foram preservadas ao longo da simulação, sendo que a conformação oxidada da Trr1 sempre mostrou-se mais estável que a conformação reduzida e complexada da Trr1. As análises de agrupamento das principais famílias de conformações, para cada um dos modelos, foram realizadas e os *frames* centrais de cada família de conformação selecionadas para o *docking*. Do banco de dados de compostos químicos da *Life Chemicals* foram pré-selecionadas 3.000 moléculas com propriedades *drug-like* e diversidade química. A este número foram adicionadas 1080 moléculas, que são análogas a 3 moléculas deste banco com atividade antifúngica previamente avaliadas (que interagem com resíduos do sitio ativo de Kre2 e Trr1 de *P. brasiliensis* (Abadio *et al.*, comunicação pessoal).

METODOLOGIA

Modelagem molecular das proteínas

O processo de obtenção das estruturas teóricas das proteínas-alvo por modelagem molecular e homologia estrutural envolveu quatro etapas: 1. Busca de proteínas ortólogas 2. Alinhamento das sequências 3. Construção dos modelos 4. Otimização e refinamento dos modelos. O primeiro passo foi a identificação da estrutura tridimensional que possa atuar como uma base para modelagem da sequência alvo. Para tal foi realizado o alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas de interesse contra o banco de dados de estruturas de proteínas *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) utilizando o programa BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih/BLAST>). Uma vez obtida uma lista de estruturas molde, foi necessário selecionar aqueles com melhores resultados com base na homologia e na maior porcentagem de identidade de sequência. Foi feito o alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos da proteína de interesse contra o banco de dados de estruturas de proteínas, obtendo uma lista de estruturas molde que tenham os melhores

resultados com base na homologia e na maior porcentagem de identidade de sequência. Trr1 a partir de análise de genômica comparativa mostrou em estudos realizados pelo nosso grupo, uma identidade de sequência primária acima de 40% com as sequências das estruturas 3D encontradas no PDB.

As outras etapas de obtenção das estruturas teóricas das proteínas alvo foram realizadas usando um modelo de homologia. As sequências alvo foram alinhadas manualmente com as sequências primárias das estruturas-molde, verificando o alinhamento dos resíduos de cisteína que participam de pontes dissulfeto. A construção do modelo foi feita a partir dos moldes, onde as coordenadas atômicas foram transferidas para o alvo Trr1. As regiões do alinhamento que não eram conservadas foram convertidas em loops. O programa sugeriu vários loops, sendo escolhidos os mais abertos e com menor RMSD (*Root Mean Square Deviation*). A finalização da construção dos modelos foi feita com a adição dos átomos de hidrogênio. Para a otimização e refinamento dos modelos teóricos foi realizada a minimização de energia, e a visualização dos modelos foi obtida pelo programa PyMOL versão 0.99rc6 (Delano Scientific, www.pymol.org).

Varredura virtual

A proposta seguiu a metodologia denominada VSM-G (*virtual screening manager for computational grids*) (Beautrait *et al.*, 2008) para realizar a varredura de possíveis moléculas que possam bloquear a ação da proteína-alvo Trr1. Esta etapa foi realizada por membros do grupo da UnB na França, tendo em vista que este projeto faz parte de uma proposta maior. A metodologia foi definida em três etapas principais: preparação da molécula alvo, preparação dos ligantes e processo de seleção dos compostos por ancoragem molecular (*docking*).

Preparação das proteínas alvo

Os modelos teóricos da proteína-alvo Trr1 foram primeiramente submetidos a simulações de dinâmica molecular, a fim de obter modelos com arranjo mais precisos e com um melhor relaxamento. Para isto, a proteína foi inicialmente solvatada em uma caixa de moléculas de água de 80 X 80 X 80 Å³ para simular o meio biológico de uma forma mais próxima da realidade, utilizando o programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey *et al.*, 1996).

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas em três etapas: minimização da energia, equilíbrio do sistema e dinâmica molecular. Os sistemas foram inicialmente minimizados energeticamente para localizar as conformações de menor energia. Durante o equilíbrio do sistema, a simulação foi conduzida até que as propriedades do sistema como energia potencial e energia total mantenha-se controladas. O tempo de simulação de equilíbrio foi de 0,5 ns. Quando o sistema alcançou o equilíbrio, as simulações de dinâmica molecular foram então realizadas por cálculos de aceleração, velocidade e posições das partículas para cada intervalo de tempo de simulação de 1fs (tempo de integração). Uma vez que a força total sobre cada partícula foi calculada, as equações de movimento determinaram as novas coordenadas de todas as partículas. O cálculo das forças e das equações de movimento foi repetido até gerar uma trajetória correspondente ao tempo de simulação de 10 ns. Todas as simulações foram mantidas sob pressão e temperatura constantes de 1 atm e 300K, respectivamente.

Preparação dos ligantes

Os ligantes utilizados são moléculas presentes nos bancos de dados. Dois procedimentos de filtragem foram realizados: i) submissão das moléculas dos bancos ao programa *Filter* do *OpenEye* (<http://www.eyesopen.com/filter>) para eliminar as moléculas que não são *drug-like*; e ii) realização de teste de diversidade química a partir do cálculo do Índice de Tanimoto (T). Os parâmetros utilizados pelo programa Filter para realizar a filtragem das moléculas foram:

- 350 Da < massa molecular < 650 Da
- 9 < número de átomos pesados < 55
- 0 < número de anéis < 5
- Máximo de 10 grupos funcionais
- Máximo de 25 rotâmetros
- Máximo de 9 grupos doadores de ligações de H
- Máximo de 13 grupos aceptores de ligações de H
- Eliminação de moléculas tóxicas
- Eliminação de moléculas insolúveis.

O teste de diversidade química por meio do cálculo do Índice de Tanimoto (T) permitiu mensurar a similaridade entre duas moléculas por um ponto de vista químico. Com base neste

procedimento de pré-seleção, o número de compostos foi reduzido para 3.000 moléculas. Os compostos dos bancos de dados selecionados por esses filtros foram pre-processados, passando de estruturas bidimensionais para tridimensionais por meio do programa CORINA (Gasteiger *et al.*, 1990), tornando-se assim adequados para o programa subsequente de *docking*. Estados de protonação foram assumidos no estabelecimento de normas, como sugerido pelo programa Corina e pelo display gráfico.

Processo de seleção dos compostos por ancoragem molecular (docking)

Antes da simulação de *docking*, as cavidades da proteína Trr1 foram identificadas por meio do programa MDPocket. Esse programa baseia-se no mapeamento da superfície do sítio de ligação da proteína. Após a identificação das cavidades, as coordenadas do centro de origem das cavidades foram fornecidas pelo programa Ligsite.

As simulações de ancoragem molecular foram realizadas pelo programa GOLD 3.2 que permite flexibilidade parcial no receptor na região do sítio ativo, realizando assim um cálculo de interação semi-flexível com os compostos. Para filtrar os melhores compostos, para cada molécula analisada o programa realizou 50 ensaios de *docking* com a proteína-alvo. Para considerar confiável a ligação entre as moléculas e a proteína-alvo, foram assumidas apenas as conformações com valores de RMSD abaixo de 1,5 Å.

Para encaixar o ligante no sítio de ligação da proteína, o programa usou um método baseado na fixação de pontos onde ocorre ligação de hidrogênio. Assim, foi construído um mapa com os pontos aceptores de hidrogênio no ligante e os doadores de hidrogênio na proteína, e vice-versa, e, com isso, foram identificadas as moléculas que interagem com a proteína-alvo. O programa também considerou pontos hidrofóbicos na cavidade das proteínas.

A classificação das melhores moléculas foi baseada nos valores de *scores*, ou seja, nas afinidades de ligação preditas. Os valores de *score* foram obtidos baseados em: ligações de hidrogênio com a proteína; interações de van der Waals com a proteína; ligações de hidrogênio intramoleculares no ligante; e forças intramoleculares no ligante. Os ligantes com maiores scores são classificados como os que possuem melhores afinidades de ligação com a proteína. Dessa forma, o programa fornece um *rank* com os melhores ligantes.

RESULTADOS

Modelagem por homologia da proteína Trr1 e varredura virtual de quimiotecas

1. Simulações de dinâmica molecular para os modelos obtidos para tioredoxina redutase

A primeira etapa da modelagem por homologia para obtenção das estruturas teóricas da proteína-alvo foi a identificação de estruturas tridimensionais que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da sequência-alvo. Três moldes foram selecionados. Um de *S. cerevisiae* na conformação oxidada: 3ITJ (PDB ID) e dois de *E. coli* na conformação reduzida: 1CL0 (PDB ID) e 1F6M (PDB ID). No molde 1CL0, a estrutura tridimensional deposita no PDB contém somente a proteína na conformação reduzida, já no molde 1F6M a estrutura 3D da tioredoxina redutase está complexada a tioredoxina, análogo de NADP⁺ e AADP⁺. Foi realizado o alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas de interesse contra o banco de dados de estruturas de proteínas *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) utilizando o programa BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih/BLAST>). A Trr1 de *Cryptococcus neoformans* apresentaram identidade de sequência primária acima de 40% com as sequências das estruturas 3D escolhidas e depositadas no PDB (3ITJ, 1CL0 e 1F6M).

A construção dos modelos foi feita a partir dos moldes e as coordenadas atômicas foram transferidas para a tioredoxina redutase. As regiões do alinhamento que não eram conservadas foram convertidas em loops. O programa sugeriu vários loops, sendo escolhidos os mais abertos e com menor RMSD. A finalização da construção dos modelos foi feita com a adição dos átomos de hidrogênio e seu refinamento foi obtido por meio de minimização de energia. Os átomos da cadeia principal foram inicialmente imobilizados e apenas as cadeias laterais se moviam para realizar uma minimização de energia pelo método de gradiente conjugado. Uma segunda minimização, também pelo método de gradiente conjugado, foi realizada somente com os átomos dos loops em movimento. A última etapa de minimização foi realizada pelo método *Steepest-descent* com todos os átomos móveis, resultando em estruturas tridimensionais refinadas. A **Figura 1A** mostra a sobreposição dos três modelos de Trr1 obtidos para *C. neoformans*. A conformação oxidada (**Figura 1B**) sofre um giro sobre o eixo de maneira a aproximar o domínio de ligação ao NADPH e as cisteínas, do domínio de ligação ao FAD adquirindo a conformação reduzida.

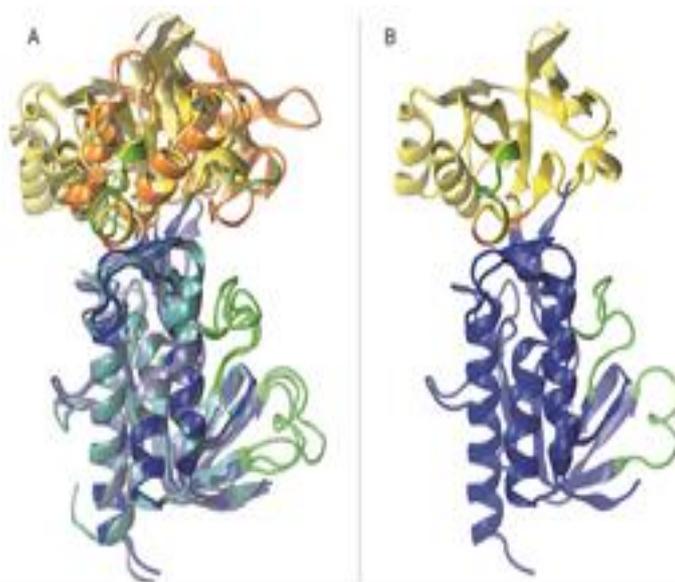


Figura 1. Representação dos modelos obtidos para tioredoxina redutase de *Cryptococcus neoformans*. (A) sobreposição dos três modelos obtidos para conformações, oxidada - FO (B). O domínio de ligação ao NADPH é representado em amarelo, na conformação FO. Já o domínio de ligação ao FAD é representado pela cor azul, na conformação FO. As cisteínas do sítio catalítico são representadas em vermelho no domínio de ligação ao NADPH. Neste domínio também são representados em verde os resíduos do bolso hidrofóbico (AVPI) importante para estabilização da ligação a tioredoxina. No domínio de ligação ao FAD a estrutura marcada em verde representa o loop 1, aonde estão localizados os aminoácidos importantes para interação com a tioredoxina.

A estabilidade dos modelos durante as simulações foram avaliadas inicialmente pelo monitoramento do perfil de RMSd (*Root-Mean-Square deviation*), que é a medida da distância média entre os átomos da cadeia principal ao longo da trajetória do sistema. Os valores de RMSd obtidos para conformação FO variaram entre 1.126 e 3.709 (média 2.539 ± 0.444 Å), para conformação FR entre 1.163 e 4.529 Å (média 3.374 ± 0.748 Å) e para conformação FRC entre 1.121 e 3.538 Å (média 2.520 ± 0.491 Å). Na trajetória da conformação FR existe uma zona mais estável entre as frames 250 e 450, porém ao final da trajetória os valores de RMSd parecem começar a subir, sugerindo a existência de mais uma família de conformação e que portanto, 10 ns poderiam não ser suficientes para estabilização desta conformação.

2. Análises da Estrutura Secundária dos modelos ao longo da trajetória de dinâmica molecular

A estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido foi analisada ao longo da trajetória da dinâmica molecular pelo programa VMD, com *plugin Timeline*. As análises da estrutura

secundária dos modelos de *C. neoformans* revelam que aparentemente a conformação FO é a mais estável e a FRC a menos estável, considerando todos os resíduos de aminoácidos da proteína ao longo da trajetória. Algumas regiões merecem destaque como: sítio catalítico, loop 1 e as regiões dos resíduos Asp118 a Glu136, Lys298 a Asp316 e a α -hélice (Pro157 a Tyr162).

Na região do sítio catalítico, a Cys170 não apresenta estrutura definida na conformação FO, porém na conformação FR e frames finais da FRC, há o predomínio de estruturas do tipo laço. Estruturas do tipo α -hélice são predominantes na conformação FRC e as do tipo laço na conformação FR. Na região hidrofóbica AVPI (Ala176, Val177, Pro178 e Ile179) observa-se uma alternância de estruturas do tipo hélice e laço. A conformação FO alterna estruturas do tipo 310-hélices e laço.

A região do loop1 inicia-se com ausência de estruturas definidas para as três conformações. Na conformação FRC esta região sem estrutura definida é maior do que nas outras duas conformações, se estendendo até a Ala64. No entanto, após este resíduo a região se mantém estável com predomínio de estruturas do tipo laço. Por outro lado, a conformação FR é a mais instável nesta região, há um predomínio de estruturas do tipo laço, que são interrompidas por estruturas do tipo hélice (α -hélice e 310-hélices) ou regiões sem estrutura definida.

A região entre os resíduos Asp118 e Glu136 mostrou-se como uma região muito variável entre as três conformações. Para conformação FO é uma região de modo geral estável, somente são observadas algumas instabilidades nas frames iniciais entre os resíduos Trp127 e Glu136. Para conformação FR é uma região relativamente instável, com várias interrupções da estrutura, principalmente entre os resíduos Trp127 e Glu136. Já para conformação FRC a região entre os resíduos Trp127 e Glu136 é estável com predomínio de estruturas do tipo laço, porém a região compreendida entre os resíduos Asp118 e Trp127 são observadas várias interrupções da estrutura.

Na região entre os resíduos Leu154 a Tyr162 foi possível observar a presença de uma α -hélice bem definida para conformação FR e parcialmente para FRC (alternância de estruturas do tipo laço e hélice - α -hélice e 310-hélices), que está ausente na conformação FO. A região entre os resíduos Lys298 e Asp316 mostrou-se como uma região menos estável para as três conformações. Na conformação FO as regiões de instabilidade são observadas entre os resíduos Ser307 e Asp316, com estruturas do tipo hélice na região próxima a Asp316. Estas estruturas são também observadas nesta mesma região para conformação FR. No entanto,

para as conformações FR e FRC a região entre os resíduos Lys298 e Ser307 apresenta-se menos estável, com várias regiões sem estrutura definida.

3. Agrupamento de configurações moleculares a partir de uma trajetória de dinâmica molecular

Um aspecto importante das simulações de dinâmica molecular são as relações inerentes as configurações moleculares encontrados neste dados, que frequentemente estão ocultas devido a complexidade dos mesmos. Para este fim, o agrupamento ter sido uma metodologia bastante empregada nas análises de trajetória de dinâmica molecular (Shao *et al.*, 2007). Neste trabalho, a partir de cada trajetória foram geradas 500 conformações que foram agrupadas como semelhantes, baseado no cruzamento de seus valores de RMSd. Os mapas foram construídos a partir dessas medidas.

Para *C. neoformans*, foram selecionadas 2 famílias para conformação FO, três para FR e três para FRC. A conformação FO apresentou uma grande família. A conformação FR mostrou-se com uma possível grande família no gráfico obtido pelo programa Carma. No entanto as análises manuais dos subgrupos e o outro mapa de RMSd separou as trajetória em três família, porém as duas últimas intimamente relacionadas.

As análises das estruturas das duas famílias, para conformação FO, mostram que mesmo a pequena família, representada pela frame 469, está intimamente ligada a grande família, observada nos resultados de agrupamento. Apenas nas regiões de loop foram observadas pequenas diferenças. Os valores de RMSd dos domínios de ligação ao NADPH das duas famílias mostram claramente que esta região se manteve muito estável ao longo da trajetória. Já para as conformações FR e FRC essas mudanças foram um pouco mais evidentes, embora ainda com bastante sobreposição.

4. Análise da cavidade ao longo da trajetória da dinâmica molecular

O programa MDpocket permitiu avaliar o volume da cavidade ao longo da simulação de dinâmica molecular, verificando se o sítio catalítico apresentava grandes variações durante a DM. O centro da cavidade foi determinado pelos programas METAPocket e LigSite. A localização do centro foi sempre comparado com a cavidade escolhida para o cálculo do volume com o MDPocket, uma vez que devem se tratar da mesma cavidade.

5. Preparação dos modelos para etapa da filtração da varredura virtual

Simulações por varredura virtual podem ser aplicadas à modelos tridimensionais elaborados a partir da modelagem por homologia. Essas simulações ajudam na identificação de moléculas pequenas (small molecules), advindas de bancos de dados, com potencial de interação com a proteína-alvo. Normalmente, esses bancos de dados são constituídos de moléculas que apresentam propriedades *drug-like* (Kairys *et al.*, 2006). A varredura virtual permite então a exploração de quimiotecas e direciona os testes *in vitro* para as moléculas pertinentes (hits). A varredura virtual foi realizada em 3 etapas: preparação das proteínas-alvo (já descritas acima), preparação dos ligantes e processo de filtração (docking) baseado nas estruturas preditas das proteínas.

Uma vez selecionadas as famílias de conformações e determinada as variações da cavidade catalítica, as famílias de cada uma das conformações de Trr1 foram alinhadas na região do sítio catalítico. Em seguida, um novo cálculo do centro da cavidade foi realizado pelo programa METAPocket para obtenção das coordenadas deste centro que serão fornecidas ao programa GOLD para o docking.

A **Figura 2** exemplifica como foi realizada a obtenção das coordenadas do centro da cavidade catalítica para cada conformação de Trr1. Os resultados obtidos para a conformação reduzida livre do *C. neoformans* são mostradas neste exemplo. Após o alinhamento da região do centro catalítico (aminoácidos 165 a 179) cada uma das famílias de conformação já alinhada foi submetida ao programa METAPocket. Este programa utiliza oito métodos diferentes para determinação das três principais cavidade e, conseqüentemente, para obtenção do centro. Como é possível observar nas **Figuras 2A-2C**, cada família apresenta um centro da cavidade que foi melhor identificado por um método. Estes centro são próximos uns aos outros (**Figura 2D**) e então, a região central entre estes três pontos será utilizada para obtenção do centro da cavidade. Como mostrado nas **Figuras 2E e 2F**, a região central deverá estar contida dentro da cavidade das três famílias de conformações e as coordenadas desta região serão fornecidas ao programa GOLD, juntamente com um raio capaz de englobar o sítio catalítico e regiões de interações importantes para a atividade catalítica.

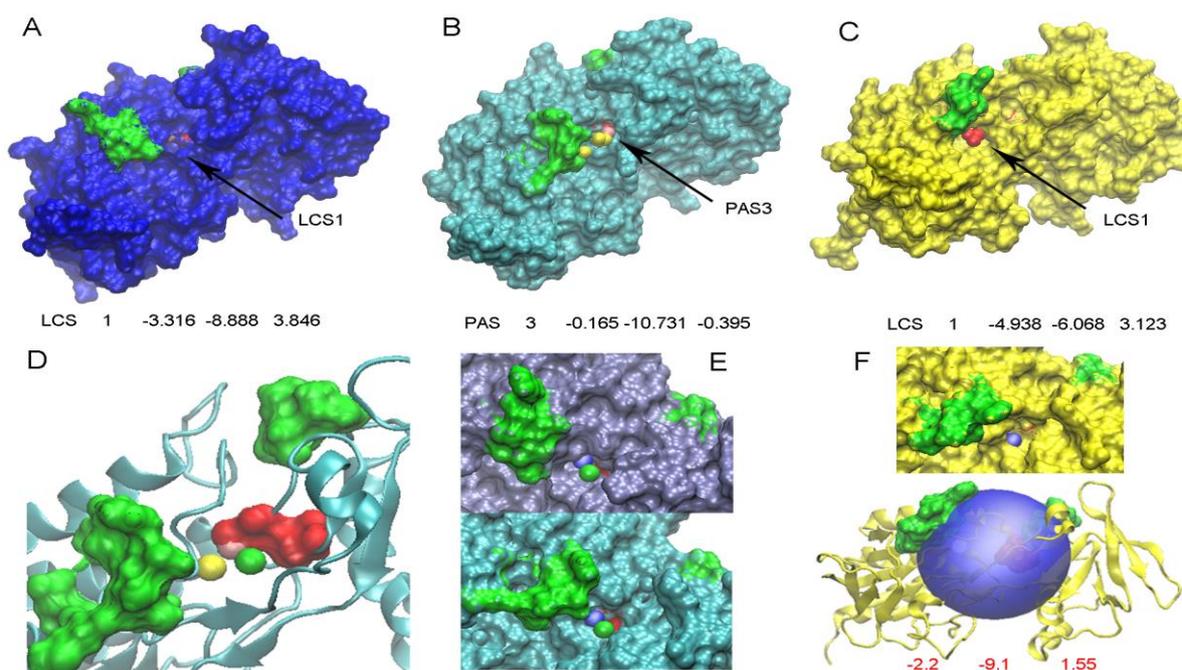


Figura 2. Análises da cavidade catalítica do modelo tridimensional obtido para Trr1 de *C. neoformans* conformação FR após alinhamento da região do sítio catalítico. (A), (B) e (C) Representação das três famílias de conformações e os resultados obtidos pelo METAPocket. As coordenadas obtidas são mostradas juntamente com o método que foi utilizado. LCS1 - indica que o método utilizado foi o Ligsite, já o número 1 indica que foi a maior cavidade identificada por este método. PAS3 - indica que o método utilizado foi o PASS11, e o número 3 indica que foi a terceira maior cavidade selecionada por este método. (D) Representação da região do sítio catalítico. Em vermelho as cisteínas ativas e em verde regiões de interações importantes para atividade catalítica de Trr1. As três bolas indicam os três centros de cavidade mostrados de (A) a (C). (E) e (F) As pequenas bolas azuis indicam as coordenadas médias entre os três centro da cavidade obtidos para as famílias de conformação. Estas coordenadas encontram-se dentro da cavidade catalítica das três famílias. Em (F) também é mostrado a região englobada pelo raio que foi informado ao programa GOLD.

Para a preparação dos ligantes foram utilizadas as moléculas depositadas no banco de dados de compostos químicos da *Life Chemicals*. A base de dados *Life Chemicals* possui 750.000 moléculas. Inicialmente uma pré-seleção foi realizada para selecionar as moléculas com propriedades *drug-like*. Um segundo procedimento de filtragem foi realizado para testar a diversidade química por meio do cálculo (índice de Tanimoto), que permitiu mensurar a similaridade de duas moléculas por um ponto de vista químico. Com base neste procedimento de pré-seleção, o número de compostos foi reduzido para 3.000. Mais 1080 moléculas foram adicionadas ao banco utilizado nos experimentos de *docking*, estas moléculas quais são análogas a 3 do banco *Life Chemicals* que já foram testadas pelo grupo e apresentaram atividade antifúngica. Os compostos foram convertidos de estruturas bidimensionais a tridimensionais pelo programa CORINA (Gasteiger *et al.*, 1990).

A etapa de *docking* foi realizada por meio do programa GOLD. O programa permitiu a busca de possíveis interações entre as proteínas e os compostos, explorando os graus de liberdade conformacional de ambos, ligante e proteína. As interações com os compostos foram classificadas de acordo com seus *scores*, que são padrões de afinidade do ponto de vista de estabilidade energética em relação ao sítio de ligação da proteína. Após análise da distribuição destes *scores*, as moléculas com os maiores scores nas conformações dos modelos de Trr1 foram selecionadas.

Potencias moléculas inibidoras selecionadas após a realização do *docking* com o modelo Trr1 de *C. neoformans*

As análises das interações que ocorrem entre o modelo e as moléculas dos bancos de dados selecionados foram realizadas com as conformações de cada modelo. Isto possibilitou a confirmação da interação de resíduos do sítio ativo com as moléculas inibitórias selecionadas. A caracterização dessas interações confirma a especificidade das moléculas com os modelos gerados, indicando assim, a possibilidade de atuarem como potenciais inibidores. Todos esses processos e resultados de obtenção dos modelos proteicos para Trr1 usando a estratégia de modelagem molecular por homologia, além da varredura virtual de quimiotecas para seleção de compostos inibidores, foram realizados na França em cooperação internacional com o Prof. Dr. Bernard Maignet, que vem utilizando as ferramentas de modelagem molecular e varredura virtual como aplicação no desenho de novas drogas. Após análise da distribuição dos *scores*, um total de 4 moléculas que interagem com Trr1 foram selecionadas, sintetizadas e adquiridas **(estão em fase de avaliação da atividade antifúngica e em caso positivo serão requeridas as patentes para as melhores moléculas candidatas)**. Por esta razão estas 4 moléculas não poderão ser identificadas neste trabalho

DISCUSSÕES

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, a modelagem molecular vem se tornando mais eficiente no planejamento de novos fármacos (Marshall, 2004). Barh e cols. (2011) realizaram a genômica comparativa entre isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, um parasita intracelular facultativo e agente causador da linfadenite caseosa, doença infecto-contagiosa crônica, que acomete principalmente os caprinos e ovinos. Os autores identificaram alvos que foram modelados por homologia para obtenção da estrutura 3D. Posteriormente, realizaram a varredura virtual de quimiotecas e

identificaram seis potenciais compostos inibidores desse patógeno (Barh *et al.*, 2011). Resultados bem sucedidos já foram obtidos usando a modelagem molecular de potenciais alvos para drogas, por exemplo, Caceres e cols. (2008) descreveram um modelo estrutural de purina nucleosídeo fosforilase de *Streptococcus agalactiae* (SaPNP). Esta enzima é um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas antibacterianas. Os autores modelaram os complexo de SaPNP com 15 ligantes diferentes, a fim de determinar a especificidade desses ligantes. A análise da trajetória de dinâmica molecular para SaPNP indica que os motivos funcionalmente importantes têm uma estrutura muito estável (Caceres *et al.*, 2008). Esse trabalho permitirá elucidar os mecanismos de interação entre as proteínas-alvo e seus ligantes. Possibilitando assim a busca por compostos que apresentam alta afinidade contra alvos específicos. A *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) é uma das principais causas de doenças infecciosas no mundo. Esta perspectiva é agravada por um número crescente de infecções Mt em indivíduos imunocomprometidos, como resultado de infecções por HIV. Assim, agentes novos e mais potentes anti-tuberculose são necessários. Por isso, a DNA girase foi selecionada como uma enzima-alvo para combater a Mt. Nesse trabalho, o modelo molecular tridimensional das estruturas hipotéticas para a DNA girase de *Mycobacterium tuberculosis* (mtDNAg) foi elucidado pelo método de modelagem por homologia. Além disso, foram investigadas as orientações e as afinidades de ligação destas estruturas (da Cunha *et al.*, 2010).

Um exemplo da aplicação do uso da varredura virtual de quimiotecas foi a descoberta de potenciais inibidores da aldose redutase, uma proteína que gera complicações crônicas da diabetes em humanos (Kraemer *et al.*, 2004). Apesar de um número grande de inibidores de aldose redutase já serem conhecidos, poucos apresentam eficácia suficiente em ensaios clínicos. Assim, a varredura virtual possibilitou a seleção de nove compostos para serem avaliados em testes clínicos, sendo que seis revelaram resultados satisfatórios. Igualmente, Abadio e cols. selecionaram por meio de modelagem molecular e varredura virtual 20 moléculas contra o alvo Trr1 e 34 moléculas contra Kre2 de *P. lutzii* (isolato 01), totalizando 54 moléculas potenciais, e destas 22 foram testadas quanto a suas potenciais atividades antifúngicas contra fungos patogênicos. As melhores moléculas foram F0608-0758 (contra KRE2) e F1806-0122 (contra Trr1), nas concentrações de 2 uM (1 ug/mL) e 19 uM (8 ug/mL), respectivamente para o MIC₅₀ (capacidade de inibir 50% do crescimento do fungo do gênero *Paracoccidioides* spp). Estes compostos são candidatos a novos antifúngicos para o gênero *Paracoccidioides*, provocando uma inibição competitiva sobre o alvo molecular Trr1, o qual é essencial para viabilidade de fungos (Abadio *et al.*, comunicação pessoal). Ensaios de

inibição da atividade enzimática da tioredoxina redutase do protozoário *Plasmodium falciparum* (PfTrxR) com inibidores específicos, mostraram três inibidores promissores contra PfTrxR, sendo que o inibidor mais potente apresenta IC₅₀ de 500 nM (Andricopulo *et al.*, 2006).

Visbal e cols. 2003 estudaram os efeitos antiproliferativos de três análogos azasterol e seus efeitos sobre a composição lipídica na fase de levedura patogénica de fungos dimórficos como *Paracoccidioides brasiliensis*. Os azasterol (inibidores de Δ^{24} -esterol-metiltransferase) (SMT) foram testados no rango de 0,1 a 10 μ M. A inibição foi de 100% para AZA-1 5 μ M, 62% para AZA-2 10 μ M, e 100% para AZA-3 0,5 μ M. Os análogos inibiram diferentes fases da via de biossíntese de esteróis. Através do desenho racional de inibidores da via de biossíntese dos esteróis de fungos, algumas correlações estrutura-atividade podem ser desenhados para o comportamento de azasterol contra enzimas envolvidas na biossíntese de esteróis fúngica. Smith e cols. (2009) selecionaram moléculas *drug-like* com atividade contra *Trypanosoma brucei* que são requeridas para o tratamento da doença do sono na Africa. A partir de inibidores glicosiltransferases previamente conhecidos os autores desenvolveram uma pequena molécula inibitória da dolicol fosfato manose sintase (DPMS) uma manosiltransferase envolvida na biossíntese de glicoconjugados de *T. brucei*. Estes inibidores (compostos *leads*) impedem a biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI) apresentando atividade tripanocida (Smith *et al.*, 2009). A família de proteinases aspárticas secretadas é conhecida como um importante fator de virulência de infecções fúngicas por *Candida albicans*. Devido ao contínuo aumento de cepas resistentes aos medicamentos, estas proteinases estão atualmente consideradas como candidatos promissores como alvo para drogas. Baseados nos conhecimentos de especificidade SAP2-substrato e análises de raios-X de complexos Sap/inibidor, três bibliotecas de inibidores foram desenhados e sintetizados modificando a estrutura da pepstatina A, um inibidor de proteinase aspártica, na posição P3, P2 ou P20. Estes novos inibidores mostraram um alto potencial inibitório para as isoenzimas Sap1, Sap3, Sap5 e Sap6. Em seguida, a afinidade e seletividade dos ligandos peptídicos foram investigadas pela modelagem molecular para gerar novas informações estruturais chaves para o desenho de potentes e seletivos agentes alvo anti-virulência de *Candida albicans* (Cadicamo *et al.*, 2013).

Em conclusão, na ausência de estruturas experimentais, a modelagem por homologia desempenha um papel importante no processo de descoberta de drogas baseada na estrutura. Apesar das conquistas claras dos projetos de genômica estrutural (SG), e os rápidos avanços

tecnológicos nos métodos de cristalização e RMN, é razoável supor que as estruturas experimentais para a maioria dos alvos terapeuticamente relevantes não estarão disponíveis em um futuro próximo. Assim, a modelagem por homologia *in silico*, fornece uma alternativa econômica viável para gerar razoavelmente modelos precisos para a descoberta de drogas (Cavasotto e Phatak, 2009). Em relação ao desenvolvimento de drogas antifúngicas, não existem trabalhos na literatura que tenham demonstrado a eficácia de inibidores de viabilidade celular do fungo identificados pela estratégia de varredura virtual de quimiotecas. No entanto, os resultados aqui apresentados são um avanço na pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas a partir de compostos que são selecionados usando programas computacionais pra predizer sua ligação a um receptor-alvo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andricopulo AD, Akoachere MB, Krogh R, Nickel C, McLeish MJ, Kenyon GL, Arscott LD, Williams CH Jr, Davioud-Charvet E, Becker K. (2006). Specific inhibitors of Plasmodium falciparum thioredoxin reductase as potential antimalarial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 15;16(8):2283-92.
- Barh D, Jain N, Tiwari S, Parida BP, D'Afonseca V, Li L, Ali A, Santos AR, Guimaraes LC, de Castro Soares S, Miyoshi A, Bhattacharjee A, Misra AN, Silva A, Kumar A, Azevedo V. (2011). A novel comparative genomics analysis for common drug and vaccine targets in *Corynebacterium pseudotuberculosis* and other CMN group of human pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 78(1):73-84.
- Beautrait, A., Leroux, V., Chavent, M., *et al.* (2008). Multiple-step virtual screening using VSM-G: overview and validation of fast geometrical matching enrichment. *Journal of molecular modeling*, 14(2), 135-148.
- Caceres, R.A., Timmers, L.F.S., Dias, R., Basso, L.A., Santos, D.S., W.F., Azevedo Jr, W.F. (2008). Molecular modeling and dynamics simulations of PNP from *Streptococcus agalactiae*. *Bioorg. Med. Chem.* 16:4984-4993.
- Cadicamo CD, *et al.* (2013). Design, synthesis, inhibition studies, and molecular modeling of pepstatin analogues addressing different secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*. *Biochem Pharmacol* 85(7):881-7.
- Cavasotto, C. N., e Phatak, S. S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today*, 14(13), 676-683.
- Da Cunha EE, Barbosa EF, Oliveira AA, Ramalho TC. (2010). Molecular modeling of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase and its molecular docking study with gatifloxacin inhibitors. *J Biomol Struct Dyn.* Apr;27(5):619-25.

- Gasteiger, J; Rudolph, C; Sadowski, J. (1990) *Tetrahedron Comput. Methods* 3, 537.
- Humphrey, W., Dalke, A., e Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.
- Kairys V, Fernandes MX, Gilson MK. (2006). Screening drug-like compounds by docking to homology models: a systematic study. *J Chem Inf Model.* 46(1):365-79.
- Kraemer, O., Hazemann, I., Podjarny, A.D., Klebe, G. (2004). Virtual screening for inhibitors of human aldose reductase. *Proteins. Struct Funct Bioinf* 55:814–823.
- Larralde, G., J. Vivas, and J. A. Urbina. (1988). Concentration and time dependence of the effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes. *Acta Cient. Venez.* 39:140–146.
- Lennon, BW, Williams, CH Jr., Ludwig, ML. (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science.* 18;289(5482):1190-4.
- Marshall, G.R. (2004) Introduction to cheminformatics in drug discovery - A personal view. *Cheminformatics in drug discovery*. Weinheim: WILEY-VHC.
- Oliveira, MA, Discola, KF, Alves, SV, Medrano, FJ, Guimarães, BG, Netto, LES. (2010). Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 49:3317-3326.
- Shao, J., S. W. Tanner, *et al.* (2007). “Clustering molecular dynamics trajectories: 1. Characterizing the performance of different clustering algorithms.” *Journal of Chemical Theory and Computation* 3(6): 2312-2334.
- Smith, T.K., Young, B.L., Denton, H., Hughes, D.L., Wagner, G.K. (2009). First small molecular inhibitors of *T. brucei* dolicholphosphate mannose synthase (DPMS), a validated drug target in African sleeping sickness. *Bioorg Med Chem Lett.* 15;19(6):1749-52.