

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas

**Pós-genoma de fungos patogênicos humanos: identificação de
novas drogas contra os alvos moleculares TRR1 e KRE2 de
*Paracoccidioides lutzii***

Ana Karina Rodrigues Abadio

Brasília
2012

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

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 e apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia
Molecular para obtenção do grau de
Doutor em Biologia Molecular.**

Orientada: Ana Karina Rodrigues Abadio

Orientadora: Maria Sueli Soares Felipe

Co-orientadora: Natália Florêncio Martins

Brasília

2012

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que me proporcionou vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Abel e Luiza, pelo apoio e pela ajuda em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Luciano, Leandro e Gabriela, à minha prima Letícia e a todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo.

Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, pela oportunidade de realizar este Doutorado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UnB, pelo espaço cedido para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de estudo.

À professora Maria Sueli Soares Felipe, pela competente orientação, pela confiança e pelo apoio durante toda a realização desse trabalho.

À Natália Florêncio Martins, pela co-orientação e pela disponibilidade durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Bernard Maignet, pela colaboração e por todos os ensinamentos dados durante meu doutorado sanduíche na França.

À professora Sônia Freitas, pela ajuda em todos os momentos.

Ao professor Luis Netto da USP, por ter cedido a proteína Trx3 para realização dos ensaios de atividade enzimática de TRR1.

Aos funcionários do laboratório, Fátima, Ivanildes e Thomson, pelo auxílio.

Aos amigos do laboratório, em especial à Érika, pela ajuda e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

À amiga Érika, novamente, pela amizade e ajuda incondicional.

À todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse objetivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Infecções fúngicas	02
1.1.1 Aspergilose	02
1.1.2 Blastomicose	03
1.1.3 Candidíase	03
1.1.4 Coccidioidomicose	04
1.1.5 Criptococose	05
1.1.6 Histoplasmose	05
1.1.7 Paracoccidioidomicose	06
1.2 Drogas antifúngicas existentes para o tratamento de micoses superficiais e sistêmicas	08
1.3 Genômica comparativa para a busca de potenciais genes-alvo moleculares	13
1.4 Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas-alvo	15
1.5 Varredura virtual de compostos ativos	17
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS	26
4.1 Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão das proteínas recombinantes	27
4.2 Reagentes	27
4.3 Soluções principais	27
4.4 Meios de cultura para crescimento de <i>E. coli</i>	27
4.5 Antibióticos para seleção das células transformadas	27
4.6 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida	28
4.7 Soluções para coloração/descoloração de gel de poliacrilamida com Coomassie Blue	28
4.8 Meios de cultura, soluções e solvente usados nos testes de suscetibilidade a antifúngicos	28
4.9 Leveduras para os testes de suscetibilidade a antifúngicos	28
4.10 Drogas utilizadas nos testes de suscetibilidade a antifúngicos	29
4.11 Componentes dos ensaios de atividade enzimática da tioredoxina redutase	29
4.12 Drogas utilizadas nos testes de inibição da atividade enzimática de TRR1	30
5. MÉTODOS	31
5.1 Análise comparativa dos genomas de fungos patogênicos humanos e seleção dos genes-alvo para drogas	32
5.2 Alinhamento múltiplo dos genes ortólogos	32
5.3 Modelagem molecular das proteínas-alvo	32
5.4 Varredura virtual	33
5.4.1 Preparação das proteínas-alvo	33

5.4.2	Preparação dos ligantes	35
5.4.3	Processo de seleção dos compostos por ancoragem molecular (<i>docking</i>)	36
5.5	Teste de suscetibilidade aos antifúngicos	37
5.5.1	Agentes antifúngicos	37
5.5.2	Fungos	37
5.5.3	Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima fungicida (MFC)	37
5.6	Síntese química do gene-alvo <i>trr1</i> para expressão heteróloga	38
5.7	Expressão heteróloga do gene-alvo <i>trr1</i> selecionado para indução da proteína recombinante	39
5.7.1	Células bacterianas competentes por choque térmico	39
5.7.2	Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico	39
5.7.3	Indução da expressão da proteína recombinante TRR1	40
5.7.4	Análise da expressão por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	40
5.7.5	Coloração e visualização do gel	41
5.7.6	Western-blot	41
5.8	Purificação da proteína TRR1 recombinantes por cromatografia de afinidade	41
5.9	Identificação dos genes ortólogos <i>trx1</i> , <i>trx2</i> e <i>trx3</i> em <i>P. lutzii</i> (Pb01)	42
5.10	Ensaio enzimático da atividade de TRR1 recombinante	42
5.11	Teste de inibição das moléculas do banco de dados <i>Life Chemicals</i>	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	Genômica comparativa na seleção dos genes-alvo para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	45
6.2	TRR1 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	53
6.3	KRE2 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas	56
6.4	Alinhamento das sequências proteicas codificadas pelos genes-alvo selecionados por genômica comparativa	58
6.5	Modelagem por homologia das proteínas TRR1 e KRE2 de <i>P. lutzii</i> (Pb01)	61
6.6	Varredura virtual de quimiotecas	67
6.7	Expressão heteróloga dos genes-alvo selecionados em linhagens de <i>E.coli</i> e purificação das proteínas recombinantes	103
6.8	Ensaio de atividade enzimática de TRR1 recombinante	106
6.9	Ensaio de inibição da atividade de TRR1 recombinante	109
6.10	Ensaio de atividade antifúngica <i>in vitro</i>	112
7	CONCLUSÕES	120
8	PERSPECTIVAS	122
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
10	ANEXO	145

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas do processo de modelagem molecular por homologia e suas aplicações no desenvolvimento de novas drogas.
- Figura 2.** Estratégia de varredura virtual de novas drogas
- Figura 3.** Estratégia do processo de filtração na varredura virtual
- Figura 4.** Sequência de nucleotídeos do gene *trr1* de *P. lutzii* (Pb01) otimizada para expressão heteróloga em *E. coli*.
- Figura 5.** Mecanismo catalítico da tioredoxina redutase
- Figura 6.** Estrutura global do monômero TRR1 de *S. cerevisiae*
- Figura 7.** Representação topológica da proteína Kre2.
- Figura 8.** Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína TRR1.
- Figura 9.** Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína KRE2.
- Figura 10.** Alinhamento realizado entre proteínas de *P. lutzii* (Pb01) e os moldes encontrados no PDB.
- Figura 11.** Estruturas tridimensionais preditas das proteínas TRR1 e KRE2 de *P. brasiliensis* obtidas por modelagem molecular por homologia.
- Figura 12.** RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dos átomos da cadeia principal das 500 conformações dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) ao longo da trajetória de dinâmica molecular.
- Figura 13.** Gráfico dos valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dos átomos da cadeia principal das 500 conformações dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) ao longo da trajetória de dinâmica molecular.
- Figura 14.** Os quatro diferentes grupos conformacionais dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) sobrepostos.
- Figura 15.** Diagrama das interações do complexo TRR1/F0876-0030 (*Life Chemicals*).
- Figura 16.** Diagrama das interações do complexo TRR1/F1806-0122 (*Life Chemicals*).
- Figura 17.** Diagrama das interações do complexo TRR1/F3307-0100 (*Life Chemicals*).
- Figura 18.** Diagrama das interações do complexo KRE2/FF0170-0365 (*Life Chemicals*).
- Figura 19.** Diagrama das interações do complexo KRE2/F0266-4227 (*Life Chemicals*).
- Figura 20.** Diagrama das interações do complexo KRE2/F0608-0758 (*Life Chemicals*).
- Figura 21.** Diagrama das interações do complexo KRE2/F5882-1949 (*Life Chemicals*).
- Figura 22.** Análise da expressão da proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01) em três clones de *E. coli* BL21 (λ DE3) transformada.
- Figura 23.** Análise da expressão da proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% ao longo do tempo de indução.
- Figura 24.** Análise da proteína TRR1 recombinante de *P. lutzii* (Pb01) purificada por cromatografia de afinidade, em coluna sepharose acoplada ao níquel da GE Healthcare.
- Figura 25.** Determinação do Km e Vmáx da enzima tioredoxina redutase recombinante de *P. lutzii* (Pb01) para o substrato Trx3 de *S. cerevisiae* (A) e duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (B).
- Figura 26.** Análise filogenética entre fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. realizada por análise Bayesiana.

Figura 27. Representação gráfica de Lineweaver-Burk mostrando o perfil de inibição da enzima tioredoxina redutase recombinante de *P. lutzii* (Pb01) pelos compostos F0876-0030 e F1806-0122.

Figura 28. Moléculas do banco *Life Chemicals* ancoradas no sítio catalítico das proteínas-alvo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de ação dos principais agentes antifúngicos em uso clínico.

Tabela 2. Genes essenciais de *C. albicans* e/ou *A. fumigatus* e seus ortólogos nos demais fungos patogênicos humano.

Tabela 3. Potenciais genes-alvo selecionados para desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Tabela 4. Moléculas dos bancos *Chimiotèque Nationale* e *Life Chemicals* selecionadas após a realização do *docking* com os modelos KRE2 e TRR1 de *P. lutzii* (Pb01).

Tabela 5. Atividade antifúngica (μM) *in culture* das moléculas do banco *Life Chemicals*
Atividade antifúngica (μM) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo TRR1

Tabela 6. Atividade antifúngica ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo TRR1

Tabela 7. Atividade antifúngica (μM) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo KRE2

Tabela 8. Atividade antifúngica ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo KRE2

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Amp	Ampicilina
APS	persulfato de amônio
BHI	Meio Infusão de coração e cérebro
bp	pares de base
BSA	Albumina de soro bovino
CADD	<i>Computer Assisted Drug Design</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cDNA	DNA complementar
CDR	regiões determinantes de complementariedade
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPR	substituição de um promotor condicional
D.O.	densidade óptica
DH5 α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DMSO	dimetilsulfoxido
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESTs	Expression Sequence Tags
FAD	derivado nucleotídico da riboflavina
GRACE	substituição de gene e expressão condicional
h	hora
His Tag	Tag de histidinas
HIV	Vírus da Imunodeficiência adquirida
HTS	varredura <i>high-throughput</i>
IFIs	infecções fúngicas invasivas
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis-Menten
<i>kre2</i>	gene α -1,2 manosiltransferase
KRE2	α -1,2 manosiltransferase
Kre2/Mnt1	Família das mannosyltransferases
kV	<i>kilovolts</i>
LB	Meio Luria-Bertani

LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
LORIA	<i>Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications</i>
M	molar
Mb	Mega pares de bases
MFC	concentração mínima fungicida
MIC	concentração mínima inibitória
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-N-Morpholino propanesulfônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P&D	pesquisa e o desenvolvimento de drogas
p/v	peso a volume
Pb01	<i>Paracoccidiodes brasiliensis</i> isolado 01
Pb18	<i>Paracoccidiodes brasiliensis</i> isolado 18
Pb3	<i>Paracoccidiodes brasiliensis</i> isolado 3
PBS	Tampão salino fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	reação da polimerização em cadeia
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de dados de proteínas)
Pmt	Família das mannosyltransferases
PNP	purina nucleosídeo fosforilase
RMN	ressonância magnética nuclear
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
RPMI	RPMI-1640 sem bicarbonato, com L-glutamina,
ScTrx1	tio redoxina 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScTrx2	tio redoxina 2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScTrx3	tio redoxina 3 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScTrxR1	tio redoxina redutase 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ScTrxR2	tio redoxina redutase 2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
sec	segundos
T	Índice de Tanimoto

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
<i>trr1</i>	gene Tioredoxina reductase 1
TRR1	Tioredoxina reductase 1
Trx	tioredoxina
U	unidade enzimática
UCB	Universidade Católica de Brasília
USA	Estados Unidos da América
UV	ultravioleta
V	Volts
v/v	volume por volume
V _{máx}	Velocidade máxima
VS	varredura virtual
VSM-G	gerente de varredura virtual para redes - grids - computacionais
W	watts
YPD	<i>yeast peptone dextrose</i>
μm	micrometro
μM	micromolar

RESUMO

A incidência e a gravidade das micoses sistêmicas têm crescido em níveis alarmantes em todo mundo. O principal fator que tem contribuído para esta casuística é o aumento de pacientes imunocomprometidos graves ou doentes de AIDS, submetidos à quimioterapia, ou terapias imunossupressoras para transplante de órgãos ou de células hematopoiéticas. Estes pacientes, além de desenvolverem formas clínicas mais severas das micoses, geralmente fatais, estão mais susceptíveis a infecções por fungos oportunistas. Em adição, a resistência às drogas atualmente disponíveis e os efeitos colaterais causados por estas terapias, apontam para a relevante necessidade de desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Por genômica comparativa foi avaliada a presença de 57 genes-alvos (55 essenciais e 2 relevantes para a sobrevivência do patógeno no hospedeiro) no genoma de nove fungos patogênicos: *Paracoccidioides brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb3), *P. lutzii* (isolado Pb01), *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Esta análise possibilitou a seleção de 10 genes, que apresentavam características que os descreviam como potenciais alvos para drogas. Apenas dois alvos, tioredoxina redutase (TRR1) e α -1,2-manosiltransferase (KRE2), possuem estruturas tridimensionais (3D) homólogas e depositadas no banco de dados de proteínas (PDB), com identidade de sequência primária superior a 50%. Por essa razão eles foram selecionados para realização de modelagem molecular e varredura virtual. Os modelos TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (isolate 01) e as moléculas das quimiotecas *Chimiotèque Nationale* e *Life Chemicals* foram preparados para varredura virtual. O resultado do *docking* possibilitou a seleção de 20 moléculas contra o alvo molecular TRR1 e 34 moléculas contra KRE2, 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 μ M (1 μ g/mL) e 19 μ M (8 μ g/mL), respectivamente, para o MIC₅₀ (capacidade de inibir 50% do crescimento de fungos do gênero *Paracoccidioides* spp). Em paralelo, foi realizada a expressão heteróloga em *Escherichia coli* da enzima TRR1 de *P. lutzii* (Pb01), o que permitiu iniciar os experimentos de caracterização enzimática e inibição desta flavoenzima, utilizando a tioredoxina de *Saccharomyces cerevisiae* (Trx3) como substrato. Os valores dos parâmetros cinéticos determinados foram Km = 4,12 μ M e Vmáx = 0,008 μ M/s. Ensaio iniciais de inibição da TRR1, utilizando as moléculas selecionadas por varredura virtual, sugerem uma inibição competitiva sobre o alvo-molecular TRR1, o que indica que a atividade antifúngica observada nos ensaios *in*

culture contra os fungos patogênicos humanos era devido à inibição provocada especificamente sobre o sítio catlítico do alvo-molecular. Considerando uma concentração de 0,5 μM do substrato Trx3, a porcentagem de inibição da TRR1 recombinante pela droga F0876-0030 a 65 nM foi de 35%. Para a droga F1806-0122 (155 nM inibiu cerca de 30%) foi possível calcular o valor de IC_{50} , em cerca de 310 nM de droga. Desta forma, novas moléculas com atividade antifúngicas foram identificadas e selecionadas apontando para um novo horizonte no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das infecções fúngicas invasivas.

ABSTRACT

The incidence and severity of mycoses have grown to alarming levels in the world. The main factor that has contributed for this is the increase of severe immunocompromised patients or patients with AIDS, undergoing chemotherapy, or therapies for organ or hematopoietic cells transplantation. These patients also develop more severe clinical mycoses forms, particularly fatal and are more susceptible to infections by opportunistic fungi. In addition, the drugs resistance and side effects caused by the available therapies demonstrated the need of new antifungal drugs development. By comparative genomics it was evaluated the presence of 57 target genes (55 essentials and 2 important for cell viability within host pathogen) in genome of nine pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis* (isolates Pb18 and Pb3), *P. lutzii* (isolate 01), *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. This analysis allowed the selection of 10 genes that present characteristics that describe them as potential targets for drugs. Only two targets, thioredoxin reductase (TRR1) and α -1,2-mannosyltransferase (KRE2) present homology three-dimensionall (3D) structures in protein data bank (PDB), with primary sequence identity greater than 50%. By this reason they were selected to perform molecular modeling and virtual screening. The models TRR1 and KRE2 of *P.lutzii* (isolate 01) and the molecules of *Chimiotèque Nationale* and *Life Chemicals* database were prepared to virtual screening. The *docking* results allowed the selection of 20 molecules against TRR1 molecular target and 34 molecules against TRR1, in total of 54 potential molecules, which 22 were tested for their potential antifungal activity against pathogenic fungi. The best molecules were F0608-0758 (against KRE2) e F1806-0122 (against TRR1), in concentrations of 2 μ M (1 μ g/mL) and 19 μ M (8 μ g/mL), respectively, for MIC₅₀ (ability to inhibit 50% growth of *Paracoccidioides* spp.). In parallel, it was performed the heterologous expression in *Escherichia coli* of TRR1 enzyme of *P. lutzii* (Pb01), allowing start the experiments of enzymatic characterization and flavoprotein inhibition, using *Saccharomyces cerevisiae* thioredoxin (Trx3) as substrate. The kinetic parameters values determined were Km=4,12 μ M and Vmáx=0,008 μ M/s. Preliminary inhibition assays of TRR1, using the molecules selected by virtual screening, suggest an competitive inhibition of TRR1 molecular target and indicate that the antifungal activity in culture assays against the human pathogenic fungi was due specific inhibition of molecular target active site. With Trx3 substrate at 0.5 μ M, the inhibition percentage of recombinant TRR1 by F0876-0030 drug at 65 nM was 35%. For F1806-0122 drug (155 nM inhibited about 30%) it was possible calculate IC₅₀ value around

310 nM of drug. Thus, new molecules with antifungal activity were identified and selected, pointing to a new horizon in the new drugs development for the treatment of invasive fungal infections.

1. INTRODUÇÃO

1.1) Infecções fúngicas

A incidência e a prevalência de infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm sido importantes causas de morbidade e mortalidade, especialmente na grande população de pacientes imunocomprometidos ou com AIDS, submetidos à quimioterapia, ou terapia imunossupressora para transplante de órgãos ou de células hematopoiéticas (Arendrup *et al.*, 2005; Enoch *et al.*, 2006, Sable *et al.*, 2008). A incidência das IFIs também tem aumentado significativamente e representa um grave problema de saúde pública, pois está associada ao tempo prolongado de internações (Gudlaugsson *et al.*, 2003; Kett *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). Esses pacientes desenvolvem formas clínicas de micoses mais graves, que são geralmente fatais, sendo mais suscetíveis a infecções por fungos oportunistas (Sable *et al.*, 2008). Os agentes de IFIs mais importantes são *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* spp. (Bassetti *et al.*, 2011; Pemán & Salavert, 2011; Nucci *et al.*, 2011; Tragiannidis *et al.*, 2012), enquanto que as micoses endêmicas mais comuns são devido às infecções por *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) e *Coccidioides* spp. (Teixeira *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2011; Colombo *et al.*, 2011; Buitrago & Cuenca-Estrella, 2011,).

A micologia médica, cada vez mais, tem sido vista com atenção pela comunidade científica. Um grande exemplo desse fato é o crescente número de genomas de fungos patogênicos humanos até o momento sequenciados, contribuindo de maneira efetiva não apenas para a pesquisa básica e aplicada, mas principalmente, para a saúde pública. Atualmente, existem cerca de 250 genomas de fungos sequenciados, completos ou em processo de sequenciamento, sendo 40 de fungos patogênicos humanos (dados coletados em 01/03/2012 nos bancos de dados *Fungal Genomes*, TIGR, *Sanger*, *Broad Institute*, NCBI). Dentre estes, destacam-se pela alta relevância nacional e mundial os patógenos humanos: *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Pb01), os quais aparecem como fortes candidatos para os estudos pós-genômicos.

1.1.1) Aspergilose

Aspergilose é uma infecção sistêmica causada pelo fungo *A. fumigatus*. Esse fungo é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Eurotiales e da família Trichocomaceae. Seu genoma completo possui 29,38 Mb e codifica para 9.887 genes. *A. fumigatus* é um fungo saprófita, de distribuição mundial, que desempenha um papel fundamental na reciclagem do carbono e nitrogênio (Latzgé, 2001). Os conídios deste fungo, presentes em detritos orgânicos, são continuamente inalados

por seres humanos e, geralmente, eliminados pela resposta imune inata. No entanto, devido ao número crescente de pacientes imunodeprimidos e ao aumento na gravidade das terapias imunossupressoras este cenário tem apresentado mudanças nos últimos 30 anos. Pacientes imunocomprometidos são altamente susceptíveis à aspergilose invasiva sistêmica, que na maioria das vezes, é fatal (Latgé, 1999; Latgé, 2001; Singh & Paterson, 2005). As taxas de mortalidade associadas à aspergilose invasiva variam de 60 a 90%, dependendo do tipo de paciente infectado (Singh & Paterson, 2005). As opções de tratamentos disponíveis são limitadas a três classes de antifúngicos: polienos, azóis e equinocandinas (Latgé, 1999; Steinbach *et al.*, 2003). Entretanto, apesar destas opções terapêuticas, a mortalidade associada à aspergilose invasiva permanece elevada e drogas mais eficazes com novos mecanismos de ação são, cada vez mais, necessárias.

1.1.2) Blastomicose

Blastomicose é uma infecção sistêmica causada pelo fungo *B. dermatitidis*. Esse fungo é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Onygenales e da família Ajellomycetaceae. O genoma completo da linhagem *B. dermatitidis* ER-3 é de 66,57 Mb e apresenta 9.522 genes. *B. dermatitidis* é a fase imperfeita (assexual) de *Ajellomyces dermatitidis*, e exibe crescimento dimórfico dependente de temperatura. *B. dermatitidis* apresenta-se na forma de micélio quando cultivado entre 25° a 30°C e na forma de levedura a 37°C. O micélio produz conídios que, dependendo do ambiente, são facilmente dispersos pelo ar. Após a inalação de esporos pelo hospedeiro e a alteração da temperatura para 37°C, o *B. dermatitidis* se converte para a forma patogênica de levedura. A blastomicose acomete hospedeiros imunocompetentes, mas também pode se estabelecer como uma infecção oportunista em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com AIDS. A doença e o fungo foram primeiramente descritos por Gilchrist, em 1894, em Baltimore. No início de 1900, a doença ficou conhecida como "doença de Chicago", pelo grande número de casos verificados nessa região. Mais tarde, foi conhecida como "blastomicose norte-americana" por causa de sua ampla distribuição nos Estados Unidos e Canadá, entretanto, há relatos de casos esporádicos em todo o mundo.

1.1.3) Candidíase

Candidíase uma infecção causada pelo fungo *C. albicans*. Esse fungo é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Saccharomycetales. O genoma completo da linhagem *C. albicans* WO1 é de 14,42 Mb e codifica para 6.160 genes. *C. albicans* é um fungo comensal freqüente em humanos e também

responsável por infecções das mucosas, como vaginite ou candidíase oral, em indivíduos saudáveis. No entanto, a infecção sistêmica por *Candida* é um sério problema para pacientes gravemente doentes ou imunodeprimidos, incluindo os neonatos de baixo peso, transplantados, pacientes em quimioterapia e pacientes infectados pelo vírus HIV (Pfaller & Diekema, 2004; Schelenz, 2008). Além disso, *C. albicans* pode facilmente colonizar catéteres e outros dispositivos médicos, nos quais formam biofilmes, sendo mais resistentes ao tratamento com drogas (d'Enfert, 2006; Lewis, 2008). Por estas razões, *C. albicans* tem se tornado a terceira causa mais comum de infecção hospitalar cujas taxas de mortalidade por infecção sistêmica são elevadas (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Méan *et al.*, 2008). A resistência emergente ao arsenal de drogas antifúngicas existentes também é uma preocupação. A resistência aos azóis tem sido encontrada entre os isolados originados de pacientes HIV-positivos (Traeder *et al.*, 2008).

1.1.4) Coccidioidomicose

Coccidioidomicose (febre do Vale) é uma micose sistêmica causada por fungos termo-dimórficos do gênero *Coccidioides* (Pappagianis, 1993). Este é composto de duas espécies estreitamente relacionadas, *C. immitis* e *C. posadasii*. *C. immitis* é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Onygenales e da família Eurotiomycetidae. O genoma completo da linhagem *C. immitis* H538.4 é de 27,73 Mb e codifica para 10.608 genes. O fungo se propaga no solo de regiões semi-áridas do sudoeste dos Estados Unidos, México e América Central e do Sul. A infecção ocorre pela inalação dos conídios, que se diferenciam em grandes esferulas com endósporos no hospedeiro. A doença apresenta um amplo espectro clínico, que inclui a infecção assintomática, doença respiratória primária (geralmente sem complicações), a doença pulmonar crônica progressiva ou estabilizada e a disseminação extrapulmonar, que pode ser aguda, crônica ou progressiva. O grau de severidade varia consideravelmente dentro de cada categoria e depende, em parte, da quantidade de conídios inalados, da predisposição genética do hospedeiro e de seu estado imunológico (Pappagianis, 1993). *C. immitis* infecta pelo menos 150.000 pessoas por ano, ~40% das quais desenvolvem infecção pulmonar (Hector & Laniado-Laborin 2005). No entanto, a forma crônica e disseminada da coccidioidomicose, para a qual os tratamentos existentes podem ser prolongados, ocorre em cerca de 5% dos pacientes (Galgiani *et al.*, 2005). A virulência deste fungo e seu potencial para a dispersão de esporos no meio ambiente têm estimulado os esforços para desenvolver uma vacina eficaz e/ou tratamentos alternativos como o uso de miconazol (Hung *et al.*, 2002; Hector & Rutherford, 2007).

1.1.5) Criptococose

Criptococose é uma infecção causada pelo fungo *C. neoformans*. Esse fungo pertence a um complexo que inclui duas espécies de leveduras encapsuladas de *Cryptococcus*: *C. neoformans*, um patógeno oportunista, e *Cryptococcus gattii*, patógeno primário. Ambas as espécies são os agentes fúngicos mais comuns de infecção do sistema nervoso central. Duas variedades de *C. neoformans* são reconhecidas, *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A), que é encontrado em todo o mundo, e *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo B), que ocorre principalmente na Europa e América do Sul (Franzot *et al.*, 1998). O *C. gattii* foi anteriormente conhecido como *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipo C), e acreditava-se estar restrito às zonas tropicais e subtropicais, até que um surto de criptococose ocorreu na ilha de Vancouver, no Canadá, que expandiu o leque desta levedura às regiões temperadas (Ngamskulrungraj *et al.*, 2009).

C. neoformans é classificado como um basidiomiceto (filo Basidiomycota) da ordem Tremellales e da família Tremellaceae. O genoma completo da linhagem *C. neoformans* sorotipo B possui 17,5 Mb e codifica para cerca de 6.210 genes. É um fungo cosmopolita que se encontra presente em excrementos de pombos, e tem sido responsável por infecções tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunossuprimidos. A infecção humana resulta provavelmente da inalação de propágulos fúngicos, que dependendo do perfil imunológico, pode desencadear a doença ou permanecer latente. Os achados clínicos associados à criptococose são geralmente causados por anormalidades pulmonares e neurológicas, embora o *Cryptococcus* apresente a capacidade de disseminar na maioria dos órgãos do corpo, incluindo a pele, articulações, próstata e olhos (Kozubowski *et al.*, 2009).

Atualmente estão disponíveis os dados genômicos de cinco diferentes isolados de *C. neoformans* (http://fungalgenomes.org/wiki/Fungal_Genome_Links). Além disso, modelos animais para testes *in vivo* estão bem estabelecidos, seu ciclo sexual e a capacidade de acasalamento e vários métodos de transformação genética foram padronizados e estão disponíveis para estudo da função gênica. Assim, esta levedura é um excelente modelo para estudo da biologia dos eucariotos e da patogênese microbiana.

1.1.6) Histoplasmose

Histoplasmose é uma micose granulomatosa sistêmica causada pelo fungo termo-dimórfico *H. capsulatum*. Esse fungo é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Onygenales e da família Ajellomycetaceae. O genoma completo da linhagem *H. capsulatum* NAm1 possui 32,99 Mb e codifica para 9.248

genes. O habitat deste patógeno é o solo contendo fezes de aves e morcegos, e pode persistir no ambiente por longos períodos. Os morcegos podem ser portadores crônicos, excretando formas viáveis em suas fezes (Wheat, 2006). A histoplasmose é altamente prevalente em determinadas áreas dos Estados Unidos (regiões centrais e sul do país, ao longo dos vales dos rios Mississipi e Ohio), México, Honduras, Guatemala, Nicarágua, Panamá, em várias ilhas do Caribe (Jamaica, Porto Rico, Martinica e Cuba) e em diversos países sul-americanos, principalmente Venezuela, Colômbia, Peru, Brasil, Argentina e Uruguai. A manifestação clínica predominante de histoplasmose é a pneumonia, mas a maioria dos pacientes não tem nenhum sintoma ou apenas ligeiras queixas pulmonares que não são graves o suficiente, para procurar cuidados médicos, dificultando o correto diagnóstico. No entanto, a doença acomete principalmente pacientes imunodeprimidos, particularmente aqueles com HIV (Ferreira & Borges, 2009).

Estudos de caracterização molecular identificaram sete espécies filogeneticamente distintas. Na América do Norte existem duas: *Histoplasma* classe I (NAml) e *Histoplasma* classe II (NAmlI), que também diferem significativamente em virulência (Kasuga *et al.*, 2003). Atualmente, com o sequenciamento do genoma do *H. capsulatum* (NAml) no Instituto Broad (http://www.broad.mit.edu/annotation/genomahistoplasma_capsulatum/home.html) e *H. capsulatum* (NAmlI) na Universidade de Washington (http://genome.wustl.edu/pub/organism/Fungi/Histoplasma_capsulatum), os genomas poderão auxiliar no esclarecimento das características relacionadas a virulência, interações com sistema imune do hospedeiro, bem como auxiliar o diagnóstico e tratamento (Nosanchuk & Gacser, 2008).

1.1.7) Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa causada pelo fungo termo-dimórfico *P. brasiliensis* (San-Blas, 1993; Borges-Walmsley *et al.* 2002). O *Paracoccidioides* apresenta-se na forma de micélio no solo ou quando cultivado a temperatura ambiente e na forma de levedura nos tecidos em vida parasitária ou quando incubado a 36°C. Esse fungo é classificado como um ascomiceto (filo Ascomycota) da ordem Onygenales e da família Ajellomycetaceae assim como outros fungos dimórficos e patogênicos como *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (Leclerc *et al.*, 1994; Bialek *et al.*, 2000).

A conclusão do projeto transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* – isolado Pb01, realizado pela Rede Genoma Centro-Oeste, levou a uma compreensão mais clara das bases moleculares a respeito da diferenciação em nível molecular por meio da identificação, anotação maciça de genes/transcritos e, recentemente, por meio da

implementação de estudos por microarranjos da modulação gênica tanto do *P. brasiliensis* como de macrófagos infectados por este fungo (Felipe *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006). A estratégia adotada para análise do transcriptoma baseou-se no seqüenciamento de ESTs (*Expression Sequence Tags*) derivadas de bibliotecas de cDNA de células de micélio e levedura cultivadas a 23°C e 36°C, respectivamente. Um total de 25.511 clones foram seqüenciados correspondendo a 6.022 grupos, representando os genes expressos de *P. brasiliensis*. Isto cobre cerca de 80% do total de genes preditos para este fungo. Adicionalmente, tem-se disponível em bancos de dados seqüências ESTs identificadas pelo projeto transcriptoma de *P. brasiliensis* – isolado Pb18 (Goldman *et al.*, 2003) e bem recentemente dados do genoma estrutural de 3 isolados de *P. brasiliensis* (Pb01, Pb3 e Pb18) realizado em colaboração com o *Broad Institute* – USA. O genoma completo de *P. lutzii* (Pb01) e das linhagens *P. brasiliensis* Pb3 e Pb18 possui respectivamente 32,94, 29,06 e 29,95 Mb, codificando para 9.132, 7.876 e 8741 genes, respectivamente. Estes projetos estão sendo fundamentais para estudos pós-genoma de fungos patogênicos a humanos. Pode-se incluir a recente descrição da nova espécie, *Paracoccidioides lutzii*, realizada por meio de estudos filogenéticos e filogenômicos aprofundados, os quais demonstraram que o isolado Pb01 pertence de fato a uma nova espécie (Teixeira *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2011). Com a descrição da espécie *P. lutzii* (Pb01), considera-se que a PCM seja causada pelas duas espécies de fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*, o *P. brasiliensis* e, mais recentemente, o *P. lutzii*. Embora as duas espécies apresentem diferenças genéticas e de distribuição geográfica, não foram ainda caracterizados aspectos clínicos da PCM particular a cada espécie.

A PCM está restrita a América Latina e estima-se que dez milhões de pessoas possam estar infectadas por este fungo, dos quais cerca de 2% deverão desenvolver a doença (San-Blas *et al.*, 2002; Coutinho *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009). A forma crônica da doença evolui lentamente, sendo mais frequente em homens adultos (Restrepo *et al.*, 2008). A forma aguda se desenvolve rapidamente (semanas ou meses) e é mais grave, levando a elevados níveis de mortalidade (revisado por Borges-Walmsley *et al.* 2002). Muitos pacientes apresentam recaídas, complicações e sequelas, como a fibrose pulmonar. O tratamento é longo, geralmente com duração superior a um ano, e o composto terapêutico é restrito a sulfametoxazol-trimetoprima, itraconazol e anfotericina B (Restrepo *et al.*, 2008). No Brasil, a PCM tem se constituído um grande problema de saúde pública, uma vez que tem se destacado como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses

sistêmicas (Coutinho *et al.*, 2002). A forma clínica mais comum da PCM crônica é caracterizada pelo aspecto granulomatoso com envolvimento primário dos pulmões com ou sem disseminação para outros órgãos, principalmente do sistema retículo-endotelial e tecidos mucocutâneos (Brummer *et al.*, 1993).

1.2) Drogas antifúngicas existentes para o tratamento de micoses superficiais e sistêmicas

Desde a década de 80, a incidência e a prevalência das infecções fúngicas invasivas (IFIs) têm sido causas importantes de morbidade e mortalidade, especialmente na grande população de pacientes imunocomprometidos (Arendrup *et al.*, 2005; Enoch *et al.*, 2006). O surgimento da infecção pelo vírus da AIDS, bem como o desenvolvimento de novos regimes de quimioterapia intensiva contra o câncer, e o aumento no número de receptores de órgãos transplantados resultou no aumento dos pacientes imunocomprometidos e, conseqüentemente no aumento de infecções. Sendo assim, a incidência de IFI também tem aumentado significativamente e emergido como um problema de saúde em todo o mundo. Os pacientes desenvolvem formas clínicas de micoses mais severas, geralmente fatais, sendo mais susceptíveis às infecções por fungos oportunistas (Sable *et al.*, 2008). Os agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento de micoses sistêmicas atualmente incluem quatro classes de drogas: polienos, fluoropiridinas, azóis e equinocandinas (**Tabela 1**).

A anfotericina B tem sido utilizada no tratamento das infecções fúngicas desde 1957 (Chapman *et al.*, 2008). Entretanto, seus efeitos adversos como febre, calafrios, náuseas e vômitos, alterações de eletrólitos e, principalmente nefrotoxicidade limitam o seu uso. Na década de 90, os antifúngicos azólicos, como fluconazol e itraconazol foram disponibilizados, levando a um grande avanço na terapêutica antifúngica. Embora o fluconazol tenha menor toxicidade que anfotericina B, o espectro de sua atividade antifúngica é estreito. Em contraste, itraconazol tem um amplo espectro de atividade, mas seu uso é limitado por uma ampla gama de interações medicamentosas e sua biodisponibilidade oral é imprevisível (Poirier & Cheymol, 1998; Lai *et al.*, 2008).

Há um grande esforço dedicado à descoberta de novos agentes antifúngicos mais eficientes e menos tóxicos, podendo-se citar três triazóis de segunda geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) e três equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (Lai *et al.*, 2008; Espinel-Ingroff, 2009).

Tabela 1. Mecanismos de ação dos principais agentes antifúngicos em uso clínico.

Classe	Mecanismo de ação	Droga	Vantagens	Desvantagens	Espéctro de ação	Efeitos adversos	Avaliações econômicas
Polienos	Forma canais transmembrana que modificam a permeabilidade da membrana do fungo, com a perda de íons e outros componentes celulares.	Anfotericina B deoxicolato (AmBd; Fungisona)		Nefrotoxicidade, que é cumulativa e causa insuficiência renal; baixa penetração no fluido cerebrospinal (CSF)	<i>Aspergillus fumigatus Blastomyces dermatitides Candida sp, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Mucor mucedo, Rhodotorula sp., Sporothrix schenki</i>	Efeitos adversos relacionados à infusão (70% - 90%) - náuseas, vômitos, febre, calafrios, dor no local da injeção, distúrbios gastrointestinais, broncoespasmo, hipertensão, e arritmia cardíaca.	
		Anfotericina B liposomal (L-AMB; Ambisome)	Pacientes tratados com L-AmB (3 mg/kg/dia) têm menos efeitos colaterais que pacientes tratados com AmBd (0.6 mg/kg/dia)	Alto custo.	<i>Aspergillus fumigatus Candida sp</i> (pacientes que desenvolvem insuficiência renal com amBd ou que têm insuficiência renal pré-existente e persistente) <i>Cryptococcus neoformans, Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis,</i>	Calafrios, febre, vômitos, batida do coração irregular, cãibras musculares ou dor, cansaço ou fraqueza.	Anfotericina B liposomal apresenta melhor custo-benefício do que a Anfotericina deoxicolato (Suécia).
		Anfotericina B coloidal (ABCD; Amphotec)	Nefrotoxicidade é consideravelmente reduzida comparando com AmBd.		<i>Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Coccidioides immitis e Cryptococcus neoformans</i>	Os mais frequentes - calafrios, febre, náuseas e fadiga. Reações relacionadas à infusão aguda incluindo febre, calafrios, hipóxia, hipotensão, náusea, ou or taquipnéia, pode ocorrer 1 a 3 horas após iniciar a infusão intravenosa	
		Nistatina	Não é absorvida através do trato gastrointestinal	Necessidade de altas dose diárias; possui sabor desagradável	<i>Aspergillus fumigatus e Candida SP</i>	Diarréia, distúrbios gastrointestinais, náusea e vômito, gosto amargo, dor estomacal. Reações alérgicas são raras. Irritação local na aplicação vaginal.	
Triazóis	A inibição de α -1,4 demetilase, dependente de citocromo P450, impede a conversão de lanosterol para ergosterol.	Fluconazol	Exibe excelente penetração no tecido; biodisponibilidade e tolerância.	Inibição de várias enzimas humanas CYP dependente (3A4, 2C9 e 2C19)	<i>Candida spp</i> com exceção isolados de <i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i> . <i>Cryptococcus sp</i> e <i>C. immitis</i>	Náuseas, vômitos, dor abdominal, erupção cutânea, dor de cabeça, calvice e anorexia.	
		Itraconazol		Diminuição da eliminação de drogas metabolizadas por CYP3A4; a formulação de cápsulas depende de pH ideal para máxima absorção	<i>Blastomyces dermatitidis, Histoplasma duboisii, Aspergillus fumigatus, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Paracoccidioides brasiliensis, Sporothrix schenckii,</i>	Náuseas e vômitos, hipertrigliceridemia, hipocalemia, elevação de enzimas hepáticas, erupções cutâneas / prurido, dor de cabeça e tonturas.	Itraconazol é uma estratégia terapêutica de melhor custo-benefício em comparação ao fluconazol (USA)
		Voriconazol	A absorção não é afetada por co-	Prolongação do intervalo QT no	<i>Aspergillus sp., Candida spp.</i> Infecções fúngicas devido a <i>Scedosporium</i>	Distúrbios visuais transitórios (até 30% nos ensaios),	Voriconazol tem melhor custo-

			administração de drogas que aumentam o pH gástrico.	eletrocardiograma; teratogênica em ratos.	<i>apiospermum</i> e <i>Fusarium</i> spp. Incluindo <i>Fusarium solani</i> , em pacientes intolerantes a, ou refratários a, outras terapias.	erupção cutânea, aumento das enzimas hepáticas, hepatotoxicidade severa e alucinações.	benefício em comparação à anfotericina B (USA, Alemanha)
		Posaconazol	Ampla distribuição extravascular e penetração nos tecidos.	Prolongação do intervalo QT no eletrocardiograma	<i>Aspergillus sp.</i> e <i>Candida spp.</i> (pacientes imunocomprometidos, com maiores de 13 anos de idade) Candidíase orofaríngea, incluindo Candidíase orofaríngea refratária a itraconazol e/ou fluconazol.	Febre, dor de cabeça, boca seca, tontura, fadiga, náuseas, vômitos, diarreia, prurido, prolongação do intervalo QT, e elevação das enzimas hepáticas.	
Imidazol		Cetoconazol		Hepatotoxicidade	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , e <i>Phialophora spp</i>	Náuseas, vômitos, dor abdominal e prurido.	
Equinocandinas	Inibe a enzima β -1,3-D-glucano sintase, interferindo na síntese da parede celular do fungo.	Caspofungina	Perfil de toxicidade limitado; não é eliminado pelos rins; e apresenta mínimas interações droga-droga	Administração parental	<i>Candida spp</i> e <i>Aspergillus sp.</i> – em pacientes que são refratários ou intolerantes a outras terapias (ex, AmBd, L-AmB, e/ou itraconazol).	Flebite, elevação das enzimas hepáticas, cefaléia, febre, náuseas, vômitos, leucopenia e sintomas mediados por histamina, incluindo erupção cutânea, prurido, edema facial, e vasodilatação.	Caspofungina apresenta melhor custo-benefício quando comparada à Anfotericina B lipossomal (Reino Unido, USA, Itália)
		Micafungina	A eficácia comprovada, efeitos colaterais infrequentes, e perfis de interação da droga favoráveis.	Administração parental	<i>Candida sp.</i> e <i>Aspergillus sp.</i>	Similar a caspofungina.	Micafungina foi uma estratégia profilática com melhor custo-benefício em comparação ao fluconazol (USA, Coreia)
		Anidofungina	Meia-vida longa (24 h), altas concentrações nos tecidos (10 vezes mais que no plasma); o ajuste de dose não é necessário tanto para insuficiência hepática quanto renal.		<i>Candida albicans</i> , não- <i>albicans Candida species</i> , e <i>Aspergillus sp.</i>	Similar a caspofungina.	
Fluoropiridina	Conversão em 5-fluorouracil na célula alvo. Fluorouracil é incorporado ao RNA, interrompendo a formação da cadeia de aminoácidos. Inibe a síntese de DNA por meio de efeitos na síntese de timidilato.	Flucitosina	Inibição seletiva do fungo; excelente biodisponibilidade oral.	Teratogênica	<i>Candida spp.</i> e <i>C. neoformans</i>	Intolerância gastrointestinal, depressão da medula óssea, erupção cutânea, hepatotoxicidade, cefaléia, confusão, alucinações, sedação e euforia	

A atividade antifúngica dos triazóis de segunda geração é predominantemente sobre a inibição da enzima α -1,4 demetilase dependente de citocromo P450, que impede a conversão de lanosterol para ergosterol (Manavathu *et al.*, 1998; Groll *et al.*, 1998). O acúmulo de α -1,4-metilesteróis tóxicos e o esgotamento de ergosterol associado à membrana resulta em alterações nas propriedades da membrana e, finalmente, na inibição do crescimento das células fúngicas. Voriconazol é o primeiro triazol de segunda geração e está disponível nas formulações oral e endovenosa. Como um derivado do fluconazol, voriconazol tem aumentado a eficiência de inibição da α -1,4-demetilase fúngica (Boucher *et al.*, 2004). Posaconazol é outro antifúngico de segunda geração desenvolvido para estender o espectro de ação dos triazóis, estando disponível somente em formulação oral. Posaconazol é excretado principalmente nas fezes, e uma menor proporção é metabolizada no fígado (Krieter *et al.*, 2004). Voriconazol e posaconazol são ativos contra a maioria das espécies de *Candida*, incluindo as linhagens que são resistentes ao fluconazol (Barry & Brown, 1996; Kauffman & Zarins, 1998; Barchiesi *et al.*, 2000). Ambos os agentes são ativos contra leveduras, tais como *C. neoformans*, *Trichosporon spp* e *Rhodotorula spp* (Perfect *et al.*, 1996; Espinel-Ingroff, 2003; Zaas *et al.*, 2003). Voriconazol e posaconazol ainda apresenta atividade contra várias espécies de *Aspergillus*, incluindo *A. terreus*, que é resistente a anfotericina B e *A. fumigatus*, que é resistente ao itraconazol (Oakley *et al.*, 1998; Manavathu *et al.*, 2000). Além disso, ainda são ativos contra alguns fungos endêmicos, como *B. dermatitidis*, *C. immitis* e *H. capsulatum*, mas são menos ativos contra *Sporothrix schenckii* (Espinel-Ingroff, 1998 e 2003; Li *et al.* 2000; Gonzalez *et al.*, 2005). O efeito adverso mais comum de voriconazol é uma perturbação visual geralmente leve (Keating & Figgitt, 2003). Para o posaconazol, os efeitos colaterais mais comuns são náuseas, vômitos, dor abdominal ou diarreia e dor de cabeça (Keating, 2005).

As equinocandinas diferem dos outros agentes antifúngicos por agir sobre a parede celular de fungos inibindo a síntese de um componente essencial, a β -1,3-D-glucana (Groll & Walsh, 2001). O mecanismo de ação, pela interferência da síntese da parede celular, tem duas vantagens. Primeiro, os efeitos adversos são menores nos seres humanos, pois não há parede celular em células de mamíferos. Em segundo lugar, é possível utilizar uma associação com outros agentes antifúngicos e realizar uma terapia combinada. Caspofungina, micafungina e anidulafungina são as equinocandinas atualmente aprovadas para uso clínico. As equinocandinas são fungicidas *in vitro* e *in vivo* contra a maioria dos isolados de *Candida spp* e fungistática contra *Aspergillus spp*. (Lai *et al.*, 2008). Outros fungos que podem ser suscetíveis a equinocandinas incluem *C. immitis*, *Scedosporium spp.*, *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, *Cladophialophora bantiana*, *Phialophora spp.*, *Exophiala spp.*, *Fonsecaea pedrosoi*, *P. variotii*, *Acremonium stricum* e *B. dermatitidis* (Espinel-Ingroff, 1998; Arikan *et al.*, 2002). Efeitos adversos como, febre, náuseas, cefaléia e aumento das enzimas

hepáticas, foram observados com as equinocandinas, embora o seu alvo seja exclusivo de células fúngicas e esteja ausente em células de mamíferos (Lai *et al.*, 2008).

Mais recentemente, produtos inovadores estão sendo desenvolvidos por meio da nanotecnologia, onde se pretende reduzir os efeitos colaterais dose-dependente na administração de doses menores de drogas já comercializadas. Como exemplo, a anfotericina B nanoencapsulada (lipídica) que apresenta os efeitos secundários reduzidos (Dupont, 2002; Sobue & Sekiguchi, 2004; Olson *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2009). Entretanto, as infecções fúngicas invasivas continuam a aumentar juntamente com as populações susceptíveis. Embora *C. albicans* e *A. fumigatus* continuem sendo os patógenos fúngicos mais comuns, a frequência de infecções causadas por outras espécies têm aumentado. Estes fungos patogênicos são mais resistentes aos antifúngicos disponíveis e as infecções invasivas causadas estão associadas às altas taxas de mortalidade (Lai *et al.*, 2008). Adicionalmente, a infecção em grupos de indivíduos como, por exemplo, a administração para mulheres grávidas demanda drogas alternativas aos tratamentos clássicos utilizados, uma vez que os antifúngicos de uso comum possuem efeitos teratogênicos já conhecidos. Muitos avanços já foram alcançados no desenvolvimento de antifúngicos na década passada, no entanto, a mortalidade de pacientes com infecções fúngicas invasivas permanece elevada. Nesse contexto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas mais específicas, visando contornar o problema mundial de resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis, bem como minimizar o grave problema de efeitos colaterais causados pelas drogas existentes.

1.3) Genômica comparativa para a busca de potenciais genes-alvo moleculares

O avanço tecnológico das últimas duas décadas disponibilizou um grande número de dados de seqüências genômicas de várias espécies, iniciando, desta forma, a era pós-genômica. Hoje no Brasil existem vários grupos que dominam as ferramentas para o desenvolvimento de projetos genoma e pós-genoma. O Brasil tem investido no desenvolvimento desta área estratégica e de fronteira do conhecimento, o que propiciou a estruturação de grupos de competitividade nacional e internacional, tanto nas áreas de saúde humana como na agropecuária. O acesso às seqüências genômicas completas de patógenos e do genoma humano trouxe a possibilidade de que genes-alvo possam ser racionalmente identificados (Saidani *et al.*, 2009). Em relação aos fungos patogênicos, a crescente disponibilidade de genomas completos nos permite abordar a estratégia de busca e desenvolvimento de novas drogas antifúngicas usando uma abordagem comparativa de diferentes genomas, visando identificar novos genes específicos que codificam para proteínas-alvo de relevância para a sobrevivência do patógeno (Risipail *et al.*, 2009).

Atualmente, a pesquisa e o desenvolvimento de drogas são abrangentes, dispendiosos, consomem muito tempo e apresentam altos riscos. Estima-se que o tempo necessário para o desenvolvimento de uma nova droga desde as pesquisas laboratoriais até a sua chegada ao mercado leva em torno de 14 anos e requer um investimento de 1,8 bilhões de dólares em média (Paul *et al.*, 2010). O custo do desenvolvimento de novas drogas vem aumentando ao longo dos anos. Em 1987, o custo médio de desenvolvimento de um novo fármaco era de 231 milhões de dólares. Em 2000, este custo já era avaliado em 802 milhões de dólares. Embora não haja um consenso sobre a causa desse aumento, assume-se que as exigências legais para o licenciamento de um novo fármaco sejam as principais causas. Além disso, o crescente interesse no desenvolvimento de novas terapias para doenças crônicas e degenerativas, que por sua vez, exige uma maior e mais rigorosa etapa clínica na sua avaliação e ainda, a necessidade de um número maior de testes relacionando custo-benefício de novos fármacos em relação aos já disponíveis no mercado. Diante disso, alternativas para redução de custos na produção de novos medicamentos têm sido amplamente incentivadas. Entre estas alternativas, a avaliação *in silico* de novas moléculas tem se mostrado promissora, embora esta estratégia não elimine os custos de desenvolvimento das fases pré-clínica e clínica, permite um avanço e progresso mais rápido da P&D inicial do processo.

A conjugação da disponibilidade de genomas de patógenos, da tecnologia necessária para a busca de novos compostos inibidores, somada à genômica comparativa é uma oportunidade única para a identificação de genes (essenciais e/ou que afetam a viabilidade celular de patógenos) e que potencialmente possam vir a ser estudados como novos alvos para drogas (White & Kell, 2004; Kumar *et al.*, 2007; Caffrey *et al.*, 2009). Como o número de genomas sequenciados aumenta rapidamente, buscar e comparar sequências entre espécies têm se tornado um fato na rotina de P&D em biotecnologia (Jung *et al.*, 2008). Em essência, a abordagem comparativa é baseada na hipótese de que dois (ou mais) genomas analisados compartilham um ancestral comum e que as sequências nucleotídicas em cada organismo são resultados da evolução (te Velthuis & Bagowski, 2008). A identificação de genes conservados como potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas por meio da abordagem comparativa tem sido realizada com alguns organismos, como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Escherichia coli* 0157:H7 EDL993 (White & Kell, 2004); o nematóide *Brugia malayi* (Kumar *et al.*, 2007) e o protozoário *Schistosoma mansoni* (Caffrey *et al.*, 2009). Como exemplo, Barh e cols. (2011) realizaram, com sucesso, os estudos de genômica comparativa entre isolados de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, patógeno intracelular facultativo que causa a linfadenite caseosa em caprinos e ovinos, e identificaram genes essenciais conservados como alvos para drogas.

1.4) Modelagem molecular aplicada ao estudo de proteínas-alvo

A maioria dos medicamentos disponíveis atualmente foi descoberta a partir de observações ao acaso e/ou a partir da busca de compostos sintéticos ou naturais (Hillish *et al.*, 2004). Modificações químicas de moléculas podem gerar compostos mais ativos, seletivos e biodisponíveis. Duas diretrizes evoluíram para aperfeiçoar o processo de busca de drogas: uma abordagem ao acaso, baseada em varredura *high-throughput* (HTS), e outra abordagem racional, baseada na estrutura de 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). Entretanto, essas técnicas demandam muito tempo e possuem alto custo. Já a abordagem envolvendo a análise da estrutura protéica baseia-se na busca por compostos que possam interagir especificamente com a proteína-alvo e, assim, inativá-la (Hillisch *et al.*, 2004).

O conhecimento da estrutura molecular de uma substância em nível experimental não é tarefa simples. Não existem muitos métodos capazes de caracterizar completamente uma dada estrutura, permitindo sua descrição precisa em termos de distâncias e ângulos de ligação, além de ângulos de torção (ou ângulos diedro) que definem sua conformação (Barreiro & Rodrigues, 1997). A estrutura de proteínas pode ser atualmente determinada com alta resolução por técnicas experimentais sofisticadas de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN). Entretanto, em alguns casos, essas informações estruturais não são facilmente obtidas por tais métodos como, por exemplo, a estrutura de proteínas de membrana. Vários fatores técnicos geram esta limitação, podendo-se destacar a dificuldade de cristalização dessas proteínas além do baixo rendimento na preparação da amostra para as técnicas de RMN, entre outras.

As informações estruturais de um grande número de macromoléculas biológicas estão disponíveis no banco de dados de estruturas de proteínas - *Protein Data Bank* (PDB - <http://www.pdb.org>). Entretanto, quando se tem a ausência de estrutura resolvida experimentalmente para uma determinada proteína, pode-se utilizar métodos computacionais para prever modelos protéicos tridimensionais e fornecer informações estruturais dessas proteínas (Cavasotto & Phatak, 2009). Neste contexto, as ferramentas de modelagem molecular *in silico* disponíveis são extremamente úteis para a predição estrutural de proteínas. Vale ressaltar que o crescimento do banco de dados PDB permite a busca por estruturas homólogas para predição estrutural por métodos teóricos de maneira satisfatória, com enorme vantagem sobre métodos experimentais mais dispendiosos.

A modelagem molecular por homologia consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos, que resulta na predição estrutural de proteínas com base em estruturas já

determinadas experimentalmente. Tal tratamento é fundamentado no fato de que a informação conservada em nível de seqüência primária de resíduos de aminoácidos de proteínas homólogas (com um ancestral comum) pode codificar um padrão estrutural tridimensional conservado definido pela relação estrutura/função da molécula. A modelagem molecular pode ser aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos desde que uma estrutura molde homóloga à proteína-alvo esteja disponível. O modelo preliminar de uma proteína desconhecida consiste de uma estrutura tridimensional derivada das coordenadas atômicas de outra estrutura já previamente determinada experimentalmente e que, em geral, corresponde a uma seqüência protéica com nível de identidade/similaridade aceitável (cerca de 30% - 50%). Por consequência, a predição da estrutura tridimensional de um alvo biológico via modelagem molecular permite explorar aspectos tridimensionais de reconhecimento molecular e gerar hipóteses que levam ao planejamento e síntese de novos ligantes. Portanto, o planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD – *Computer Assisted Drug Design*) facilita a investigação das interações químicas de um ligante ao seu alvo, e a exploração dos fatores estruturais relacionados ao efeito biológico e mecanismo de ação (Carvalho *et al.*, 2003).

Resumidamente, o processo de predição da estrutura tridimensional de uma proteína utilizando a modelagem molecular por homologia consiste em quatro etapas: 1) identificação da estrutura molde (*template*); 2) alinhamento da seqüência-alvo com a seqüência-molde; 3) construção e o refinamento do modelo que consiste principalmente em ajustar a molécula para que assuma menor estado de energia livre (minimização de energia) e; 4) validação do modelo (**Figura 1**).

A disponibilidade de programas computacionais e de bancos de dados são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Estas informações permitem uma pré-análise das propriedades físico-químicas versus atividade biológica potencial de uma série de moléculas de interesse, armazenadas em quimiotecas. Os novos agentes terapêuticos podem ser identificados por meio da análise da interação dos compostos candidatos aos modelos tridimensionais das proteínas-alvo (Carvalho *et al.*, 2003, Cavasotto & Phatak, 2009). A qualidade de modelos estruturais de proteínas gerados por modelagem comparativa e a sua aplicabilidade no processo de desenvolvimento de novos fármacos depende, predominantemente, do grau de similaridade sequencial entre a proteína com estrutura resolvida (proteína-molde) e a proteína a qual se deseja modelar (proteína-alvo). Tendo uma estrutura protéica sido estabelecida experimentalmente (molde), modelos podem ser gerados para a seqüência homóloga (alvo) a partir de 30% de similaridade entre as seqüências (Cavasotto & Phatak, 2009).

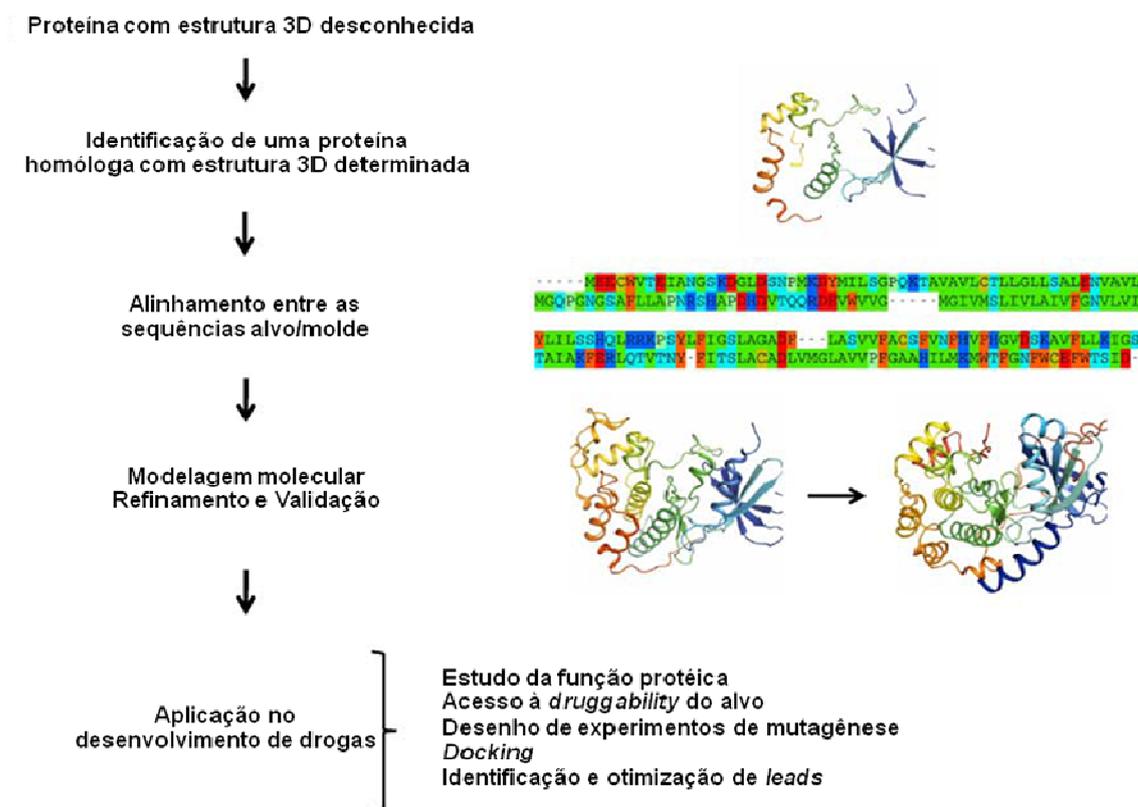


Figura 1. Etapas do processo de modelagem molecular por homologia e suas aplicações no desenvolvimento de novas drogas (Beautrait *et al.*, 2008, com modificações).

1.5) Varredura virtual de compostos ativos

Apesar de muitos avanços ocorridos durante a última década no desenvolvimento de drogas antifúngicas, as opções terapêuticas disponíveis ainda são poucas e, a resistência adquirida em relação às drogas antifúngicas, especialmente a azólicos e equinocandinas é uma preocupação crescente (Baddley & Moser, 2004, da Matta *et al.*, 2007, Mikulska *et al.*, 2011; Cantón *et al.*, 2011). A busca por drogas mais específicas, visando combater a resistência e minimizar os graves problemas de efeitos secundários causados pelos antifúngicos disponíveis, continua sendo um grande desafio (Wills *et al.*, 2000; Kontoyiannis & Lewis, 2002; Moreau *et al.*, 2002; Kuroyanagi *et al.*, 2010). A indústria farmacêutica também adota tecnologias como HTS para identificação de novos compostos para um determinado alvo molecular (Ghosh *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2012). A varredura virtual de compostos ativos depositados em quimiotecas tem despertado grande interesse na melhoria desses processos para a descoberta de novos medicamentos (Kortagere *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). As quimiotecas são bancos de dados de compostos químicos (*small*

molecules) com potencial de interação com proteínas-alvo. Bancos de dados como *Life Chemicals* (<http://www.lifechemicals.com/>) e *Chimiotèque Nationale* (<http://chimiotheque-nationale.enscm.fr/?lang=fr>) são fontes de pequenas moléculas comercialmente disponíveis.

A empresa *Life Chemicals Inc.*, Burlington, Canadá, sintetiza e comercializa cerca de 750.000 compostos com alta diversidade química. *Life Chemicals* 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; biblioteca de projetos especiais. 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 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. Todos os compostos fornecidos pela *Life Chemicals* apresentam alto grau de pureza.

A *Chimiotèque Nationale* foi criada em 2003 com o objetivo principal de agrupar coleções de produtos sintéticos, de compostos naturais e de extratos naturais existentes nos laboratórios públicos franceses, promovendo, assim, o desenvolvimento científico e industrial. Os compostos e os extratos disponíveis estão agrupados em duas bases de dados com mais de 44.000 compostos e 14.000 extratos, acessíveis através do portal da empresa. Todos os compostos fornecidos pela *Chimiotèque Nationale* também apresentam alto grau de pureza.

As estratégias de varredura virtual (VS) de compostos ativos depositados em quimiotecas tem sido de grande interesse no aprimoramento dos processos de desenvolvimento de novas drogas. A VS apresenta duas vantagens: a velocidade em que uma grande quimioteca de compostos químicos pode ser analisada e o pequeno capital de investimento inicial comparado aos custos de um programa de varredura HTS *in vitro* (Shoichet, 2004; Stahura & Bajorath, 2004). O principal objetivo da VS é identificar e selecionar a partir de um banco de dados de compostos químicos, os principais candidatos que tenham interação com uma determinada proteína-alvo. Os compostos candidatos (*hits*) são os primeiros compostos inibidores identificados, mas não são necessariamente as moléculas ideais, já os *leads* são inibidores potenciais. Dessa forma, os *hits* podem ser otimizados até os inibidores potenciais por análises computacionais de interação alvo-droga e predições de farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). O *lead*

ideal é então preparado para os testes pré-clínicos e clínicos (Stahura & Bajorath, 2001; Odds, 2005).

Com o objetivo de fornecer uma ferramenta de fácil utilização para encontrar os *hits*, Beautrait e cols. (2008) 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 2** pode ser definida em três etapas: 1) preparação dos ligantes, 2) preparação da molécula-alvo e 3) processo de ancoragem molecular baseado em estrutura.

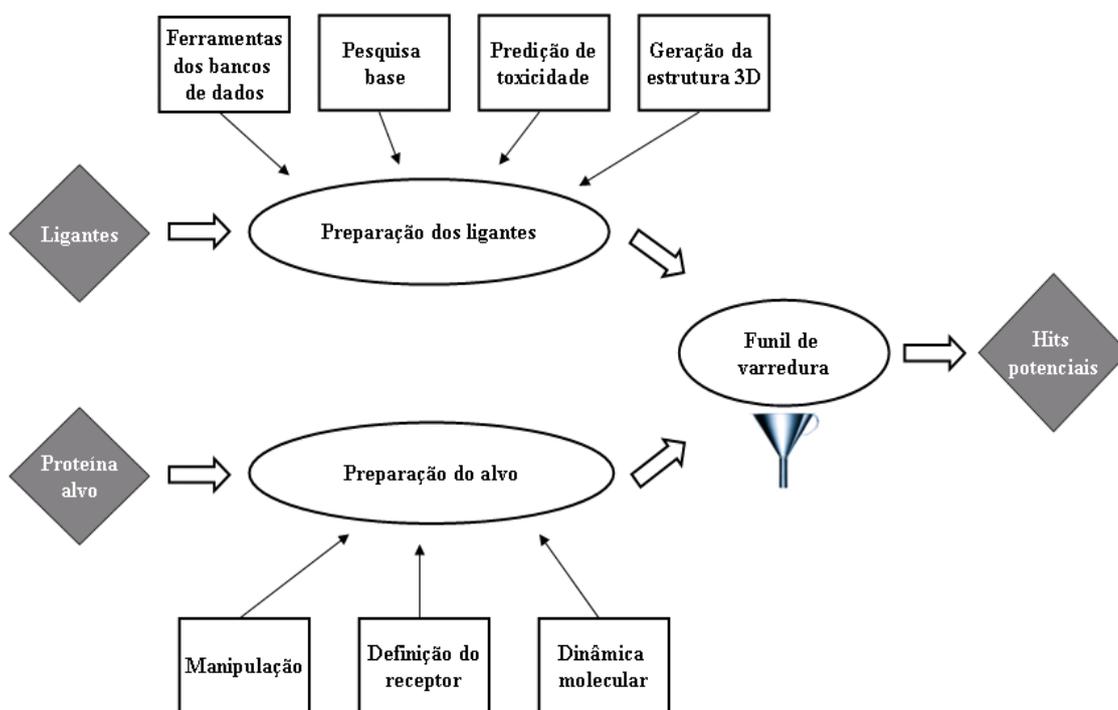


Figura 2. Estratégia de varredura virtual de novas drogas (Beautrait *et al.*, 2008, com modificações).

A VS é constantemente aplicada a estruturas de modelos tridimensionais elaborados a partir da estratégia da modelagem comparativa. Assim, em relação à preparação do alvo, a proteína definida como alvo passa por uma simulação de dinâmica molecular para refinamento dos modelos homólogos. Dinâmica molecular é uma simulação da evolução de um sistema de partículas individuais ao longo do tempo (Karplus & McCammon, 2002) visando com isto identificar quais as mais prováveis conformações que uma determinada

proteína pode adquirir no espaço. Estas simulações são realizadas por cálculos de aceleração, velocidade e posições das partículas para cada intervalo de tempo. Assim, a dinâmica molecular clássica calcula basicamente a posição atômica de cada átomo constituinte do sistema em distintos e consecutivos instantes de tempo. Este conjunto de coordenadas de cada átomo do sistema, e sua evolução temporal, descreve a trajetória do sistema e, com isso, mostra sua estabilidade estrutural.

Com relação à preparação dos ligantes, a seleção das moléculas é feita em bancos de dados de compostos químicos como *Life Chemicals* e *Chimiotèque Nationale*. Com o auxílio desses bancos de dados de moléculas, os métodos de VS podem ter duas abordagens distintas: a primeira corresponde à exclusão de um grande número de compostos, levando a um conjunto limitado de moléculas com maiores chances de serem *hits*. A segunda abordagem se caracteriza na identificação de compostos similares, reduzindo o número de candidatos potencialmente usados para gerar o *hit* (Beautrait *et al.*, 2008). Os protocolos de VS são baseados em filtros que reduzem o número de compostos a serem testados experimentalmente, reduzindo, portanto, o custo dos experimentos de teste *in vitro* e *in vivo* (Waszkowycz *et al.*, 2001; Bleicher *et al.*, 2003). Em cada etapa do processo, o filtro descarta os compostos inadequados. A **Figura 3** mostra um esquema representativo resumido da metodologia VS, destacando os principais processos desta estratégia.

A varredura virtual de quimiotecas permite, portanto, simular o teste de atividade de centenas de milhares de moléculas sobre proteínas-alvo utilizando para isso técnicas de varredura em larga escala. O processo de ancoragem molecular permite efetuar a triagem rápida de grandes quimiotecas que compõem milhões de moléculas (Beautrait *et al.*, 2008).

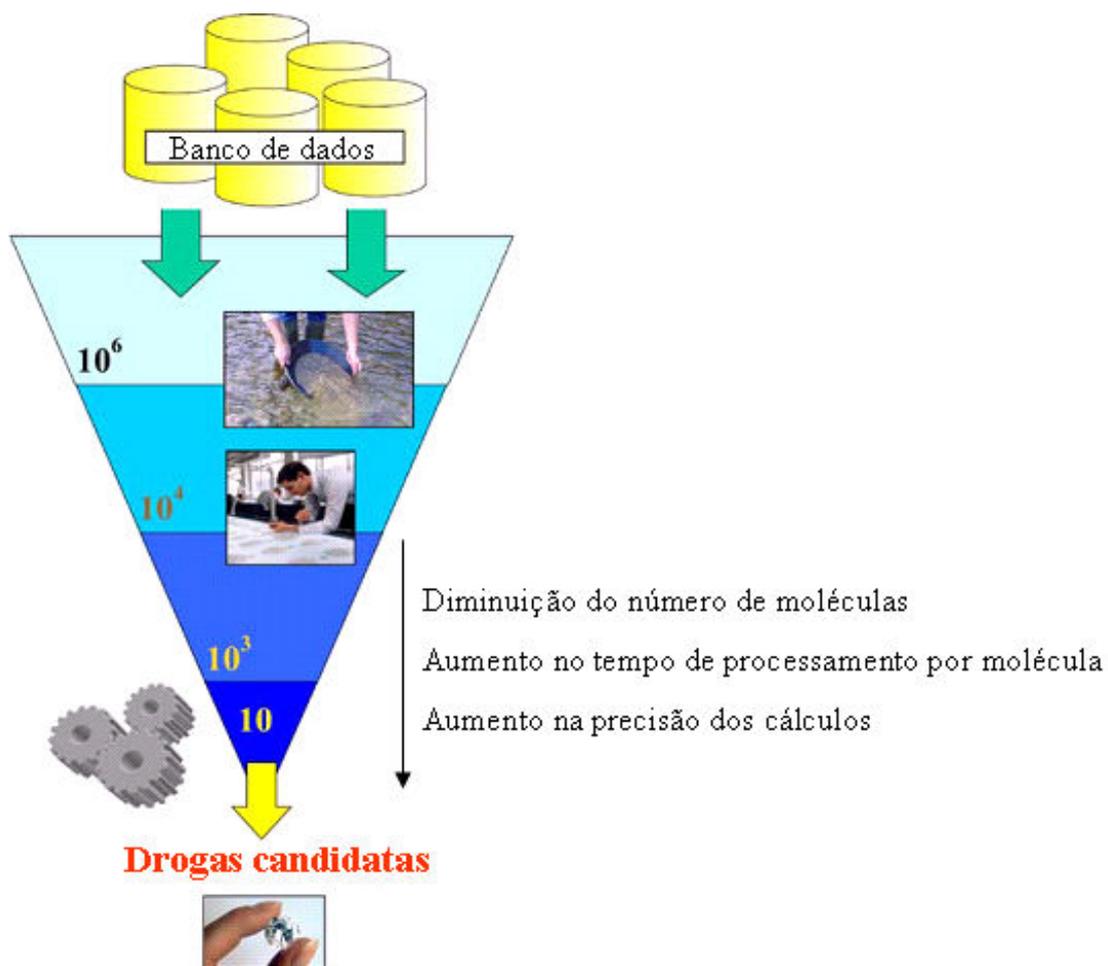


Figura 3. Estratégia do processo de filtração na varredura virtual (Beautrait *et al.*, 2008, com modificações)

2. JUSTIFICATIVA

Devido à alta relevância em saúde pública e, importante contribuição para pesquisa, nas suas áreas básica e aplicada, os projetos genomas têm, cada vez mais, focado na obtenção de dados de espécies patogênicas humanas. Este projeto de doutorado contribuiu para gerar dados relevantes visando o entendimento da biologia destes patógenos, bem como dados com potencial de aplicação e inovação tecnológica. O projeto se propôs a utilizar os dados de genômica comparativa dos fungos patogênicos para identificar genes-candidatos e, conseqüentemente alvos moleculares (proteínas essenciais ou que afetam a viabilidade celular de patógenos) iniciando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. A problemática mundial de resistência aos antifúngicos comercialmente disponíveis, a incapacidade destes atuarem em alguns fungos patogênicos, bem como o grave problema de toxicidade/efeitos colaterais causados pelas drogas existentes justifica o desenvolvimento de novos fármacos. Este projeto se propôs a utilizar tecnologias *in silico* (modelagem molecular e varredura virtual de quimiotecas), as quais são norteadoras e catalisam a busca de novas drogas. Os resultados alcançados poderão diminuir o tempo necessário para a identificação de novas drogas antifúngicas eficazes, tanto para paracoccidiodomicose quanto para as outras micoses de relevância mundial.

3. OBJETIVOS

3.1) Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi identificar genes-alvo (*trr1* e *kre2*), por meio de genômica comparativa, no transcriptoma/genoma do *P. lutzii* (Pb01) e também em genomas de outros fungos patogênicos humanos de alta relevância mundial como *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* (Pb3), *P. brasiliensis* (Pb18) e, sobretudo, ausentes no genoma humano visando o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Pretende ainda, por varredura virtual, identificar novas drogas inibidoras das enzimas codificadas pelos genes-alvo após modelagem molecular, bem como proceder aos ensaios de inibição tanto da enzima recombinante purificada (TRR1) como da capacidade fungicida/fungistática em fungos patogênicos em cultura (MIC).

3.2) Objetivos específicos

- 1) Selecionar e identificar pelo menos dois genes-alvo (essenciais ou que afetam a viabilidade celular de patógenos) por genômica comparativa dos 9 fungos patogênicos humanos;
- 2) Verificar a ausência dos genes pré-selecionados no genoma humano;
- 3) Realizar a expressão heteróloga dos genes-alvo (*trr1* e *kre2*) e purificar as proteínas recombinantes;
- 4) Em paralelo, realizar a modelagem molecular das proteínas-alvo TRR1 e KRE2;
- 5) Identificar, por varredura virtual, novas moléculas que possam interagir e inibir a atividade enzimática das proteínas-alvo;
- 6) Realização de testes *in vitro* dos inibidores selecionadas, tanto utilizando a enzima recombinante (TRR1) como também em cultura de fungos patogênicos humanos (determinação do MIC para as moléculas inibidoras das moléculas-alvo).

4. MATERIAIS

4.1) Linhagens de *E. coli* para expressão das proteínas recombinantes.

- **DH5 α** - *E. coli* F- ϕ 80*lacZ*.M15 .(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ -
- **BL21 (λ DE3)** - *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ (DE3)

4.2) 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.

4.3) Soluções principais

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

- **Solução estoque de tampão fosfato-salina (PBS):** NaCl 2,7378M, KCl 0,053 M, Na₂HPO₄ 0,1301M e K₂HPO₄ 0,0229M. 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.

4.4) Meios de cultura para crescimento de *E. coli*

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

- **Meio LB (Luria-Bertani)** – 1% de peptona de caseína (p/v), 0,5% extrato de levedura (p/v) e 1% de NaCl (p/v), pH 7,2.
- **Meio LB Amp** – meio LB acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina. As soluções de antibióticos foram adicionadas em meio com agar antes de solidificar (temperatura inferior a 40°C).

4.5) Antibióticos para seleção das células transformadas

- **Solução estoque de Ampicilina (100mg/mL)** - Ampicilina sódica foi dissolvida em água bidestilada, esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,2 μ m e armazenada a -20°C. Concentração final de uso: 100 μ g/mL.

4.6) Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE:** Tris-HCl 62 mM, pH 8,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β -mercaptanol 50mM, 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 bi-destilada 100 mL q.s.p.
- **Tampão para gel de proteína (separação):** Tris-HCl 3,0M, pH 8,8.
- **Tampão para gel de proteína (concentrador):** Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4%.
- **Solução de SDS 10% -** 10% de SDS (p/v).
- **Tampão de corrida para SDS-PAGE:** Tris 25mM, glicina 190mM, 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).

4.7) 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 Brilliant Blue R250” (p/v).
- **Descorante –** 40% de metanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v)

4.8) Meios de cultura, soluções e solvente usados nos testes 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 Sabouraud Dextrose Ágar (Difco)**
- **Meio BHI (Infusão de coração e cérebro) (Difco)**
- **Meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%)**
- **Solução salina –** Cloreto de sódio 0,85%
- **DMSO** (Dimetilsulfóxido)

4.9) Leveduras para os testes de suscetibilidade a antifúngicos

- *Paracoccidioides lutzii* (isolado 01)

- *Paracoccidioides brasiliensis* (isolados 18 e 265)
- *Candida albicans* (ATCC 90028)
- *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)
- *Candida tropicalis* (ATCC 750)
- *Cryptococcus neoformans* (H99)

4.10) Drogas utilizadas nos testes de suscetibilidade a antifúngicos

- **F0170-0365** – (Life Chemicals)
- **F0266-4227** – (Life Chemicals)
- **F0608-0758** – (Life Chemicals)
- **F0876-0030** – (Life Chemicals)
- **F1109-0100** – (Life Chemicals)
- **F1806-0122** – (Life Chemicals)
- **F2252-0157** – (Life Chemicals)
- **F3010-0057** – (Life Chemicals)
- **F3222-4930** – (Life Chemicals)
- **F3222-5837** – (Life Chemicals)
- **F3263-0059** – (Life Chemicals)
- **F3307-0033** – (Life Chemicals)
- **F3307-0100** – (Life Chemicals)
- **F3394-0412** – (Life Chemicals)
- **F3394-0585** – (Life Chemicals)
- **F3398-5211** – (Life Chemicals)
- **F5008-0377** – (Life Chemicals)
- **F5226-2261** – (Life Chemicals)
- **F5652-2782** – (Life Chemicals)
- **F5754-0452** – (Life Chemicals)
- **F5882-1949** – (Life Chemicals)
- **F5912-0731** – (Life Chemicals)
- **Fluconazol** (Sigma-Aldrich)
- **Anfotericina B** (Sigma-Aldrich)

4.11) Componentes dos ensaios de atividade enzimática da tioredoxina redutase

- **TRR1** (Tioredoxina redutase recombinante de *P. brasiliensis* Pb01)

- **Trx3** (Tioredoxina de *S. cerevisiae*, gentilmente fornecida pelo Dr. Luís Eduardo Soares Netto - USP)
- **DTNB** (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzólico))
- **NADPH** (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-reduzido)
- **BSA** (Albumina de soro bovino)
- **EDTA** (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

4.12) Drogas utilizadas nos testes de inibição da atividade enzimática de TRR1

- **F0876-0030** – (Life Chemicals)
- **F1806-0122** – (Life Chemicals)
- **F3307-0100** – (Life Chemicals)

5. MÉTODOS

5.1) Análise comparativa dos genomas de fungos patogênicos humanos e seleção dos genes-alvo para drogas

A identificação dos genes-alvo foi baseada em 57 genes essenciais previamente descritos experimentalmente para *C. albicans* e *A. fumigatus*. As 57 sequências foram recuperadas do banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e utilizadas na varredura no banco de dados do transcriptoma de *P. lutzii* (Pb01) (<https://helix.biomol.unb.br/Pb/>), através de ferramentas de alinhamento múltiplo usando o programa Blastn. Em seguida, foi confirmada a presença destes genes nos genomas de *P. lutzii* (Pb01) e dos dois isolados de *P. brasiliensis* (Pb3 e Pb18). Utilizando as sequências de *P. lutzii* (Pb01), depositadas pelo *Broad Institute* - USA, foi realizada a busca de ortólogos nos fungos patogênicos: *A. fumigatus*, *B. dermatitidis* ER3, *C. albicans* WO1, *C. immitis* H538.4, *C. neoformans* sorotipo B e *H. capsulatum* NAm1, e no genoma humano, por meio do programa Blastx. O *cut-off* estabelecido para determinar a presença dos ortólogos foi de *E-value* máximo de 0,00001 (1e-5).

5.2) Alinhamento múltiplo dos genes ortólogos

O programa ClustalW é uma ferramenta que executa alinhamentos globais utilizando programação dinâmica e o método hierárquico (Thompson *et al.*, 1994), ou seja, utiliza o alinhamento de múltiplas seqüências. O programa foi utilizado para identificar regiões de conservação das seqüências protéicas entre os genes-alvo ortólogos.

5.3) Modelagem molecular das proteínas-alvo

O processo de obtenção das estruturas teóricas das proteínas-alvo por modelagem molecular por homologia estrutural envolveu quatro etapas:

- ✓ Busca de proteínas ortólogas,
- ✓ Alinhamento das seqüências,
- ✓ Construção dos modelos,
- ✓ Otimização e refinamento dos modelos.

A primeira etapa consistiu na identificação de estruturas tridimensionais que possam atuar como uma base para a modelagem da seqüência-alvo (proteína-alvo). Para tal foi realizado o alinhamento das seqüências 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.gov/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 seqüência.

As etapas de obtenção das estruturas teóricas das proteínas-alvo foram realizadas utilizando o módulo de homologia do programa Insight II (Biosym/MSI, San Diego, Accelrys Inc., 2001). As seqüências-alvo foram alinhadas com as sequências primárias das estruturas-molde, verificando especialmente o alinhamento dos resíduos de cisteína que participam de pontes dissulfeto. A construção dos modelos foi feita a partir dos moldes, onde as coordenadas atômicas foram transferidas para os alvos TRR1 e KRE2. 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 em três etapas. 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 em 1000 passos. Uma segunda minimização, também pelo método de gradiente conjugado em 1000 passos, foi realizada somente com os átomos dos *loops* em movimento. A última etapa de minimização, nesse caso em 100 passos, foi realizada pelo método *Steepest-descent* com todos os átomos móveis, resultando em estruturas tridimensionais refinadas. A visualização dos modelos foi obtida pelo programa PyMOL versão 0.99rc6 (Delano Scientific, www.pymol.org).

5.4) 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 das proteínas-alvo TRR1 e KRE2 selecionadas. Esta metodologia foi definida em três etapas principais: preparação da molécula alvo, preparação dos ligantes e processo de seleção dos compostos por ancoragem molecular (*docking*), conforme será descrito a seguir.

5.4.1) Preparação das proteínas-alvo

Os modelos teóricos das proteínas-alvo TRR1 e KRE2 foram primeiramente submetidos a simulações de dinâmica molecular, a fim de obter modelos com arranjo mais precisos e com um melhor relaxamento. Para isto, as proteínas foram inicialmente solvatadas em uma caixa de moléculas de água de 80 X 80 X 80 Å³, usando o modelo TIP3P (Jorgensen *et al.*, 1983), para simular o meio biológico de uma forma mais próxima da realidade, utilizando o programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey *et al.*, 1996). Em seguida, ainda no programa VMD, íons Cl⁻ foram adicionados para garantir a

neutralidade eletrostática. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando o programa de NAMD (Phillips *et al.*, 2005), empregado em conjunto com o campo de força usado pelo programa CHARMM22 (MacKerell *et al.*, 1998), incluindo interações locais que consistem de interação entre 2, 3 e 4 átomos e interações eletrostáticas e de van der Waals, para gerar a trajetória e descrever as proteínas, os íons e as moléculas de água. De um modo geral, as partículas do sistema foram distribuídas em uma rede cúbica e, posteriormente, deslocadas aleatoriamente de suas posições iniciais.

O campo de força usado pelo programa CHARMM22 é um conjunto de potenciais de interação entre as partículas, sendo representado pela equação de energia potencial total do sistema:

$$V_{\text{total}} = \sum k_l (r - r_0)^2 + \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum k_\phi [1 + \cos(n_\phi - \delta)] + \sum k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum k_u (u - u_0)^2 + \sum \epsilon [(R_{ij}/r_{ij})^{12} - (R_{ij}/r_{ij})^6] + q_i q_j / \epsilon r_{ij}$$

onde, k_θ , k_ϕ , k_ω e k_u são constantes de força. O primeiro termo representa a energia devida à deformação dos comprimentos de ligação (estiramento), onde r_0 é o parâmetro estrutural de referência para os comprimentos de ligação r . O segundo termo representa a energia devida à variação dos ângulos de ligação (vibrações), onde θ_0 é o parâmetro estrutural de referência para os ângulos de ligação θ . O terceiro termo representa a variação dos ângulos diedros de torção, onde n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, Φ é o ângulo diedro e δ é ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $\Phi = 0$). O quarto termo representa a variação dos ângulos de torção imprópria, ou seja, ângulos que estão fora do plano de torção, onde ω_0 é o parâmetro estrutural de referência para os ângulos de torção ω . O quinto termo representa o componente Urey-Bradley (representa ângulo de torção utilizando interações não-ligadas 1,3), onde u é a distância entre os átomos 1,3 no potencial harmônico. As interações entre pares de átomos não ligados covalentemente (i, j) são descritas por potenciais compostos pelas interações de van der Waals e eletrostáticas, representadas respectivamente pelos potenciais de Lennard-Jones (sexto termo) e de Coulomb (sétimo termo). No sexto termo, R_{ij} é o parâmetro para a interação entre os átomos i e j , r_{ij} é a distância entre os átomos i e j . No sétimo termo, q_i e q_j são as cargas parciais dos átomos i e j , ϵ é a constante dielétrica relativa, r_{ij} é a distância entre os átomos i e j .

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, realizando

6.400 passos do método de gradientes conjugados. Durante o equilíbrio do sistema, a simulação foi conduzida até que as propriedades do sistema como energia potencial e energia total mantenham-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). As simulações foram realizadas em um sistema isobárico-isotérmico, mantidas sob pressão e temperatura constantes de 1atm e 300K, respectivamente, por meio da dinâmica de Langevin. As equações de movimento foram integradas usando o algoritmo r-RESPA (Humphreys *et al.*, 1994) para atualizar as contribuições de curto e de longo alcance em diferentes frequências. Interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas utilizando a abordagem de malha de partícula de Ewald (Darden *et al.*, 1993), com 11Å de *cut-off* para o cálculo do espaço real. 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.

5.4.2) Preparação dos ligantes

Os ligantes utilizados são moléculas presentes nos bancos de dados *Chimiotèque Nationale* (<http://chimiotheque-nationale.enscm.fr/?lang=fr>) e *Life Chemicals* (<http://www.lifechemicals.com/>), apresentando 43.000 e 750.000 moléculas, respectivamente. 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 (coeficiente de Jaccard) (Jaccard, 1901).

Os parâmetros utilizados pelo programa Filter para realizar a filtragem das moléculas foram:

- ✓ 350 Da < massa molecular < 650 Da
- ✓ 9 < número de átomos (excluindo hidrogênio) < 55
- ✓ 0 < número de anéis < 5
- ✓ Máximo de 10 grupos funcionais
- ✓ Máximo de 25 rotâmeros
- ✓ 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 permitiu mensurar a similaridade entre duas moléculas por um ponto de vista químico. Foram eliminadas as moléculas que apresentaram $T > 0,5$ (*Chimiotèque Nationale*) e $T > 0,2$ (*Life Chemicals*). Um total de 11.000 compostos dos bancos de dados selecionados por esses filtros foram pré-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.

5.4.3) Processo de seleção dos compostos por ancoragem molecular (*docking*)

Antes da simulação de *docking*, as cavidades das proteínas TRR1 e KRE2 foram identificadas por meio do programa PocketPicker (Weisel *et al.*, 2007). Esse programa baseia-se no mapeamento das 5 possíveis cavidades da proteína globular. Após a identificação das cavidades, o programa Ligsite (Hendlich *et al.*, 1997) forneceu as coordenadas do centro de origem geométrico para cada cavidade.

As simulações de ancoragem molecular foram realizadas pelo programa GOLD 3.2 (Jones *et al.*, 1997), que permite flexibilidade parcial do receptor na região do sítio ativo, realizando assim um cálculo de interação semi-flexível entre o ligante e a cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos da proteína-alvo. Como parâmetros de finalização do *docking*, foram consideradas as 5 conformações dos ligantes com distância inferior a 1,5 Å, em relação ao receptor. Assim, o *docking* para cada molécula foi interrompido quando se alcançava 5 conformações com valores de RMSD no limite proposto

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 escores, ou seja, nas afinidades de ligação preditas. Os valores de escore 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 escores são classificados como os que possuem melhores afinidades de ligação com a proteína. Dessa forma, o programa fornece um *ranking* com os melhores ligantes.

5.5) Teste de suscetibilidade aos antifúngicos potenciais

Para avaliar o perfil de suscetibilidade dos fungos patogênicos aos antifúngicos, foi realizado o teste de microdiluição em caldo utilizando método proposto pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2005), de acordo com o protocolo M27-A2 (antigo NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Foram determinadas a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima fungicida (MFC) para os patógenos utilizados.

5.5.1) Agentes antifúngicos

As 22 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 0,165M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich)]. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como diluente para as moléculas da *Life Chemicals*. Os fungos foram incubados na ausência e presença de DMSO 1% (vol/vol) para confirmar que a exposição a esse solvente não influencia no crescimento dos isolados testados.

5.5.2) Fungos

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados em cinco leveduras: *P. lutzii* (isolado Pb01), *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb265), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. neoformans* (H99). Anteriormente aos testes, cada cepa de *Candida* spp. foi subcultivada em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) e incubada a 30°C por 1 dia. *C. neoformans* foi subcultivado em meio YPD Agar (Yeast Peptone Dextrose; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) a 30°C por 2 dias. *P. lutzii* (Pb01) e cada isolado de *P. brasiliensis* foi subcultivado em meio Fava-Netto Agar (Netto et al., 1969) a 36°C por 5 dias.

5.5.3) Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima fungicida (MFC)

Os inóculos das leveduras foram preparados em tampão salina estéril (0,85%), na concentração final de $1-2 \times 10^3$ células/mL. Os testes foram realizados em microplacas estéreis (TPP Zellkultur Test Plate 96F, Suíça) contendo 96 poços. Como controles foram utilizados RPMI sem inóculo (negativo) e RPMI acrescido de DMSO (controles positivos).

A cepa de *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foi utilizada como levedura referência para todos os testes. O tempo de incubação variou conforme o fungo testado sendo 48h, a 37°C (*Candida* spp.), 9 dias, a 37°C (*P. lutzii* e *P. brasiliensis*.) e 48h a 35°C (*C. neoformans*). Os dados foram apresentados para MIC₅₀ e MIC₈₀, que correspondem à concentração de cada antifúngico capaz de inibir 50% ou 80% do crescimento dos isolados, respectivamente. Para determinar a concentração mínima fungicida (MFC), subculturas de todos os poços que apresentaram inibição do crescimento foram plaqueadas em meio SDA para espécies de *Candida* spp. ou em meio BHI (Infusão de coração e cérebro, DIFCO) para *Paracoccidioides* spp. A MFC₉₀ para cada droga foi definida como a MFC capaz de inibir 90% do crescimento do isolado. Todas as determinações de MIC e MFC foram feitas em duplicatas.

5.6) Síntese química do gene-alvo *trr1* para expressão heteróloga

Com a finalidade de otimizar o processo de expressão heteróloga das proteínas, o gene-alvo *trr1* selecionado de *P. lutzii* (Pb01) foi sintetizado 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*. O gene *trr1* foi desenhado 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. Em seguida, foi feita a análise da porcentagem de bases nitrogenadas G e C. O gene foi clonado no vetor de expressão bacteriano pET-21a (Novagen) sob o controle transcricional da T7 RNA polimerase. A **Figura 4** mostra a sequência otimizada do gene *trr1* sintetizado.

> Gene *trr1* de *P. lutzii* otimizado para expressão em *E. coli*

```
CATATGAAACACTCCAAAGTTGTAGTAATCGGCTCTGGCCCGGCAGCGCACACCGCGGCTATCTACCTGTCT
CGTGCTGAACTGAAACCGGTACTGTACGAAGGTATGATGGCCAACGGTACCGCAGCCGGTGGTCAACTGACC
ACCACCACCGACGTGGAGAACTTCCCAGGCTTCCCGCACGGTATTGGCGGTTCCGAACTGATGGACAACATG
CGCGCTCAGTCTGTTTCGTTTCGGCACCGAAATCATCAGCGAAACCGTATCTCGCGTTGATCTGTCTTGCCGC
CCGTTCAAACCTGTGGAAAGAATTCCTCCGACGGCCCAGATGACGCACCGGCGCACACTGCAGATGCGCTGATC
GTTGCTACCGGTGCGAACGCGCGTCTGGACCTGCCAGGTGAGCAGCAATACTGGCAAAACGGCATCTCT
GCATGCGCGGTATGTGATGGCGCGGTACCAATCTCCGTAACAAAACCGCTGTTTCGTGATCGGTGGCGGCGAC
AGCGCCGCTGAAGAAGCAATGTTTCTGACCAAGTACGGTAGCAAAGTAACCGTGCTGGTACGCCGTGACAAA
CTGCGTGCTTCCAAAACCATGGCGAAGCGCCTGCTGGTGAACCCGAAAGTTGAAGTGAATTC AACACCCGTG
GCTGTGGAAGTTCAGGGCGAACCGGCCCCACGCGGCCCTGGTAACTCATCTGAAAATCAAGAATGTTGTTAGC
GGTGTGAAGAAGTTGTACCGGCGAACGGCCTGTTTTATGCCGTTGGTCATGATCCGGCTACTGCTCTGGTG
AAAGGTCAAGTGGAAACCGACGCAGAGGGTTACATGTTACTAAACCGGGTACCTCTTATACTAGCGTTCCG
GGTGTTCCTGCTGCCGGTGACGTTTCAGGACCGTCGTTATCGCCAGGCTATTACCTCCGCGGGTTCTGGCTGT
ATCGCCGCACTGGAAGCGGAGAAATACATTGCGGAATCTGAAGGCGGTGATGAGCCACCGTTTGTAGCGACC
TCCATCGAACAGAGCAACCAGGGTGA AACGCCTCCGCCGACCCTGGAATACACCAGCAACCCGCTGCTCGAG
```

Figura 4. Sequência de nucleotídeos do gene *trr1* de *P. lutzii* (Pb01) otimizada para expressão heteróloga em *E. coli*. Os nucleotídeos em vermelho representam os sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* (CAT) e *XhoI* (CTCGAG).

5.7) Expressão heteróloga do gene-alvo *trr1* selecionado para indução da proteína recombinante

Dentre os vários sistemas de expressão disponíveis para produção de proteínas heterólogas, a bactéria *E. coli* é um dos mais utilizados e atrativos. Isto se deve à sua capacidade de crescer rapidamente, com altas concentrações celulares e em substratos baratos, além de sua genética ser bem conhecida e haver disponibilidade de muitos vetores e cepas mutantes (Baneyx, 1999).

5.7.1) 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 horas, 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 Erlenmeyer 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 minutos a 4 °C, 5000 xg. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e em seguida, mantido em gelo por 15 minutos. As células foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 4°C, 5000xg. O sobrenadante foi novamente removido e o *pellet* foi ressuspensionado 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.

5.7.2) Transformação de *E. coli* por choque térmico

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

5.7.3) Indução da expressão da proteína recombinante TRR1

Para realizar a indução da expressão heteróloga da proteína recombinante TRR1 foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3). Inicialmente, foram preparadas células termocompetentes e realizada a transformação por choque térmico para inserção do vetor, segundo Sambrook e cols. (2001). A cepa *E. coli* BL21 (λ DE3) transformada foi semeada em placas contendo LB Agar e ampicilina 100 μ g/mL. Uma indução em pequena escala foi realizada para verificar a capacidade da cepa de *E. coli* expressar a proteína desejada. Foram escolhidos aleatoriamente três clones transformantes e cada um foi inoculado em 5 mL de meio LB com ampicilina 100 μ L/mL. Os inóculos cresceram por aproximadamente 16 h a 37°C, 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). Foram inoculados 1,25mL do pré-inóculo em 25 mL de meio LB contendo o devido antibiótico. Os inóculos foram incubados por aproximadamente 60 min. a 37°C, 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific), 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 para uma concentração final de 0,5 mM, e retornou-se a incubação por aproximadamente 16 h a 20°C, 250 RPM (Shaker da Empresa New Brunswick Scientific). Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 2, 4, 6 e 16 horas de incubação. As amostras retiradas nos respectivos tempos foram centrifugadas por 2 minutos, 13.000xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 50 μ L de tampão de amostra TEB 2X.

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

A proteína recombinante foi analisada 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 minutos e 10 μ L de cada uma delas e os marcadores de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) e

pré-corado *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD) foram aplicados no gel de poliacrilamida. 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.

5.7.5) Coloração e visualização do gel

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

5.7.6) Western-blot

O outro gel foi incubado por 30 min em solução de transferência e a partir da utilização do equipamento Trans-Blot SD Semi-Dry Eletrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) foi feita a transferência da proteína para a membrana de nitrocelulose, conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante da membrana (Amershan 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 poliacrilamida 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 submetidos a uma corrente elétrica de 15V durante 15 minutos. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado comercial (5%) em PBST 1X por 1 hora a temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 1X por 5 minutos e, então, incubada durante 2 horas a temperatura ambiente, sob leve agitação, com 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 minutos 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.

5.8) Purificação da proteína TRR1 recombinantes por cromatografia de afinidade

A construção gênica foi conduzida de modo a adicionar uma cauda de 6 (seis) histidinas (His Tag) à sequência protéica tendo em vista proceder à purificação em colunas

de cromatografia de afinidade. Após a indução da expressão do gene *trr1*, o material de indução foi centrifugado por 20 minutos, 4°C, 8.000xg. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 8 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM e Imidazol 10mM). As células bacterianas foram rompidas utilizando o aparelho Vibra Cell (Sonics). Foi utilizada uma amplitude de 60%, aplicando 10 pulsos de 10 segundos com intervalos de 1 minuto. Durante a sonicação as amostras foram mantidas sempre no gelo. Após a sonicação, o extrato foi centrifugado por 30 min. a 4°C, 8.000xg. 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* (GE Healthcare) de cromatografia de afinidade por meio de três lavagens com 10mL de água destilada. Durante a purificação a fração *flow-through* foi coletada. Em seguida, foram realizadas duas lavagens (contendo imidazol 20 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 300 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 A_{595nm}.

5.9) Identificação dos genes ortólogos *trx1*, *trx2* e *trx3* em *P. lutzii* (Pb01)

As sequências dos genes *trx1*, *trx2* e *trx3* de *S. cerevisiae* foram coletadas no banco de dados e comparadas com os genes caracterizados no genoma de *P. lutzii* (Pb01). Com a finalidade de identificar os ortólogos no genoma de *P. lutzii* (Pb01), as sequências dos genes *trx1*, *trx2* e *trx3* de *S. cerevisiae* foram blastadas no genoma de *P. lutzii* (Pb01) via Blastp. Foram identificados dois genes no genoma de *P. lutzii* (Pb01) com alta homologia (*e-value* ≥ 1e-13) e as sequências foram alinhadas com os genes de *S. cerevisiae* através do algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), implementado no programa BioEdit (Hall, 1999). O genes ortólogos foram identificados por análise filogenética usando a metodologia de Máxima Verossimilhança implementado no programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011).

5.10) Ensaio enzimático da atividade de TRR1 recombinante

Os estudos cinéticos foram realizados com a enzima tioredoxina redutase (TRR1) recombinante de *P. lutzii* (Pb01). Como substrato dessa enzima, foi utilizada a tioredoxina

de *S. cerevisiae* (Trx3). Esse substrato foi utilizado por duas razões: i) o gene *trx3* de *P. lutzii* (Pb01) ainda não foi sintetizado e, portanto, não foi possível obter a proteína pura para usar como substrato no ensaio de atividade; ii) tioredoxina redutase de *P. lutzii* (Pb01) possui 65% de identidade de sequência primária com a tioredoxina redutase de *S. cerevisiae* (**ver Tabela 3**), tendo assim a possibilidade de atuar sobre a Trx3 desse 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 tioredoxina de *S. cerevisiae* (Trx3) 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 $A_{412\text{ nm}}$ (Arnér et al., 1999; Oliveira et al., 2010).

O experimento foi realizado a 25 °C em espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu). A reação foi iniciada pela adição de tioredoxina redutase 0,1 μM , o substrato Trx3 em concentrações variadas de 0,5 a 8,0 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 segundos iniciais. Os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_{m} foram determinados a partir da equação de Michaelis-Menten usando o programa GraphPad Prism. A atividade da enzima TRR1 foi medida em todos os ensaios subtraindo as velocidades das reações do controle (sem Trx3), e três experimentos independentes foram realizados para cada concentração de Trx3.

5.11) Teste de inibição das moléculas do banco de dados *Life Chemicals*

As moléculas inibidoras testadas no ensaio de inibição foram F0876-0030, F1806-0122 e F3307-0100. Essas moléculas foram selecionadas pela varredura virtual por interagir com a proteína TRR1 e apresentar atividade antifúngica *in vitro* contra pelo menos 3 fungos patogênicos (**ver Tabelas 5-8**). Para testar a inibição de TRR1 pelas moléculas F0876-0030, F1806-0122 e F3307-0100, foram realizados ensaios de cinética enzimática da enzima tioredoxina redutase com Trx3 nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 μM . Além disso, foram adicionados inibidores nas concentrações: 32,5 e 65 nM (F0876-0030), 155 e 310 nM (F1806-0122) e 32,5 e 65 nM (F3307-0100), baseado em testes de inibição preliminares com intervalos maiores de concentração destas drogas. As reações foram realizadas na presença e ausência de inibidor. 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 para ambas as condições (presença e ausência de inibidor). Foram também determinados os valores da constante de inibição (K_i), IC_{50} e o tipo de inibição em relação ao substrato Trx3.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1) Genômica comparativa na seleção dos genes-alvo para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

A identificação de genes essenciais ou relevantes para viabilidade celular oferece uma estratégia alternativa para a busca de novos alvos para drogas antifúngicas. Roemer e cols. (2003) e Hu e cols. (2007) demonstraram experimentalmente a essencialidade de genes para dois fungos patogênicos *C. albicans* e *A. fumigatus*, utilizando estratégias de substituição de gene e expressão condicional (GRACE) e substituição de um promotor condicional (CPR), respectivamente. Os 55 genes descritos por estes dois autores foram experimentalmente definidos como essenciais e possuem amplo espectro de funções biológicas, tais como metabolismo celular, organização e biogênese da parede celular, biossíntese de ergosterol, biogênese ribossomal e modificações pós-traducionais de proteínas (Roemer *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007).

A abordagem de genômica comparativa foi empregada com o objetivo de identificar e selecionar possíveis genes-alvo (genes essenciais ou genes que codificam proteínas que atuam em vias de sinalização para controle de processos celulares relacionados à viabilidade celular) presentes no transcriptoma/genoma do *P. lutzii* (Pb01) e em genomas outros fungos patogênicos humanos de relevância mundial (*A. fumigatus*, *B. dermatitidis* ER3, *C. albicans* WO1, *C. immitis* H538.4, *C. neoformans* sototipo B, *H. capsulatum* NAm1, *P. brasiliensis* (Pb3) e *P. brasiliensis* (Pb18) e ausentes no genoma humano.

Um total de 57 genes, contendo os 55 essenciais mencionados acima e mais dois genes não essenciais (*kre2* e *erg6*) descritos como potenciais alvos para drogas (Felipe *et al.*, 2005), foram selecionados para a busca por ortólogos em *P. lutzii* (Pb01). Os alinhamentos contra o banco de dados do transcriptoma de *P. lutzii* (Pb01) (Blastn) mostraram que a maioria destes genes apresenta-se conservada no transcriptoma desse fungo. Alinhamentos similares foram realizados contra os genomas de *P. lutzii* (P01) e dos isolados de *P. brasiliensis* (Pb3 e Pb18), recentemente disponibilizados no banco de dados do *Broad Institute*, para confirmar a presença ou ausência destes genes no genoma desses fungos. Todos os genes presentes no transcriptoma de *P. lutzii* (Pb01) também estão presentes no genoma desse fungo e dos dois isolados de *P. brasiliensis* (**Tabela 2**).

Os genes presentes em *P. lutzii* (isolado Pb01) e *P. brasiliensis* (Pb03 e Pb18) foram buscados nos bancos de dados de outros fungos patogênicos importantes como *A. fumigatus*, *B. dermatitidis* ER3, *C. albicans* WO1, *C. immitis* H538.4 e *H. capsulatum* NAm1, e no genoma humano. Os genes ortólogos foram identificados por meio da estratégia de genômica comparativa, estando todos presentes no genoma destes fungos patogênicos e ausentes no humano (**Tabela 2**). A ausência dos ortólogos no genoma humano é um ponto importante na escolha de novos alvos para drogas, pois em princípio poderá minimizar os efeitos colaterais da futura droga desenvolvida. Dos 57 genes analisados, 4 genes são

auxotróficos e portanto foram excluídos das análises seguintes. Embora esses genes estejam presentes nos 7 fungos patogênicos e ausentes no humano, não são bons candidatos como genes-alvo, uma vez que o hospedeiro pode fornecer o substrato necessário para a sobrevivência do fungo.

Esta estratégia de seleção já foi realizada por outros grupos, que utilizaram outros organismos com o mesmo objetivo de identificar potenciais alvos para drogas, por meio de genômica comparativa. Os genes de *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *E. coli* 0157:H7 foram avaliados a partir de métodos de genômica comparativa para verificar a possibilidade de caracterizá-los como alvo antibacteriano de acordo com alguns critérios, incluindo sua essencialidade, sua conservação nas três espécies e sua presença em humanos, chegando a um número final de 10 genes-alvos candidatos para o desenvolvimento de novas drogas (White & Kell, 2004). A partir da publicação do genoma completo de *B. malayi* em 2007, Kumar e cols. realizaram uma comparação entre os genomas de *B. malayi* e *Caenorhabditis elegans* e identificaram 589 genes essenciais e ausentes no genoma humano e, dessa forma, representando potenciais candidatos para o desenvolvimento de novas drogas. Caffrey e cols. (2009) identificaram novos alvos para drogas no patógeno metazoário *Schistosoma mansoni*, um dos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças crônicas em regiões tropicais, por análise do proteoma de *S. mansoni* em comparação com os proteomas de dois organismos modelo, o nematóide *Caenorhabditis elegans* e o inseto *Drosophila melanogaster*. Foram capazes de identificar 35 genes essenciais ortólogos para validação experimental, como potenciais alvos para drogas contra este patógeno humano.

No total 7 critérios foram considerados para selecionar os potenciais candidatos a alvo para drogas. Em um primeiro momento de análise, pode-se citar:

- ✓ Ser um gene essencial ou de relevância para a sobrevivência do fungo;
- ✓ Estar presente em todos ou na maioria dos fungos patogênicos humanos, permitindo amplo espectro de ação da droga;
- ✓ Estar ausente no genoma humano, potencialmente sem efeitos colaterais;
- ✓ Não ser auxotrófico.

Tabela 2. Genes essenciais de *C. albicans* e/ou *A. fumigatus* e seus ortólogos nos demais fungos patogênicos humanos

Gene	Função	Número de acesso GeneBank ^a	Número de acesso Broad Institute ^b										<i>H. sapiens</i> ^c
			<i>P. lutzii</i> Pb01	<i>P. brasiliensis</i> Pb3	<i>P. brasiliensis</i> Pb18	<i>A. fumigatus</i>	<i>B. dermatitidis</i> ER3	<i>C. albicans</i> WO1	<i>C. immitis</i> H538.4	<i>C. neoformans</i> sototipo B	<i>H. capsulatum</i> NAM1		
<i>his3</i> **	Imidazol-glicerol-fosfato (IGP) desidratase	XP_747608	PAAG_03527.1	PABG_06862.1	PADG_06301.1	Afu6g04700	BDBG_06845.1	CAWG_04238.1	CIHG_07881.1	CNBG_4362.2	HCAG_03326.1	-	
<i>lys4</i> **	Homoaconitase	XP_753748	PAAG_03612.1	PABG_06939.1	PADG_06215.1	Afu5g08890	BDCG_09181.1	CAWG_03369.1	CIHG_06939.1	CNBG_3213.2	HCAG_06854.1	-	
<i>lys9</i>	Saccharopine dehydrogenase	XP_751695	PAAG_02693.1	PABG_03171.1	PADG_01718.1	Afu4g11340	BDCG_08948.1	CAWG_02969.1	CIHG_05913.1	CNBG_2136.2	HCAG_01575.1	NP_005754.2	
<i>met16</i> **	3'-Phospho-adenylsulfate reductase	XP_754952	PAAG_05932.1	PABG_05726.1	PADG_06061.1	Afu3g06540	BDCG_05909.1	CAWG_03125.1	CIHG_02291.1	CNBG_5568.2	HCAG_01216.1	-	
<i>met2</i> **	Homoserine O-acetyl-transferase	XP_753913	PAAG_04925.1	PABG_00257.1	PADG_02663.1	Afu5g07210	BDCG_01949.1	CAWG_01563.1	CIHG_02502.1	CNBG_4568.2	HCAG_01437.1	-	
<i>trp5</i>	Tryptophan synthase	XP_755657	PAAG_06289.1	PABG_05302.1	PADG_06955.1	Afu2g13250	BDCG_07611.1	CAWG_03214.1	CIHG_03768.1	CNBG_1280.2	HCAG_05953.1	-	
<i>trr1</i>	Thioredoxin reductase	XP_751532	PAAG_07020.1	PABG_03023.1	PADG_01551.1	Afu4g12990	BDCG_03337.1	CAWG_04654.1	CIHG_07325.1	CNBG_1694.2	HCAG_07019.1	-	
<i>fks1</i>	β-1,3-glucan synthase	XP_751118	PAAG_05071.1	PABG_04524.1	PADG_04920.1	Afu6g12400	BDCG_08332.1	CAWG_01443.1	CIHG_05825.1	CNBG_4964.2	HCAG_05289.1	-	
<i>gfa1</i>	Glutamine-fructose-6-phosphate amino-transferase	XP_750525	PAAG_00850.1	PABG_01388.1	PADG_03984.1	Afu6g06340	BDCG_03850.1	-	CIHG_06381.1	CNBG_0733.2	HCAG_04088.1	NP_005101.1	
<i>aur1</i>	Phosphatidyl-inositol:ceramide phosphoinositol transferase	XP_754623	PAAG_07905.1	PABG_07490.1	PADG_08169.1	Afu3g09960	BDCG_03056.1	CAWG_04512.1	CIHG_07595.1	CNBG_2609.2	HCAG_05472.1	-	
<i>cds1</i>	Phosphatidate cytidyltransferase	XP_750449	PAAG_08300.1	PABG_03499.1	PADG_02068.1	Afu1g07010	BDCG_05771.1	-	CIHG_04337.1	CNBG_0552.2	HCAG_01365.1	NP_001254.2	
<i>hem15</i>	Ferrochelataze	XP_753861	PAAG_08770.1	PABG_00292.1	PADG_02701.1	-	BDCG_09294.1	-	-	CNBG_1735.2	HCAG_02951.1	NP_001012533.1	
<i>ipp1</i>	Inorganic pyrophosphatase	XP_754776	PAAG_00657.1	PABG_01564.1	PADG_04175.1	Afu3g08380	BDCG_03640.1	CAWG_05964.1	CIHG_07859.1	-	HCAG_04307.1	NP_789845.1	
<i>ole1</i>	Stearoyl-CoA desaturase	XP_748918	PAAG_03722.1	PABG_00775.1	PADG_03225.1	Afu7g05920	BDCG_06371.1	-	CIHG_01912.1	CNBG_0970.2	-	NP_005054.3	
<i>spe2</i>	S-Adenosyl-methionine decarboxylase	XP_747977	PAAG_04279.1	PABG_04058.1	PADG_07511.1	Afu5g03670	BDCG_04367.1	-	CIHG_00988.1	CNBG_0531.2	HCAG_00555.1	NP_001625.2	

<i>tub1</i>	Tubulin α -1 chain	XP_750005	PAAG_01647.1	PABG_07341.1	PADG_08413.1	Afu1g02550	BDCG_08660.1	CAWG_02186.1	CIHG_09917.1	CNBG_0187.2	HCAG_02068.1	NP_061816.1
<i>pri1</i>	DNA primase small subunit	XP_754716	PAAG_03308.1	PABG_07005.1	PADG_06516.1	-	BDCG_06374.1	-	-	CNBG_4092.2	HCAG_07145.1	NP_000937.1
<i>erg10</i>	Acetyl-CoA acetyl-transferase	XP_747207	PAAG_07786.1	PABG_07114.1	PADG_02751.1	Afu8g04000	BDCG_03997.1	-	CIHG_09813.1	CNBG_3562.2	HCAG_00814.1	NP_000010.1
<i>erg12</i>	Mevalonate kinase	XP_752047	PAAG_00718.1	PABG_01505.1	PADG_04112.1	-	BDCG_03705.1	-	CIHG_10272.1	CNBG_3104.2	HCAG_04240.1	NP_000422.1
<i>alg7</i>	UDP-N-acetyl-glucosamine-1-P transferase	XP_755457	PAAG_03295.1	PABG_00723.1	PADG_03166.1	-	BDCG_06434.1	-	CIHG_01965.1	CNBG_3752.2	HCAG_07103.1	NP_001373.2
<i>gcd6</i>	Translation initiation factor eIF2B	XP_751131	PAAG_06489.1	PABG_02877.1	PADG_01389.1	Afu4g03860	BDCG_07129.1	-	CIHG_09183.1	CNBG_4157.2	HCAG_08704.1	NP_001032897.1
<i>gus1</i>	Glutamyl-tRNA synthetase	XP_747988	PAAG_02071.1	PABG_02322.1	PADG_00821.1	-	BDCG_00882.1	-	CIHG_02993.1	CNBG_1586.2	HCAG_01919.1	NP_004437.2
<i>pab1</i>	Polyadenylate-binding protein	XP_750167	PAAG_00244.1	PABG_06432.1	PADG_07884.1	Afu1g04190	BDCG_07503.1	CAWG_01047.1	CIHG_03676.1	CNBG_2621.2	HCAG_06026.1	NP_003810.1
<i>tif35</i>	Translation initiation factor eIF3	XP_755320	PAAG_01330.1	PABG_02041.1	PADG_00438.1	Afu2g09870	BDCG_07180.1	-	-	CNBG_3131.2	HCAG_08183.1	NP_003746.2
<i>sec31</i>	Protein transport SEC31	XP_755629	PAAG_06249.1	PABG_05265.1	PADG_06998.1	Afu2g12980	BDCG_02713.1	-	CIHG_03821.1	CNBG_5639.2	HCAG_03764.1	NP_001070676.1
<i>sly1</i>	Protein involved in vesicle trafficking	XP_754194	PAAG_03416.1	PABG_07093.1	PADG_06420.1	Afu3g14320	BDCG_06621.1	-	CIHG_04951.1	CNBG_1617.2	HCAG_08899.1	NP_057190.2
<i>tom40</i>	Mitochondrial import receptor subunit	XP_747566	PAAG_03644.1	PABG_06969.1	PADG_06186.1	Afu6g05110	BDCG_09156.1	CAWG_05548.1	CIHG_06917.1	CNBG_5536.2	HCAG_06882.1	-
<i>brx1</i>	Ribosome biogenesis protein	XP_749971	PAAG_08110.1	PABG_07344.1	PADG_08416.1	Afu1g02210	BDCG_05641.1	-	CIHG_02732.1	CNBG_4089.2	HCAG_02072.1	NP_060791
<i>esf1</i>	Pre-rRNA processing protein	XP_749672	PAAG_02272.1	PABG_04780.1	PADG_05410.1	Afu2g05420	BDCG_00050.1	-	-	CNBG_0416.2	HCAG_00965.1	-
<i>krr1</i>	Ribosome biogenesis protein	XP_755471	PAAG_08621.1	PABG_02924.1	PADG_01439.1	-	BDCG_00524.1	-	-	-	-	-
<i>mak5</i>	ATP-dependent RNA-helicase	XP_750779	PAAG_08150.1	PABG_07379.1	PADG_08450.1	Afu6g08900	BDCG_03519.1	CAWG_04261.1	CIHG_01560.1	CNBG_2510.2	HCAG_05732.1	-
<i>nob1</i>	RNA binding protein	XP_747944	PAAG_04204.1	PABG_04010.1	PADG_07459.1	Afu5g04000	BDCG_04304.1	CAWG_02682.1	CIHG_01056.1	CNBG_1461.2	HCAG_00604.1	NP_054781.1
<i>noc3</i>	Nuclear export protein	XP_756039	PAAG_06547.1	PABG_02575.1	PADG_01007.1	Afu2g17050	BDCG_01185.1	CAWG_05715.1	CIHG_03367.1	CNBG_2753.2	HCAG_06554.1	NP_071896.8

<i>nop4</i>	Ribosome biogenesis	XP_752199	PAAG_04390.1	PABG_04193.1	PADG_04558.1	Afu4g06250	BDCG_00353.1	-	-	CNBG_4991.2	HCAG_08951.1	-
<i>luc7</i>	U1 snRNA-associated protein	XP_750789	PAAG_08137.1	PABG_07837.1	PADG_08704.1	Afu6g09010	BDBG_02050.1	-	CIHG_01574.1	CNBG_2598.2	HCAG_05743.1	NP_057103.2
<i>arg5,6</i>	Acetylglutamate kinase and N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	XP_723474	PAAG_04528.1	PABG_04306.1	PADG_04689.1	Afu6g02910	BDCG_06783.1	CAWG_00500.1	CIHG_06323.1	CNBG_1790.2	HCAG_05073.1	NP_694551.1
<i>cct8</i>	Subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex	XP_719058	PAAG_08287.1	PABG_03488.1	PADG_02057.1	Afu4g09740	BDCG_05759.1	CAWG_01354.1	CIHG_04332.1	CNBG_3398.2	HCAG_01355.1	NP_006576.2
<i>cdc28</i>	cyclin-dependent protein kinase	XP_713525	PAAG_06500.1	PABG_01763.1	PADG_03637.1	Afu2g09710	BDCG_07142.1	CAWG_01920.1	CIHG_09167.1	CNBG_1491.2	HCAG_08672.1	NP_277071.2
<i>chs1</i>	Chitin synthase I	XP_717009	PAAG_03342.1	PABG_07036.1	PADG_08636.1	Afu4g04180	BDCG_06553.1	CAWG_02178.1	CIHG_04913.1	CNBG_2274.2	HCAG_08842.1	-
<i>dpb2</i>	DNA Polymerase II subunit	XP_719326	PAAG_00984.1	PABG_01267.1	PADG_03843.1	Afu2g06190	BDCG_02855.1	CAWG_02254.1	CIHG_04786.1	CNBG_1931.2	HCAG_03626.1	NP_002683.2
<i>gna1</i>	Glucosamine-6-phosphate acetyltransferase	XP_721083	PAAG_00589.1	PABG_05340.1	PADG_08120.1	Afu6g02460	BDCG_02048.1	CAWG_04145.1	CIHG_08683.1	CNBG_1874.2	HCAG_03171.1	NP_932332.1
<i>gsp1</i>	GTP binding nuclear protein	XP_711509	PAAG_04651.1	PABG_04417.1	PADG_04810.1	Afu6g13300	BDCG_06652.1	CAWG_04375.1	CIHG_08580.1	CNBG_3970.2	HCAG_05187.1	NP_006316.1
<i>hem3</i>	Phorphobilinogen deaminase	XP_714388	PAAG_02418.1	PABG_04914.1	PADG_05564.1	-	BDCG_08122.1	CAWG_06107.1	-	CNBG_3262.2	HCAG_02662.1	-
<i>his1</i>	ATP phosphoribosyltransferase	XP_722095	PAAG_09095.1	PABG_07828.1	PADG_08604.1	Afu7g04500	BDCG_07027.1	CAWG_04898.1	-	CNBG_0601.2	HCAG_06360.1	-
<i>nmt1</i>	N-myristoyl transferase	XP_722859	PAAG_03163.1	PABG_00610.1	PADG_03042.1	Afu4g08070	BDCG_03156.1	CAWG_03640.1	CIHG_04517.1	CNBG_5165.2	HCAG_06259.1	NP_004799.1
<i>prs1</i>	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	XP_716867	PAAG_02633.1	PABG_03118.1	PADG_01653.1	Afu4g10790	BDCG_08199.1	CAWG_04019.1	CIHG_06691.1	CNBG_2266.2	HCAG_01667.1	NP_002756.1
<i>psa1</i>	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	XP_710946	PAAG_02718.1	PABG_03197.1	PADG_01745.1	Afu4g11510	BDCG_08925.1	CAWG_00133.1	CIHG_05938.1	CNBG_3338.2	HCAG_01552.1	NP_068806.1
<i>sec14</i>	Phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein	XP_716840	PAAG_07900.1	PABG_07484.1	PADG_08176.1	Afu3g09910	BDCG_03063.1	CAWG_04442.1	CIHG_05317.1	CNBG_2431.2	HCAG_05465.1	NP_055507.1
<i>sec4</i>	Rab GTP-binding protein	XP_718333	PAAG_06344.1	PABG_02751.1	PADG_01243.1	Afu2g11150	BDCG_08802.1	CAWG_01525.1	CIHG_01710.1	CNBG_2038.2	HCAG_07830.1	NP_001484.1
<i>ypt1</i>	GTP-binding protein	XP_721550	PAAG_08028.1	PABG_07851.1	PADG_08342.1	-	BDCG_07079.1	CAWG_01035.1	CIHG_00694.1	CNBG_4617.2	HCAG_06941.1	NP_004152.1
<i>mig1</i>	Transcription factor involved in glucose repression	XP_720752	PAAG_03732.1	PABG_00781.1	PADG_03236.1	Afu2g11780	BDCG_06357.1	CAWG_06116.1	-	CNBG_4460.2	-	-

<i>mnn9</i>	Subunit of Golgi mannosyltransferase complex	XP_716624	PAAG_03802.1	PABG_00846.1	PADG_03306.1	Afu2g01450	BDCG_02384.1	CAWG_02911.1	CIHG_06169.1	-	HCAG_03327.1	-
<i>rim8</i>	pH-response regulator protein	XP_719051	PAAG_06441.1	PABG_02836.1	PADG_01339.1	Afu4g09650	BDCG_08831.1	CAWG_01350.1	CIHG_01666.1	-	HCAG_07860.1	-
<i>ess1</i>	Peptidylprolyl-cis/trans-isomerase	XP_710415	PAAG_07509.1	PABG_07239.1	PADG_05203.1	Afu2g08550	BDCG_00152.1	CAWG_00953.1	CIHG_03180.1	CNBG_3360.2	HCAG_07345.1	NP_006212.1
<i>kre6</i>	β -1,6-glucan synthase	XP_716604	PAAG_00091.1	PABG_05119.1	PADG_07170.1	Afu2g11870	BDCG_02560.1	CAWG_02891.1	CIHG_09423.1	CNBG_6049.2	HCAG_03919.1	-
<i>erg6</i> *	Delta(24)-Sterol C-Methyltransferase	EEQ44277	PAAG_01575.1	PABG_03630.1	PADG_00204.1	Afu4g09190	BDCG_09435.1	CAWG_02542.1	CIHG_10456.1	CNBG_1537.2	HCAG_07564.1	-
<i>kre2</i> *	α 1,2-mannosyltransferase	Q00310	PAAG_02288.1	PABG_04793.1	PADG_05426.1	Afu5g10760	BDCG_00038.1	CAWG_02512.1	CIMG_00718.3	CNBG_1550.2	HCAG_00953.1	-

^aAs sequências de aminoácidos podem ser recuperadas a partir do banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando os números de acesso especificados.

^bAs sequências de aminoácidos podem ser recuperadas a partir do banco de dados do *Broad Institute* (<http://www.broadinstitute.org/>), usando os números de acesso especificados.

^cA sequência protéica pode ser recuperada do NCBI Reference (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) usando os números de acesso especificados.

* Gene não essencial, mas de relevância para a sobrevivência do fungo patogênico no hospedeiro (*kre2* e *erg6*).

** Genes que codificam proteínas para auxotrofia.

Em negrito – os 10 genes selecionados como alvos para drogas.

Aplicando os critérios mencionados acima, 10 genes-alvo foram selecionados como candidatos ao desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (**Tabela 3**). Estes genes estão presentes e conservados em todas as espécies fúngicas mencionadas, com exceção de *rim8* (ausente em *C. neoformans*) e, sobretudo, todos ausentes no genoma humano. Entretanto, para dar sequência ao trabalho e realizar todos os objetivos propostos, os critérios abaixo foram considerados para priorizar 2 genes-alvo:

- ✓ Ser preferencialmente uma enzima, facilitando os ensaios de atividade biológica;
- ✓ Localização celular acessível para a atividade da droga;
- ✓ Ter preferencialmente estrutura 3D (cristal) homóloga no PDB, com proteínas de pelo menos 50% de identidade na sequência primária.

Assim, levando em consideração todos os critérios de seleção citados, foram definidos como principais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas os genes *trr1* e *kre2*:

- *trr1* codifica para a enzima tioredoxina redutase que está localizada no citoplasma (Williams *et al.*, 2000), sendo responsável pela resistência ao estresse oxidativo, além de estar envolvida na regulação da síntese de DNA, biossíntese de metionina, crescimento celular, transcrição de genes e apoptose.
- *kre2* codifica para a enzima α -1,2-manosiltransferase que está localizada no complexo de Golgi, com uma pequena porção transmembrana e o sítio ativo voltado para o lúmen (Lussier *et al.*, 1995; Wagener *et al.*, 2008), sendo responsável pela glicosilação de proteínas da parede celular do fungo.

Dessa forma, além da estratégia de genômica comparativa, uma curadoria manual dos alvos foi realizada para confirmar a escolha dos principais candidatos proteicos como alvos-moleculares em fungos patogênicos, levando em consideração os critérios citados acima. Espera-se, assim, identificar e/ou desenvolver drogas mais seletivas para estes patógenos, reduzindo os possíveis efeitos adversos encontrados na maioria dos antifúngicos comercialmente disponíveis.

Tabela 3. Potenciais genes-alvo selecionados para desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

Gene	Processo Biológico	Citocalização	Molde no PDB	Organismo	E-value	Identidade de sequência primária (%)
<i>trr1</i>	Cell redox homeostasis	Citoplasma	3ITJ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3e-115	65
<i>aur1</i>	Metabolismo celular	Golgi e membrana plasmática	1VDC*	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-94	57
<i>mak5</i>	Biogênese do ribossomo	Nucléolo	1HV8	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	7e-42	30
<i>chs1</i>	Biogênese/degradação da parede celular	Membrana plasmática	*	*	*	*
<i>tom40</i>	Transporte de protein	Membrana da mitochondria	2QK9	<i>Homo sapiens</i>	0,8	34
<i>kre6</i>	Biogênese/degradação da parede celular	Membrana do Golgi	2VY0	<i>Pyrococcus furiosus</i>	6e-4	32
<i>fks1</i>	Organização/biogênese da parede celular	Membrana plasmática	1R1M	<i>Neisseria meningitidis</i>	0,3	32
<i>kre2</i>	Manosilação de proteínas	Membrana do Golgi	1S4N	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6e-96	50
<i>erg6</i>	Biossíntese de ergosterol	Membrana do Retículo endoplasmático	3BUS	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	5e-18	32
<i>rim8</i>	Regulador de resposta ao Ph	Citoplasma	2FAU	<i>Bacteroides fragilis</i>	4,0	38

*Estrutura ausente no PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

6.2) TRR1 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

Tioredoxina redutases são flavoenzimas diméricas (enzimas que contêm como cofator enzimático um derivado nucleotídico da riboflavina - FAD) que pertencem a uma família de proteínas que inclui lipoamida desidrogenase e glutatona redutase. As flavoenzimas contêm dois centros redox: um FAD e um grupo dissulfeto/ditioi em cada subunidade. A tioredoxina redutase faz parte de um complexo conhecido por sistema tioredoxina, que contêm a tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (Trr) e NADPH, atuando como um sistema de dissulfeto redutase (revisado por Williams *et al.*, 2000). Nesse sistema, a tioredoxina redutase reduz o dissulfeto do sítio ativo da tioredoxina a ditioi usando o NADPH como doador de elétrons (**Figura 5**) (Arner & Holmgren, 2000). Tioredoxina no seu estado ditioi desempenha um papel importante na manutenção do estado redox da célula (Holmgren, 1989; Williams *et al.*, 2000). Funções importantes da tioredoxina reduzida incluem proteção da célula contra o estresse oxidativo; regulação da síntese de DNA, biossíntese de metionina, crescimento celular, transcrição de genes e apoptose (Arner & Holmgren 2000; Williams *et al.*, 2000).

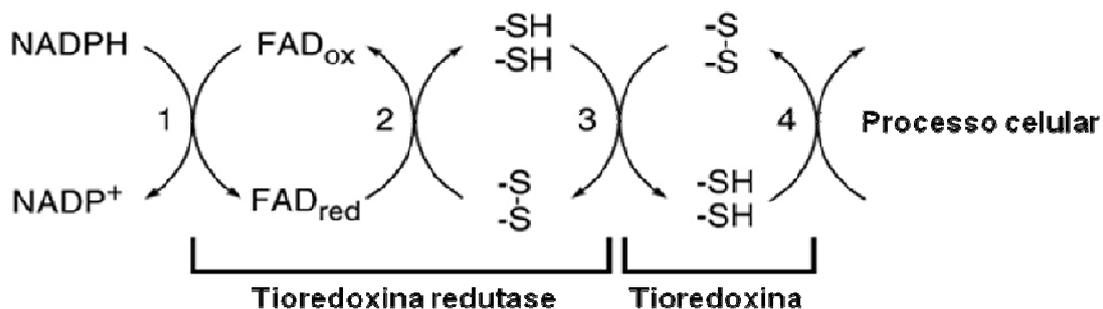


Figura 5. Mecanismo catalítico da tioredoxina redutase (Lennon *et al.*, 2000, com modificações)

Esta flavoproteína, a tioredoxina e o NADPH, que fazem parte do sistema tioredoxina, estão presentes em organismos desde procariotos a mamíferos. Duas classes de tioredoxina redutase foram caracterizadas. Ambas são proteínas diméricas que catalisam a transferência de elétrons a partir do FAD e do grupo dissulfeto (Oliveira *et al.*, 2005). A isoforma de baixa massa molecular (~35 kDa), está presente em procariotos, plantas, alguns parasitas e fungos (Williams, 1995; Missall *et al.*, 2005; Thon *et al.*, 2007). Outra isoforma, de alta massa molecular (~55 kDa), é

encontrada em eucariotos superiores incluindo humanos e parasitas, e apresentam um terceiro grupo redoxi, a selenocisteína (Gromer *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000). As tioredoxinas redutase têm algumas funções similares, mas são mecanicamente distintas (Williams *et al.*, 2000). Além disso, as isoformas apresentam estruturas protéicas distintas, principalmente no sítio catalítico (Lennon *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000).

Estudos de cristalografia têm revelado que a localização dos domínios de ligação ao NADPH e ao FAD difere significativamente nas duas isoformas enzimáticas. Em eucariotos superiores, a distância entre esses domínios e sua orientação permite a transferência de elétrons a partir do NADPH para o dissulfeto da tioredoxina sem a necessidade de uma grande alteração na conformação da tioredoxina redutase (Sandalova *et al.*, 2001). Já 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 *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2010). A tioredoxina redutase adota uma conformação denominada FO (flavina oxidada), em que a transferência de elétrons é dificultada (Oliveira *et al.*, 2010). Além disso, os centros redoxi dissulfeto-ditiol estão enterrados dentro da cadeia polipeptídica, criando uma barreira estérica para a redução da tioredoxina. Em *Escherichia 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).

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 similaridade, 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 6**) 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. As interações com o FAD são muito similares às encontradas em tioredoxinas redutases de outros organismos como *E. coli* e *Arabidopsis thaliana* (Walksman *et al.*, 1994; Dai *et al.*, 1996). 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.

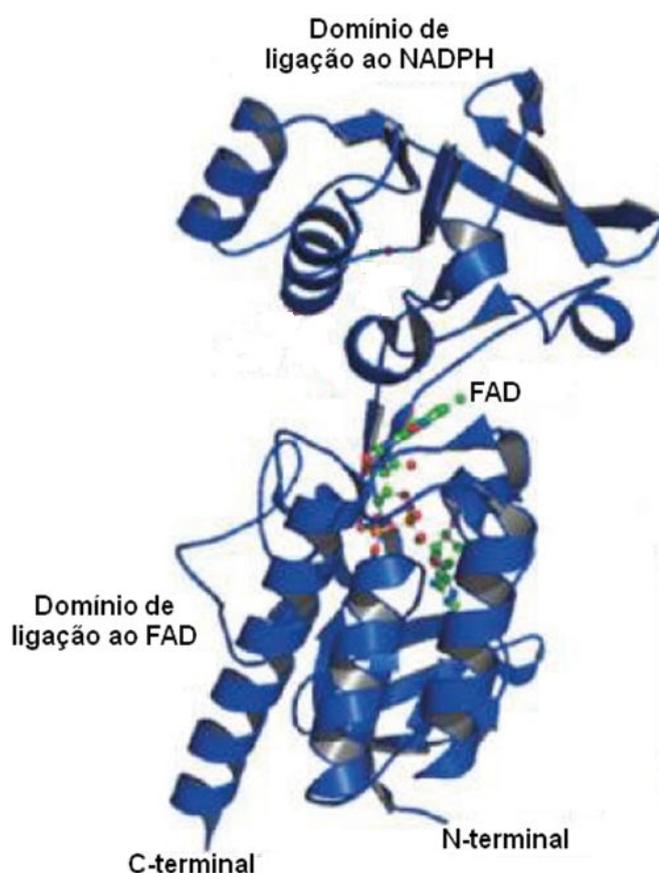


Figura 6. Estrutura global do monômero TRR1 de *S. cerevisiae* (Oliveira *et al.*, 2010, com modificações)

6.3) KRE2 como alvo molecular para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas

As proteínas associadas à parede celular são geralmente glicosiladas e defeitos na glicosilação destas proteínas podem resultar num dobramento errado da proteína, instabilidade e/ou uma redução na atividade enzimática (Wagener *et al.*, 2008). Há dois tipos de glicosilação: a N-glicosilação, que ocorre no nitrogênio da amida de cadeias laterais de asparagina e a O-glicosilação, que ocorre no grupamento hidroxila de serina e treonina (Buurman *et al.*, 1998). A adição de resíduos de manose em proteínas de *S. cerevisiae* e *C. albicans* ocorre por N e O-glicosilação, sendo esta iniciada no retículo endoplasmático pela ação de proteínas da família Pmt (Munro *et al.*, 2005). A adição de outros resíduos de manose ocorre no Complexo de Golgi e envolve uma classe de enzimas denominadas mannosyltransferases da família Kre2/Mnt1. Em *S. cerevisiae* são conhecidas nove proteínas da via (Kre2/Mnt1, Ktr1, Ktr2, Ktr3, Ktr4, Ktr5, Ktr6, Ktr7, e Yur1) (Lussier *et al.*, 1999), cinco em *C. albicans* (Mnt1, Mnt2, Mnt3, Ktr2, e Ktr4) (Thomson *et al.*, 2000) e apenas três em *A. fumigatus* (Mnt1, AFUA_5G12160) relacionadas à Ktr5 e Ktr7 de *S. cerevisiae*, e AFUA_5G02740 que compartilham maior homologia com Ktr4 de *C. albicans* e de *S. cerevisiae* (Wagener *et al.*, 2008).

Em *S. cerevisiae*, Kre2, Ktr1 e Ktr3 são responsáveis pela adição do segundo e do terceiro resíduos de manose, por ligação α -1,2 às proteínas da parede celular que são manossiladas, entretanto somente mutantes *kre2* apresentam problemas significativos na manossilagem de proteínas (Häusler *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 1997; Buurman *et al.*, 1998). Em *C. albicans*, Mnt1 é responsável pela adição do segundo resíduo de manose, por ligação α -1,2, sendo que mutantes *mnt1* afetam a adesão do patógeno ao hospedeiro, reduzindo sua virulência (Buurman *et al.*, 1998). Em *A. fumigatus*, mutantes *mnt1* apresentam alteração na espessura da parede celular das hifas e no crescimento, além de redução na esporulação decorrente do rompimento da parede celular (Wagener *et al.*, 2008).

Todas as proteínas α -1,2 manossiltransferases pertencentes à família Kre2/Mnt1 apresentam uma característica topológica comum às glicosiltransferases. Consistem de um pequeno domínio citoplasmático amino-terminal, um domínio hidrofóbico de ligação à membrana e um grande domínio carboxiterminal catalítico voltado para o lúmen do Complexo de Golgi (**Figura 7**) (Lussier *et al.*, 1995; Lussier *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 2000).

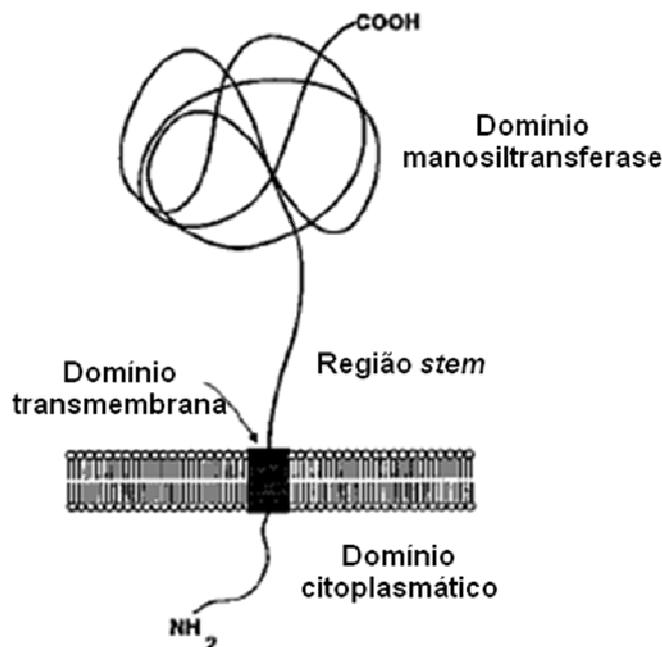


Figura 7. Representação topológica da proteína Kre2. As proteínas glicosiltransferases pertencentes à família Kre2/Mnt1 apresentam uma característica topológica que consiste de um domínio citoplasmático N-terminal, um domínio transmembrana hidrofóbico, um grande domínio catalítico C-terminal voltado para o lúmen do Golgi. O domínio catalítico é ligado ao domínio transmembrana pela região *stem* (Lussier *et al.*, 1996).

O domínio catalítico conservado da proteína Kre2 de *C. albicans* estende-se do resíduo de Lys-110 até o resíduo Cys-383 conservada, podendo ser dividido em dois subdomínios: uma região que vai do resíduo Lys-110 a resíduo Leu-276, separada por uma inserção variável, e outra que se estende da Tyr308 à Cys383. Todas as proteínas da família Kre2 apresentam os seguintes resíduos conservados: His312, His377, Asp350 e Glu318, cuja atividade foi quase abolida em mutantes de *C. albicans* (Thomson *et al.*, 2000). Esses resíduos atuam então no mecanismo catalítico da enzima.

A superfície celular é o ponto de contato imediato entre o fungo e o hospedeiro e desempenha um papel fundamental na adesão e imunomodulação nas respostas do hospedeiro. A camada externa da parede celular é rica em manoproteínas, que são incorporados em uma matriz de polissacarídeos estruturais constituídos de glucana e quitina, sendo importante na adesão à superfície do hospedeiro e sua posterior colonização. Dessa forma, a glicosilação das proteínas da parede celular é fundamental para a interação fungo-hospedeiro e sua patogenicidade (Munro *et al.*, 2005).

6.4) Alinhamento das sequências proteicas codificadas pelos genes-alvo selecionados por genômica comparativa

As sequências proteicas codificadas pelos dois principais genes-alvo selecionados *trr1* e *kre2* foram recuperadas do banco de dados do *Broad Institute* (<http://www.broadinstitute.org/science/data#>), e analisadas, pelo programa ClustalW, quanto ao grau de conservação por similaridade e identidade de resíduos de aminoácidos. Em seguida foi realizada uma busca na literatura sobre os alvos selecionados e os principais resíduos e domínios proteicos importantes para a atividade catalítica das respectivas enzimas.

No domínio de ligação ao NADPH, de um lado do sulco, tem quatro resíduos altamente conservados Ala-Val-Pro-Ile que formam uma região hidrofóbica e, do outro lado do sulco, tem dois resíduos Lys221 e Lys137, que faz com que TRR1 apresente mais carga positiva neste lado do sulco (Zhang *et al.*, 2009). Esses resíduos conservados podem estar envolvidos na interação entre a tioredoxina redutase e o substrato. Os resíduos de cisteína (Cys142 e Cys145), no domínio de ligação ao NADPH, de *S. cerevisiae* também estão presentes no sítio ativo da proteína tioredoxina redutase e são importantes para sua atividade (Oliveira *et al.*, 2010). A análise da estrutura de TRR1 de *S. cerevisiae* mostrou que no domínio de ligação ao FAD, o *loop* 1 é constituído dos resíduos Glu33-Gly43 e o *loop* 2 compreende os resíduos Thr101-Val110. A interação entre os dois domínios é auxiliada pelos anéis isoaloxazina de FAD e os resíduos de cisteína conservados. A **Figura 8** 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, bem como as duas cisteínas (Cys145 e Cys148) em todos os fungos analisados.

```

Trr1Pb3      -----MANGTAAGGQLTTTTDIENFPGFPNGIGGSELMDNMRAQSVRFGTETII 48
Trr1Pb18    RAELKPVLYEGMMANGTAAGGQLTTTTDIENFPGFPNGIGGSELMDNMRAQSVRFGTETII 87
Trr1Pb01    RAELKPVLYEGMMANGTAAGGQLTTTTDVENFPGFPHGIGGSELMDNMRAQSVRFGTETII 83
Trr1Hc      -----MANNTAPGGQLTTTTDVENFPGFPNGISGSELMDSMRAQSIRFGTDII 48
Trr1Bd      RAELKPVLYEGMMANNTAPGGQLTTTTDVENFPGFPNGINGSELMDGMRAQSVRFGTETII 120
Trr1Ci      RAELKPVLYEGMLANGTAAGGQLTTTTDVENFPGFPAGVGTELMTKMREQSIRFGTETII 83
Trr1Af      RAELKPVLYEGMLANGTAAGGQLTTTTDIENFPGFPDGIGGAELMENMRKQSIRFGTEVI 102
Trr1Ca      RAEIKP TLYEGMLANGTAAGGQLTTTTDIENFPGFPNGIGGSELMEKMKEQSQRFGTETII 83
Trr1Cn      RANLEPVLVEGMLANGFAPGGQLTTTTDVENFPGFPEGVTGTEMMDKFRAQSERFGTKII 109
              :*: * .*****:***** *: *:*:* : : * * * * .*:

Trr1Pb3      SETVSRVDLSCRFFKLWKEFSDGPDPAHTADALIIATGANARRLDLPGEQYQWQNGIS 108
Trr1Pb18    SETVSRVDLSCRFFKLWKEFSDGPDPAHTADALIIATGANARRLDLPGEQYQWQNGIS 147
Trr1Pb01    SETVSRVDLSCRFFKLWKEFSDGPDPAHTADALIVATGANARRLDLPGEQYQWQNGIS 143
Trr1Hc      TETVSRIDLSSRFFKLWKEYADGPNDDPAHTTDAIIATGANARRLDLPGEERYWQNGIS 108
Trr1Bd      TETVSRVDLSSRFFKVWKEYSDGPNDDAAHTADALIIATGANARRLDLPGEQYQWQNGIS 180
Trr1Ci      TETISRVDLSSRFFKLWKEWSDGPDPAHTADALIIATGANARRLDLPGEDKYWQNGIS 143
Trr1Af      TETISRVDLSSKFFKLWTEWNGDPDKEACTADAVIIATGANARRLNLPGEETYWQNGIS 162
Trr1Ca      TETISKVDFSKRFFKLWTEWNN---EDAEPIITDAVIIATGASAKRMHLPGEDTYWQQGIS 140
Trr1Cn      TETVARVDL SVRFFKYWTEGEE--EEHEFMTADTIIMATGASAKRFLPGEDTYWQSGIS 167
              :*:::*:* :*** *.* :. *:*:*:*****:*:* :***: * * * .***

Trr1Pb3      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYGSKVTVLVRDKLRASKTMAKRL 168
Trr1Pb18    ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYGSKVTVLVRDKLRASKTMAKRL 207
Trr1Pb01    ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYGSKVTVLVRDKLRASKTMAKRL 203
Trr1Hc      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYGSKVTVLVRDKLRASKTMAKRL 168
Trr1Bd      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYGSKVTVLVRDKLRASKTMAKRL 240
Trr1Ci      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYSSVTVLVRDKLRASKTMAKRL 203
Trr1Af      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLAKYGSVTVLVRDKLRASKAMAKRL 222
Trr1Ca      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYASKVTVLVRDKLRASKTMAKRL 200
Trr1Cn      ACAVCDGAVPIFRNKPLFVIIGGDSAAEEAMFLTKYGSVTVLVRDKLRASKTMAKRL 227
              *****:;* *****.* * :*:*.* * :*:*.* * * * . * .*:

Trr1Pb3      ANPKVEVKFNTVAVEVQGEPAAPRGLMTHLKIKNVVSGGEEVVPANGLFYAVGHD PATALV 228
Trr1Pb18    ANPKVEVKFNTVAVEVQGEPAAPRGLMTHLKIKNVVSGGEEVVPANGLFYAVGHD PATALV 267
Trr1Pb01    VNPKVEVKFNTVAVEVQGEPAAPRGLVTHLKIKNVVSGVEEVVPANGLFYAVGHD PATALV 263
Trr1Hc      ANPKVEVKFNTVALVLEVLGDPAPRGLMTHLKIKDVSAGAEVVPANGLFYAVGHD PATALV 228
Trr1Bd      ANPKVEVKFNTVALVLEVLGEPERGLMTHLKIKNVVSGNEEVVPANGLFYAVGHD PATALV 300
Trr1Ci      NHPKVEVKFNTVAVEVQGEPAAPRGLMTHLKIKNVVSGNEEVVPANGLFYAVGHEPATGLI 263
Trr1Af      AHPKVTVRFNTVATEVLEGLKPKNGLMTHLRIKNTVTGEBEIVDANGLFYAVGHD PATALV 282
Trr1Ca      NNEKIEVLWNTVALVLEVLGEPERGLMTHLKIKNVVSGNEEVVPANGLFYAVGHD PATALV 257
Trr1Cn      SHPKVTVRLWNTVATEAKGDGE--VL TSLTIKDTKTGKIRDLFPVNGLFYAIGHEPATALV 284
              : * : * * * * * . * : : . * * : : . : .*****:* * * * .:

Trr1Pb3      KGQIETDAEGYIVTKPGTSYTSVPGVFAAGDVQDRRYRQAITSAGSGCIAALEAEKYIAE 288
Trr1Pb18    KGQIETDAEGYIVTKPGTSYTSVPGVFAAGDVQDRRYRQAITSAGSGCIAALEAEKYIAE 327
Trr1Pb01    KGQVETDAEGYIVTKPGTSYTSVPGVFAAGDVQDRRYRQAITSAGSGCIAALEAEKYIAE 323
Trr1Hc      KGQIETDSEGYIVTKPGTSYTSVPGVFAAGDVQDKRYRQAITSAGSGCIAALEAEKFLAE 288
Trr1Bd      KGQVETDAEGYILTKPGTSYTSVPGVFAAGDVQDKRYRQAITSADVHWTHIISFVIGI-- 358
Trr1Ci      KGQVETDSDGYIATKPGTSYTSVEGVFAAGDVQDKRYRQAITSAGSGCIAALEAEKYIAE 323
Trr1Af      KGQIDLDEDDGYIITKPGTSYTSREGVFACGDVQDKRYRQAITSAGSGCIAALEAEKFLAE 342
Trr1Ca      ADQLKTDEAGYIQTTPGTASTIEGVFAAGDVQDKIYRQAITSAGSGCMAALECEKFLAE 317
Trr1Cn      KSQLELDEDDGYIKTIPGTSQTSVHGVFAAGDVQDKRYRQAITSAGSGCIAALEAEKFLAE 344
              .*:. * * * * * * * : * * * * .*****: *****. :. :

```

Figura 8. 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.

O gene *kre2*, que codifica para a enzima α -1,2-manosiltransferase, também foi incluído na lista de possíveis alvos. Este gene não é essencial, mas é encontrado no transcriptoma de *P. brasiliensis* e considerado potencial alvo para droga (Felipe *et al.*, 2005). Em *C. albicans* mutantes que não sintetizam α -1,2-manosiltransferase têm sua adesão ao hospedeiro reduzida (Buurman *et al.*, 1998). Assim, embora a ausência da atividade desta proteína não gere uma característica de letalidade, a função da mesma é crítica para a viabilidade celular. Manoproteínas da parede celular são importantes para a adesão de *C. albicans* a inúmeras superfícies. Perda da proteína Kre2/Mnt1 em *C. albicans* levou a uma acentuada redução na adesão, afetando a sua virulência (Munro *et al.*, 2005). Assim, uma inibição da atividade enzimática da proteína Kre2/Mnt1 é uma opção terapêutica, especialmente pelo fato de que os seres humanos não possuem ortólogos de α -1,2-manosiltransferase.

A **Figura 9** mostra o alinhamento de resíduos de aminoácidos dos domínios catalíticos conservados da proteína Kre2 dos fungos patogênicos analisados. Todas as sequências apresentam o domínio YNLCHFWSNFEI bem como os resíduos de aminoácidos Tyr, His, Glu, e Asp conservados (marcados na **Figura 9**). Esses resíduos de aminoácidos estão envolvidos na catálise enzimática de Kre2 (Thomson *et al.*, 2000; Lobsanov *et al.*, 2004). Em *C. albicans*, o domínio catalítico da Kre2 estende do resíduo de Lys-110 até a Cys-383 conservada, podendo ser dividido em dois subdomínios: uma região de Lys-110 a Leu-276 e outra que se estende da Tyr308 à Cys383 (Thomson *et al.*, 2000).

```

Kre2Pb3      GHIPSEHWSFPDFIDQERAAKVREDMKKKQVIYGDSISYRHMCRYESGFFFRHELLDQFD 210
Kre2Pb18    GHIPSEHWSFPDFIDQERAAKVREDMKKKQVIYGDSISYRHMCRYESGFFFRHELLDQFD 210
Kre2Pb01    GHIPSEHWSFPDFIDQERAAKVREDMKEKQVIYGDSISYRHMCRYESGFFFRHELLNQFD 210
Kre2Bd      GLIPTEHWSFPDFIDQAKAAKVREEMKEKQVIYGDSISYRHMCRYESGFFFRHELLNQFD 188
Kre2Hc      GVIPIKEHWSFPDFIDQAKAAKVRQDMKEKQVIYGDSISYRHMCRFESGFFFRQELLQKFD 198
Kre2Ci      GKIPPEHWSFPPEWIDQNKAAAEARKEMEEKVIYGGISYRHMCRYESGFFFRHELMLNYD 224
Kre2Af      GEIPKEHWSYPDWIDQEAKAKVREEMGQKKIYGDSESYRHMCRYESGFFFRHPLMLNYE 200
Kre2Ca      GLIPKEHWSYPDWIDQEKAALVREEMREKKLIYGHSESYRHMCRFESGFFFRQEILNDYD 230
Kre2Cn      GKIDPEHWYQPEWIDEEKATKAREEMIRKKVIYGHSVYRNMCRFNSGFFFRHPLLANYD 200
* * ** * :*: : * .*: * .*: * * .*: * * :*: * * :*: * * :*: * * :*:

```

```

Kre2Pb3      YYWRVLEPNVEFFCDINFDPFKFMKDNKKKYSFVLSLYEYKETVPTLWDSVKKFMAKYPQH 270
Kre2Pb18    YYWRVLEPNVEFFCDINFDPFKFMKDNKKKYSFVLSLYEYKETVPTLWDSVKKFMAKYPQH 270
Kre2Pb01    YYWRVLEPSVEYFCDINFDPFKFMKDNKKKYSFVLSLYEYKETVPTLWDSVKKFMEKYPQH 270
Kre2Bd      YYWRVLEPSVEYFCDISYDFPKFMKDNKKKYSFVISLYEYKETVLTWDSVKKFMMKYPQH 248
Kre2Hc      YYWRVLEPSIEYFCDIGDFPFKFMKDNKKKYSFVISLYEYRDTVATWDSVKKFMEKYPQH 258
Kre2Ci      YYWRVLEPSVKYFCDIDFDFKFMKDNKKKYSFVLSLHEYRET VATLWDSVKKFMEKHPEH 284
Kre2Af      YYWRVLEPSIELYCDISDFPKLMKEQNKKYSFVLSLYEYDTPSLWDSVKKFMGNHPEH 260
Kre2Ca      YYWRVLEPDIKLYCDIDYDIFKWMKDNKKDYAFTISLPEYKETIPTLWDTTKFEIEKNPQY 290
Kre2Cn      YYWRVLEPSVKFFCDLAYDFFLVMQDNKVYGF TISLFEYIETIPTLWDAVKEFEGHEPEY 260
***.***.: :*: : * * *.:*: * * .*: * * :*: * * :*: * * :*:

```

```

Kre2Pb3      IAEDNNMDFISSDGGETYNLCHFWNSNEIVGDNWLRSQEYLDYFDVLDKDGFFFYERWGD 330
Kre2Pb18    IAEDNNMDFISSDGGETYNLCHFWNSNEIVGDNWLRSQEYLDYFDVLDKDGFFFYERWGD 330
Kre2Pb01    IAEDNNMDFISSDGGDTYNLCHFWNSNEIVGDNWLRSQEYLDYFDVLDKDGFFFYERWGD 330
Kre2Bd      IAENNLEFVSQDGGETYNLCHFWNSNEIVGDLNWLRSQAYLDYFDI LDKDGFFFYERWGD 308
Kre2Hc      IAEDNNLEFVSEDGGKTYNLCHFWNSNEIVGDLNWLRSQAYLDYFDI LDKDGFFFYERWGD 318
Kre2Ci      IVQGNLEFVSEDGGKTYNMCHEFWNSNEIVGDLNWLRSKAYLDYFDVLDKDGFFFYERWGD 344
Kre2Af      IAEGNAMGFLSDDGGKTYNKCHFWNSNEIVGSLWLRSKQYLDYFDALDHDGFFFYERWGD 320
Kre2Ca      LAQNNLMDWVSDDKGQTYNGCHEFWNSNEIVGSLAFWRSEAYRKYFEHLDKAGFFFYERWGD 350
Kre2Cn      LPEGNAMQFVSDDGGETYNKCHFWNSNEIVGDLNFWRSQPYMEFFEFLDKKGGFFFYERWGD 320
: .: * : :*: * * ** *.:*: * * :*: * * :*: * * :*: * * :*:

```

```

Kre2Pb3      APVHSIAAALMLKKEEVHFFNEIAYRHVVPFVHCPTGEQKRLDLKCHCNPKDNFDWKGHSC 390
Kre2Pb18    APVHSIAAALMLKKEEVHFFNEIAYRHVVPFVHCPTGEQKRLDLKCHCNPKDNFDWKGHSC 390
Kre2Pb01    APVHSIAAALMLKKEEVHFFNEIAYRHVVPFVHCPTGEQKRLDLKCHCNPKDNFDWKGHSC 390
Kre2Bd      APVHSIAAALMLKKEEVHFFNEIAYRHVVPFVHCPTGEQTRLDLKCHCNPKNNFDWKGYS 368
Kre2Hc      APVHSIAAALMLKKEEIHFFNEIAYRHVVPFVHCPTGEQMRDLDLKCHCNPRDNFDWKGYS 378
Kre2Ci      APVHSIAASILKKEEVHFFDQIGYRHVVPFTHCPTGEQRRETEWKACNPGDNFDWKGHSC 404
Kre2Af      APVHSIAAGIMLKKEEIHFFNEIAYRHVVPFTHCPTSEQMRDLDLKCHCNPSNFNDWKGYS 380
Kre2Ca      APVHSIAAALFLPREKIHFFEDVGYRHVVPFTNCPVDKEVRKARNCNCDPNKDFTWRGYS 410
Kre2Cn      APVHSIGAALFAKKEQIHFFDDIGYRHVPEPQHCPQGD-AHTRGNCWCDQANNFDWEWYS 379
*****.***.: :*: * * ** *.:*: * * :*: * * :*: * * :*:

```

Figura 9. Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína kre2. 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.

6.5) Modelagem por homologia das proteínas TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01)

Na ausência de estruturas 3D resolvidas experimentalmente, métodos computacionais são utilizados para prever modelos tridimensionais de proteínas e fornecer informações sobre suas estruturas (Cavasotto & Phatak, 2009). A primeira etapa da modelagem por homologia para obtenção das estruturas teóricas das proteínas-alvo TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) foi a identificação de estruturas

tridimensionais que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da sequência-alvo (proteína-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>). Dos alvos potenciais selecionados a partir das análises de genômica comparativa, apenas TRR1 e KRE2 mostraram uma identidade de sequência primária acima de 50% com as sequências das estruturas 3D encontradas no PDB (**Tabela 3**), critério este utilizado pelo nosso grupo para realizar a modelagem molecular por homologia das duas proteínas TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01). Assim, as estruturas homólogas das proteínas-alvo TRR1 e KRE2 com maior porcentagem de identidade de sequência e maior escore foram selecionadas. Foram encontradas duas estruturas homólogas à proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01) no PDB: 3ITJ (PDB ID) de *S. cerevisiae* e 1VDC (PDB ID) de *A. thaliana* com 65% e 57% de identidade de sequência, respectivamente. Para a proteína KRE2 de *P. lutzii* (Pb01), há apenas uma estrutura homóloga no PDB: 1S4N (PDB ID) de *S. cerevisiae* com 50% de identidade de sequência (**Tabela 3**). As sequências de resíduos de aminoácidos de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) foram comparadas com as sequências primárias das estruturas depositadas no PDB usando o programa BLAST. A construção dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) foi realizada a partir destas estruturas homólogas.

As sequências alvo de *P. lutzii* (Pb01) (TRR1 e KRE2) foram alinhadas com as sequências molde. Correções dos alinhamentos foram realizadas manualmente a fim de preservar as estruturas secundárias e as correspondências entre os resíduos de cisteína (**Figura 10**). Na análise de alinhamento manual das sequências de TRR1, um fragmento de 34 resíduos de aminoácidos da região C-terminal de TRR1 (Glu325-Leu358) não alinhou por ser maior que as estruturas-molde. O mesmo ocorreu para o fragmento de 70 resíduos de aminoácidos da região N-terminal de KRE2 (Met1-Phe70), entretanto, nesse caso, isso ocorreu porque a estrutura-molde usada foi cristalizada sem uma parte (96 resíduos) do sítio N-terminal (Lobsanov, *et al.*, 2004). Os fragmentos terminais das duas proteínas não estão envolvidos no sítio ativo e foram removidos, das sequências primárias de TRR1 e Kre2, sem prejudicar a construção dos modelos.

A



B



Figura 10. Alinhamento realizado entre proteínas de *P. lutzii* (Pb01) e os moldes encontrados no PDB. (A) TRR1 e as estruturas molde 3ITJ e 1VDC. (B) KRE2 e a estrutura molde IS4N.

As caixas representam as regiões dos moldes que foram usadas como referência para a modelagem por homologia da proteína TRR1. No alinhamento entre a proteína TRR1 e os moldes, as caixas grandes indicam que o molde 1VDC foi usado como referência e as caixas pequenas indicam que a referência foi o molde 3ITJ. Considerando o alinhamento global, 3ITJ é o melhor molde para usar como referência para realizar a modelagem por homologia da proteína TRR1 de *P. brasiliensis*. Entretanto, algumas regiões do molde 1VDC apresentam resíduos de aminoácidos idênticos aos da proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01), resíduos estes que são diferentes no molde 3ITJ. As seguintes cores representam os aminoácidos: branco (aminoácidos idênticos entre a proteína TRR1 e os dois moldes), verde (aminoácidos idênticos entre a proteína TRR1 e o molde 1VDC), vermelho (aminoácidos idênticos entre a proteína TRR1 e o molde 3ITJ), laranja (aminoácidos únicos no molde 3ITJ), azul escuro (aminoácidos únicos no molde 1VDC), e azul claro (aminoácidos únicos na proteína TRR1). Os resíduos de cisteína (marcados na **Figura 10 A** por uma caixa na cor azul claro) que formam ligações disulfeto são conservados entre a proteína TRR1 e os dois moldes. No alinhamento entre a proteína KRE2 e o molde 1S4N, as caixas também indicam as regiões que foram usadas como referência para a construção da modelo tridimensional da proteína KRE2. As seguintes cores representam os aminoácidos: branco (aminoácidos idênticos entre a proteína KRE2 e o molde), rosa (aminoácidos similares entre a proteína KRE2 e o molde), vermelho (aminoácidos únicos na proteína KRE2), e azul claro (aminoácidos únicos no molde). Os resíduos de cisteína (marcados na **Figura 10 B** com a cor verde) também são conservados entre a proteína KRE2 e o molde 1S4N.

A construção dos modelos foi feita a partir dos moldes e as coordenadas atômicas foram transferidas para os alvos TRR1 e KRE2. 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 visualização dos modelos foi obtida pelo programa PyMOL versão 0.99rc6 (Delano Scientific, www.pymol.org). As estruturas

estáveis de TRR1 e KRE2 estão apresentadas na **Figura 11**. A proteína TRR1 tem 9 α -hélices e 17 folhas β , enquanto que a proteína KRE2 tem 18 α -hélices e 11 folhas β .

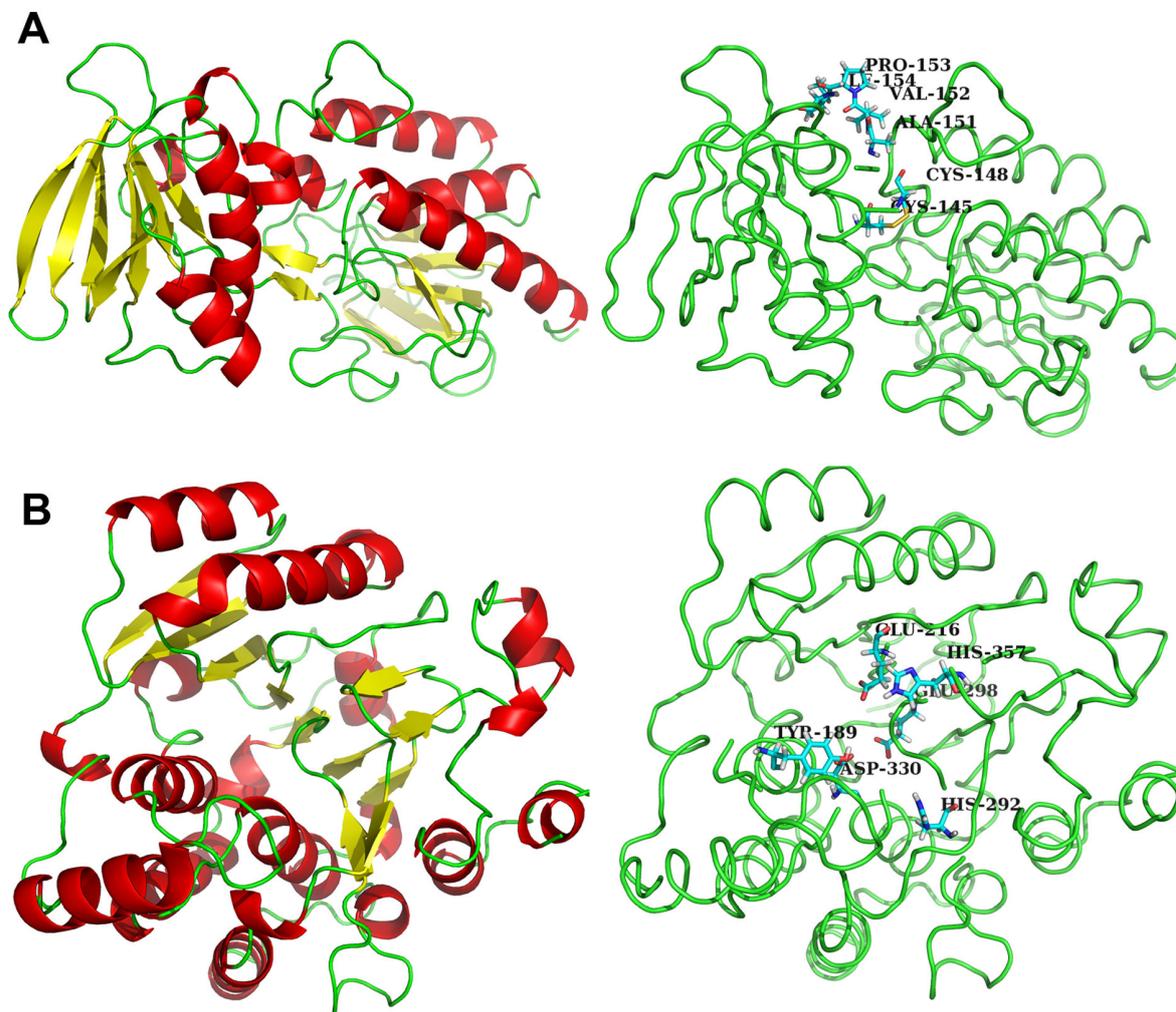


Figura 11. Estruturas tridimensionais preditas das proteínas TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) obtidas por modelagem molecular por homologia. (A) Proteína TRR1. (B) Proteína KRE2. As α -hélices estão representadas pela cor vermelha, as folhas β pela cor amarela e os *loops* pela cor verde. Os aminoácidos envolvidos no sítio catalítico das proteínas estão destacados.

A estrutura cristalina do monômero TRR1 de *S. cerevisiae* é composta de dois domínios que formam os sítios de ligação ao NADPH e ao FAD, sendo semelhante àquela encontrada em plantas. A molécula de FAD é ligada à proteína TRR1 de *S. cerevisiae*, sendo estabilizada por interações com os resíduos Pro13, Glu33, Gln45, Asn54, Gln136, Asp288 e Gln296. O domínio de ligação ao NADPH contém resíduos

de cisteína ativos e está ligado ao domínio FAD por uma folha β curta (Dai *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2010). A **Figura 11A** mostra os dois domínios do modelo tridimensional da proteína TRR1 de *P. brasiliensis* modelada. Outros importantes resíduos do sítio ativo da proteína TRR1 são Ala151, Val152, Pro153 e Ile154, que forma uma região hidrofóbica no domínio de ligação ao NADPH (**Figura 11A**).

O sítio ativo da proteína KRE2 apresenta os resíduos conservados His292, His357, Asp330 e Glu298 (**Figura 11B**). Outros resíduos importantes do sítio ativo da proteína KRE2 são Glu216, que interage com o íon metal Mn^{2+} e cria um centro nucleofílico reativo para a reação de glicosiltransferase, e Tyr189, que coordena a ligação ao doador e ao receptor permitindo a transferência de manose para o oligossacarídeo crescente.

A modelagem molecular por homologia é norteadora e catalisa a busca de novas drogas que possam atuar contra os alvos, diminuindo significativamente o tempo e os custos de uma das etapas do processo de desenvolvimento de novas drogas. Vale ressaltar que dados da literatura mostram que a técnica de modelagem reduz o tempo de P&D a 1/5 quando comparado com as técnicas convencionais de desenvolvimento de novos fármacos. Além disto, os custos são reduzidos o que justifica fortemente a utilização dessa estratégia.

O aumento de estruturas protéicas 3D depositadas em bancos de dados permite a predição estrutural por métodos teóricos. Dessa forma, foi realizada a modelagem molecular por homologia com as proteínas TRR1 e KRE2 por apresentarem homólogos no PDB com alta porcentagem de identidade de sequência. Na ausência de estruturas resolvidas experimentalmente, a ferramenta de modelagem por homologia disponível foi extremamente útil para a predição estrutural das proteínas KRE2 e TRR1 de *P. lutzii* (Pb01).

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). Resultados bem sucedidos já foram obtidos realizando a modelagem molecular de potenciais alvos para drogas em *Mycobacterium tuberculosis* (Caceres *et al.*, 2008), *Streptococcus agalactiae* (Caceres *et al.*, 2008b), *Curvularia lunata* (Brunskole *et al.*, 2008), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Barh *et al.*, 2011). Esses trabalhos permitiram elucidar os mecanismos de interação entre as proteínas-alvo e seus ligantes, possibilitando assim a busca por compostos que apresentam alta afinidade contra as proteínas-alvo específicas. Em um trabalho realizado por Caceres e cols. em 2008, foi descrito um modelo estrutural da purina nucleosídeo fosforilase (PNP) de *S. agalactiae*, uma importante proteína considerada potencial alvo para o desenvolvimento de drogas antibacterianas. Foi realizada a

modelagem molecular por homologia de PNP com 15 diferentes ligantes, a fim de determinar a especificidade destes ligantes contra a proteína-alvo.

6.6. Varredura virtual de quimiotecas

Simulações por varredura virtual são aplicadas a estruturas/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, preparação dos ligantes e processo de filtração (*docking*) baseado nas estruturas previstas de TRR1 e KRE2.

Os dados de dinâmica molecular foram usados para verificar a estabilidade dos modelos das proteínas-alvo. A dinâmica molecular consistiu na simulação de um sistema de partículas ao longo do tempo usando o programa NAMD, que se baseia nos cálculos de movimento de cada átomo no sistema molecular, fornecendo assim uma trajetória do sistema em estudo.

A estabilidade de dobramento dos modelos durante as simulações foram avaliadas pelo monitoramento do perfil de RMSD obtido pela comparação dos deslocamentos atômicos a partir da trajetória de dinâmica molecular. Os resultados revelaram que os sistemas TRR1 e KRE2 mantiveram-se estáveis ao longo da trajetória de 10 ns de dinâmica molecular (**Figura 12**). O *time step* da dinâmica foi de 1 fs. O tempo total de simulação para a trajetória dos dois modelos foi de 10 ns. Uma conformação foi registrada a cada 1 ps, gerando 10.000 conformações. Para construir o gráfico do resultado da simulação de dinâmica molecular, em cada 20 conformações uma foi recuperada dando um total de 500 conformações.

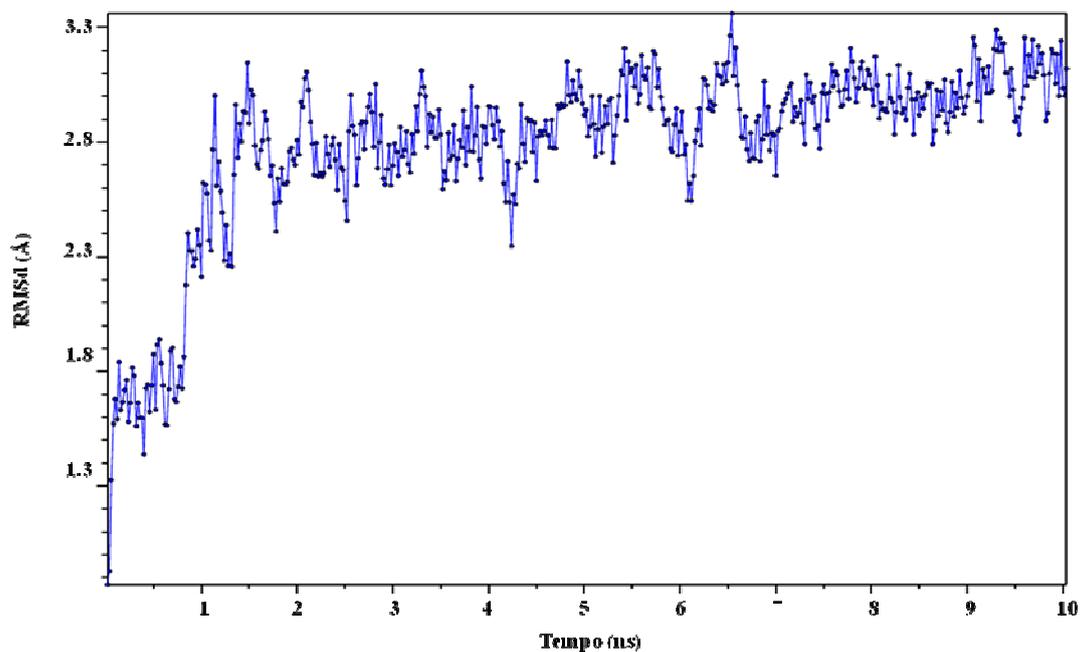
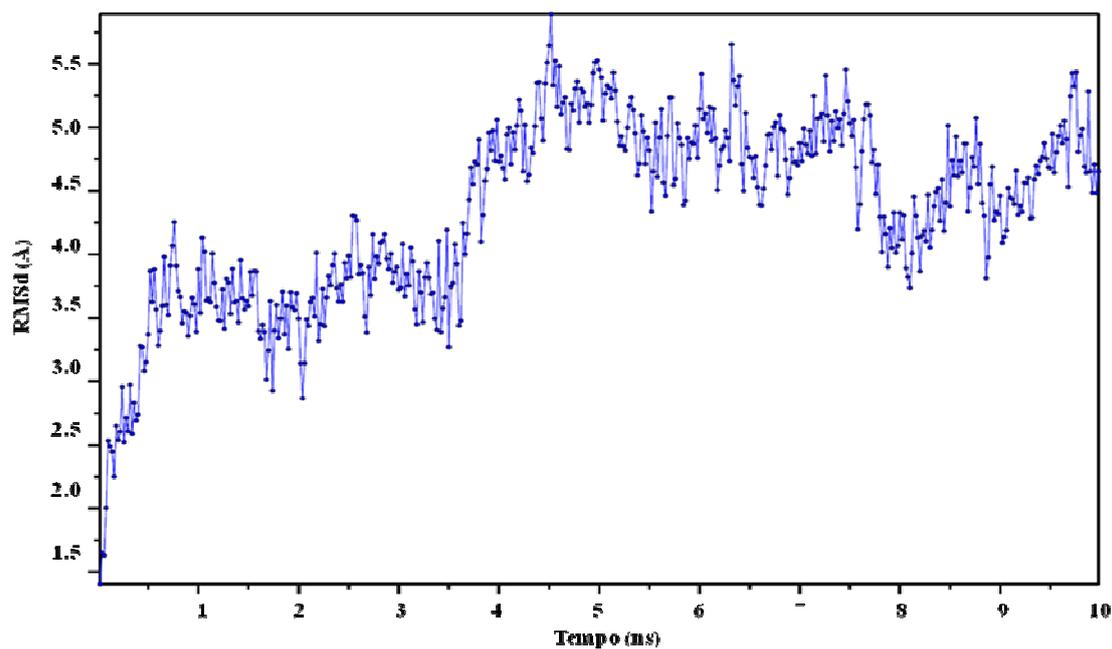
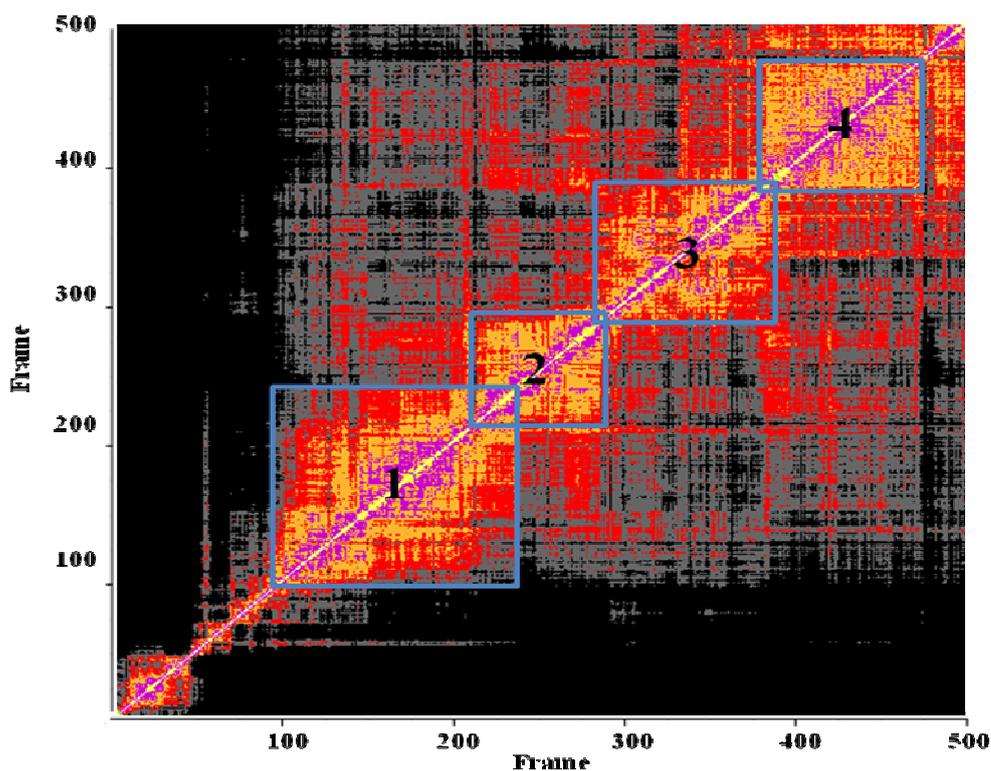
A**B**

Figura 12. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dos átomos da cadeia principal das 500 conformações dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) ao longo da trajetória de dinâmica molecular. (A) Modelo KRE2. (B) Modelo TRR1.

Antes do início da dinâmica molecular, os dois modelos foram solvatados em uma caixa de água de 80\AA^3 . Após as simulações, o tamanho das caixas de água ficou em $77,5\text{\AA}^3$, mostrando que não houve mudança significativa no sistema e na estabilidade das caixas de água. Algumas propriedades derivadas da trajetória de dinâmica molecular são fáceis de extrair, como o RMSD. Uma maneira útil para expor as relações entre as configurações moleculares é agrupar as diferentes conformações em subgrupos com base na similaridade de suas conformações. Para agrupar as configurações moleculares a partir de uma trajetória de dinâmica molecular, o algoritmo agrupa as configurações moleculares semelhantes em conjuntos distintos ou grupos. Isso dá uma visão refinada de como uma determinada molécula apresenta-se no espaço conformacional (Shenkin & McDonald, 1994; Shao *et al*, 2007).

Para agrupar os dados obtidos com a realização da dinâmica molecular, cada trajetória de 10 ns de simulação gerou um total de 500 conformações para os modelos KRE2 e TRR1. A **Figura 13** mostra um *gráfico* dos valores de RMSD dos dois modelos, em separado, durante a simulação da trajetória de dinâmica molecular.

A



B

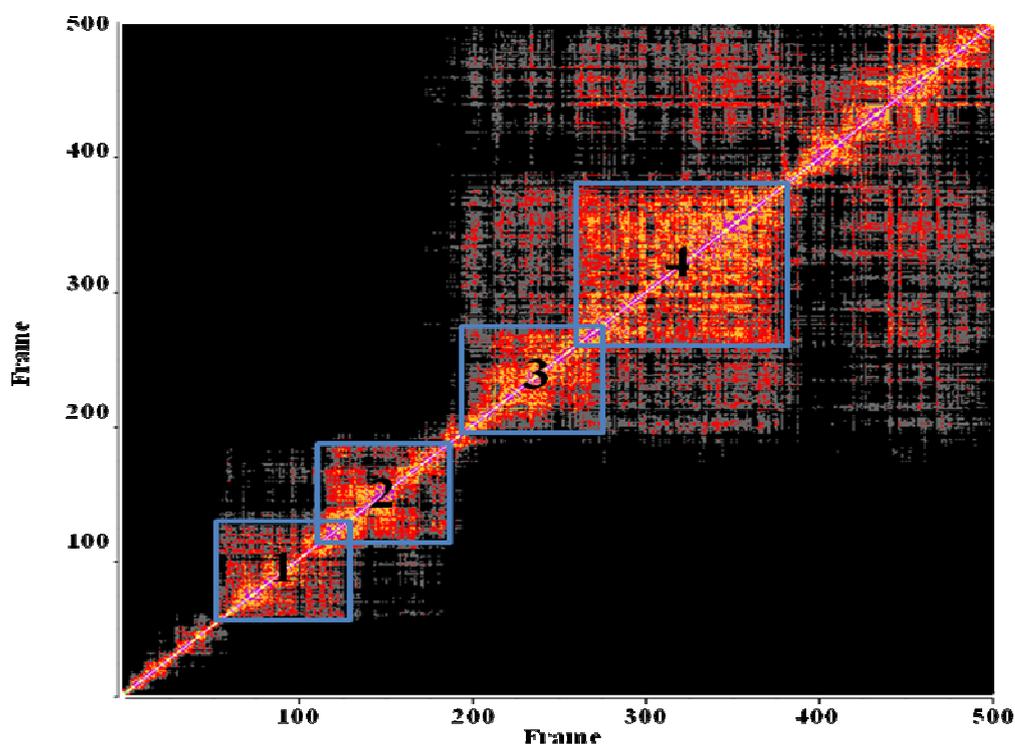


Figura 13. Gráfico dos valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dos átomos da cadeia principal das 500 conformações dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) ao longo da trajetória de dinâmica molecular. (A) Modelo KRE2. (B) Modelo TRR1. Cada ponto do gráfico representa o RMSD entre as conformações, sendo que os menores valores de RMSD estão próximos à linha diagonal.

Foi possível analisar a estrutura de todas as conformações a partir da visualização do gráfico de RMSD em duas dimensões. Cada ponto do gráfico representa o RMSD entre as conformações, assim, na diagonal, tem-se $\text{RMSD} = 0 \text{ \AA}$, sendo o gráfico simétrico em relação a sua diagonal. Os gráficos mostram a presença de quatro grupos principais de conformações diferentes para os dois modelos. Foi verificado que cada modelo apresenta 4 grupos conformacionais distintos. Para verificar o quanto cada grupo conformacional é diferente, foi realizada a sobreposição das estruturas 3D modeladas dos diferentes grupos (**Figura 14**).

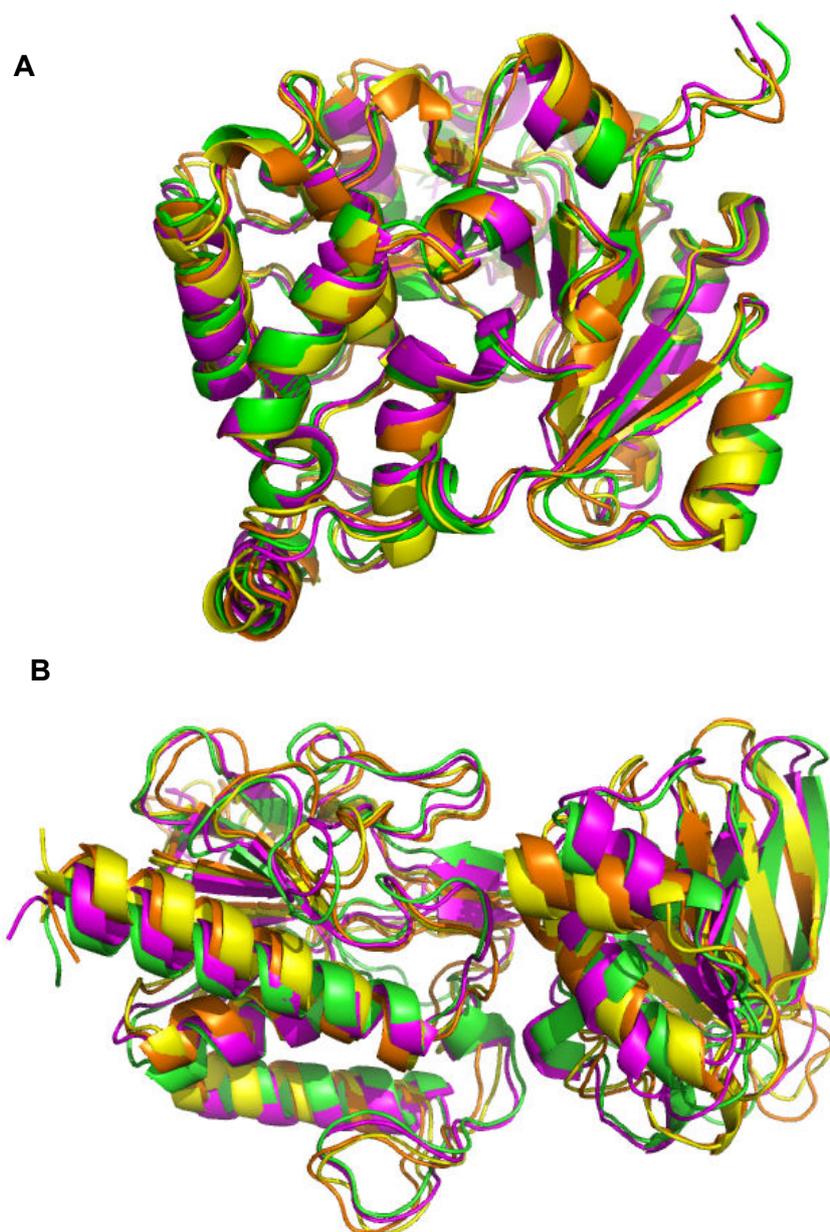


Figura 14. Os quatro diferentes grupos conformacionais dos modelos tridimensionais de TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (Pb01) sobrepostos. (A) Modelo KRE2. (B) Modelo TRR1. Grupo conformacional 1 (verde); Grupo conformacional (rosa); Grupo conformacional (amarelo); Grupo conformacional (laranja).

As seguintes cores representam os 4 grupos conformacionais mais prováveis: verde (conformação 1), rosa (conformação 2), amarelo (conformação 3) e laranja (conformação 4). Para o modelo KRE2 (**Figura 14A**), é possível visualizar pequenas mudanças conformacionais. Para o modelo TRR1 (**Figura 14B**) essas mudanças são um pouco mais evidentes, embora ainda com bastante sobreposição. Estas diferenças conformacionais dos modelos foram consideradas no processo de varredura virtual.

Para o processo de preparação dos ligantes, o banco *Chimiotèque Nationale* forneceu 43.000 compostos, enquanto que *Life Chemicals* forneceu 750.000. Os compostos foram pré-selecionados segundo os critérios de propriedades *drug-like* e pelo 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 8.000 do banco *Chimiotèque Nationale* e 3.000 do banco *Life Chemicals*. Os 11.000 compostos das quimiotecas foram convertidos de estruturas bidimensionais a tridimensionais pelo programa CORINA (Gasteiger *et al.*, 1990).

O *docking* dos 11.000 compostos foi realizado com as quatro conformações dos modelos TRR1 e KRE2 por meio do programa GOLD. O programa permitiu a busca de possíveis interações entre as proteínas-alvo 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 escores, 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 escores, os compostos com os maiores escores nas quatro conformações dos modelos TRR1 e KRE2 foram selecionadas (**Tabela 4**).

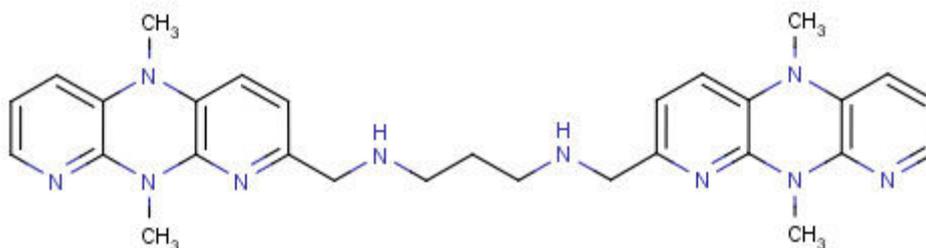
Tabela 4. Moléculas dos bancos *Chimiothèque Nationale* e *Life Chemicals* selecionadas após a realização do *docking* com os modelos KRE2 e TRR1 de *P. lutzii* (Pb01).

KRE2		TRR1	
Chimiothèque Nationale	Life Chemicals	Chimiothèque Nationale	Life Chemicals
AB-00012717	F5912-0731	AB-00017178	F3010-0057
AB-00002516	F3394-0412	AB-00016618	F0876-0030
AB-00023058	F3222-5837	AB-00002516	F3307-0100
AB-00038847	F5008-0377	AB-00038847	F3222-4930
AB-00017349	F5652-2782	AB-00028970	F3394-0412
AB-00003620	F5882-1949	AB-00038778	F5652-2782
AB-00002785	F3263-0059	AB-00015119	F1109-0100
AB-00038801	F5226-2261	AB-00013165	F3394-0585
AB-00003870	F3010-0057		F3398-5211
AB-00017341	F5754-0452		F1806-0122
AB-00038842	F3394-0585		F3307-0033
AB-00009227	F1109-0100		F5754-0452
AB-00038817	F0266-4227		
AB-00012656	F2252-0157		
AB-00013336	F3398-5211		
AB-00038826	F0170-0365		
AB-00017251	F0608-0758		

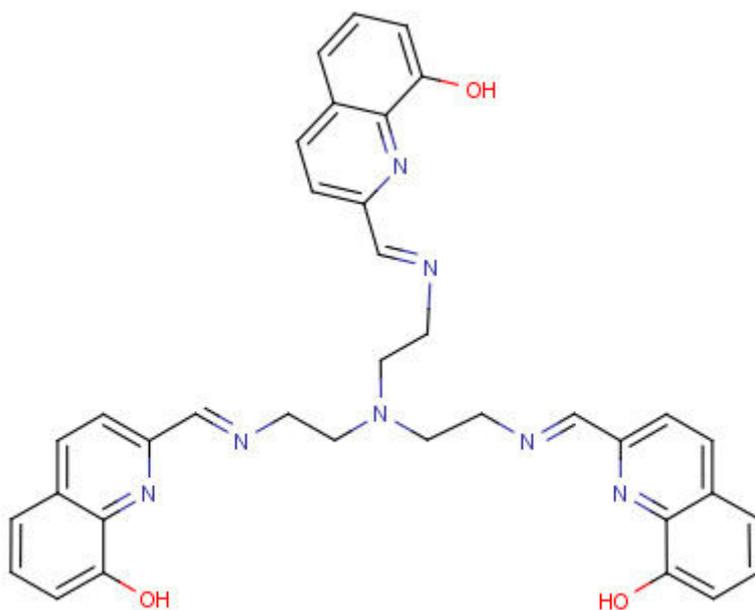
A estrutura bidimensional de todas as moléculas selecionadas pode ser visualizada a seguir.

Moléculas o banco *Chimiotèque Nationale* que interagem com o modelo KRE2 de *P. lutzii* (Pb01):

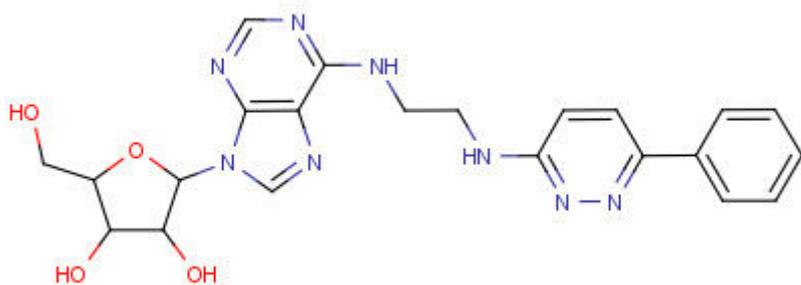
- **AB-00012717**



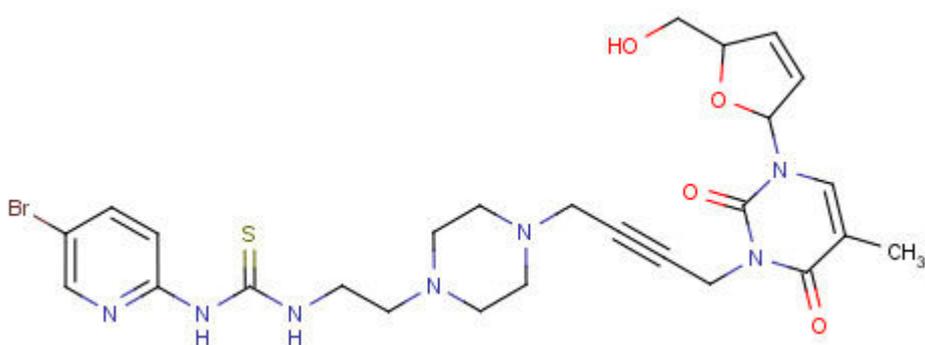
- **AB-00002516**



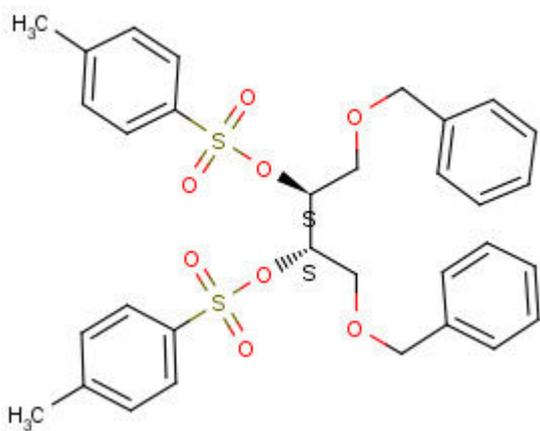
- **AB-00023058**



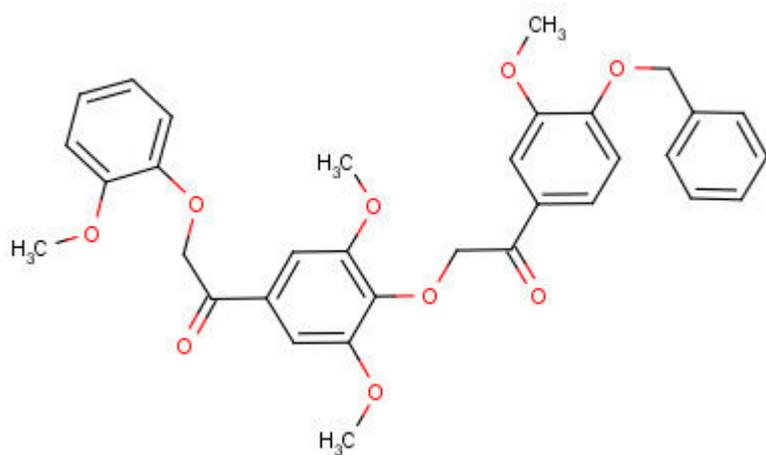
- **AB-00038847**



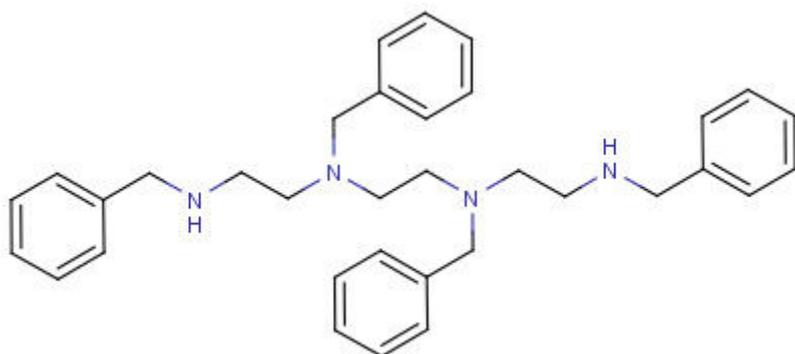
- **AB-00017349**



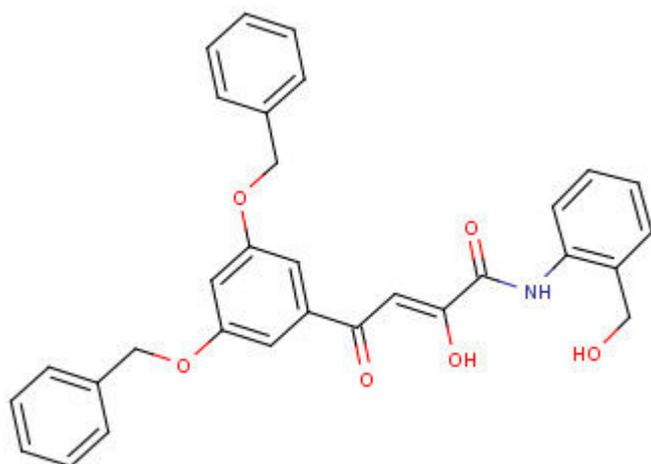
- **AB-00003620**



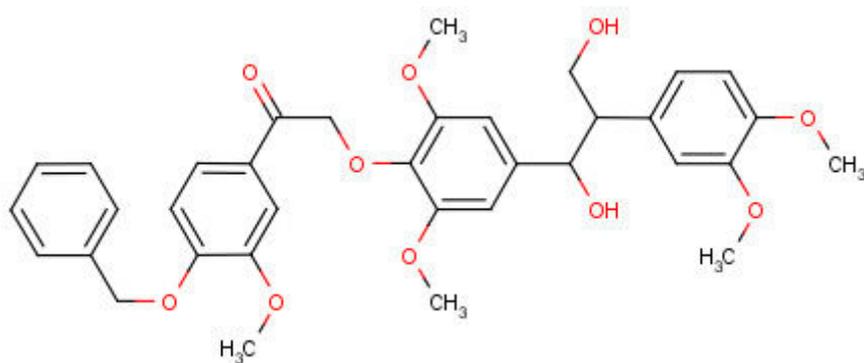
- **AB-00002785**



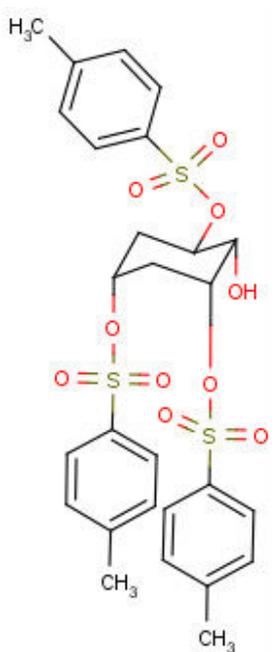
- **AB-00038801**



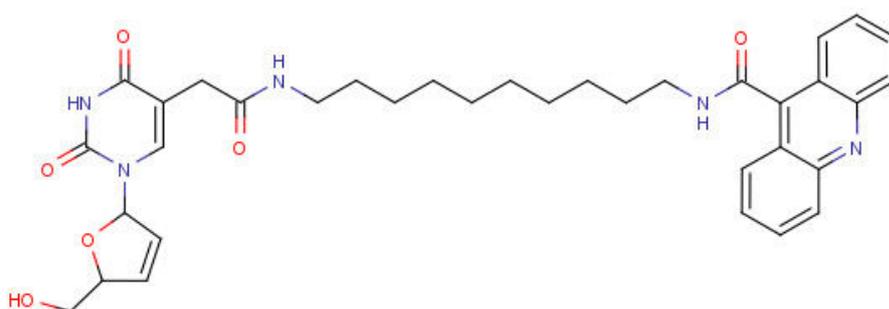
• **AB-00003870**



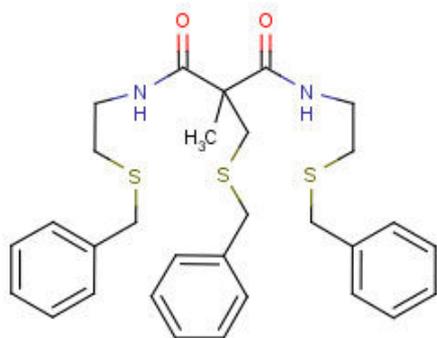
• **AB-00017341**



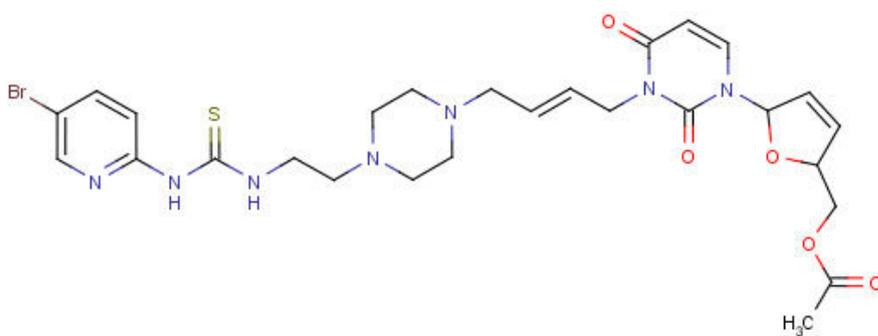
• **AB-00038842**



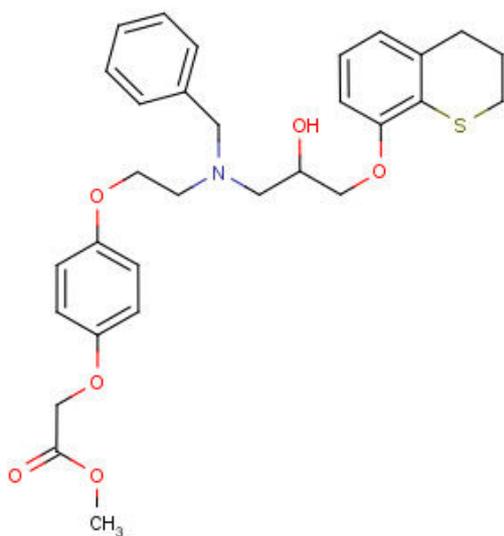
- **AB-00009227**



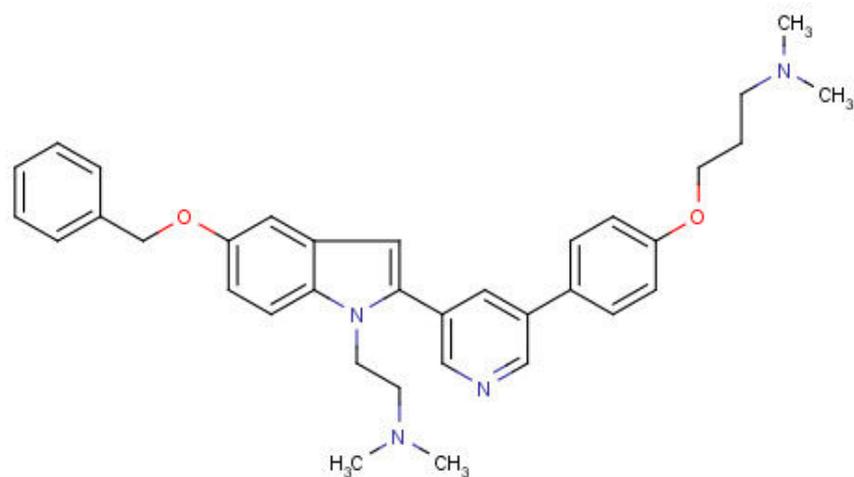
- **AB-00038817**



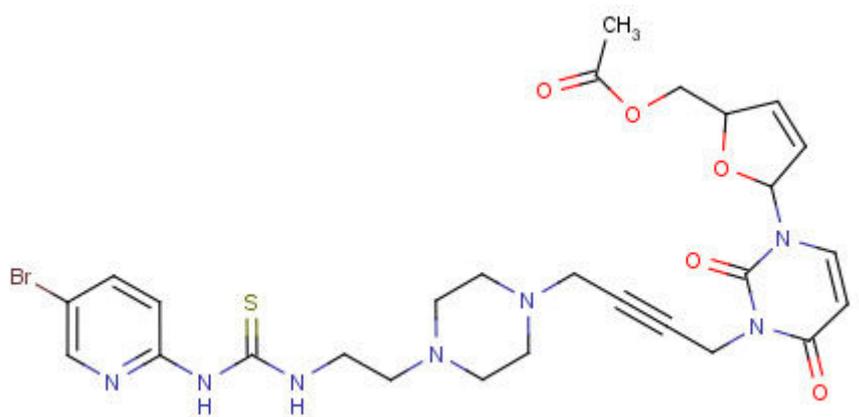
- **AB-00012656**



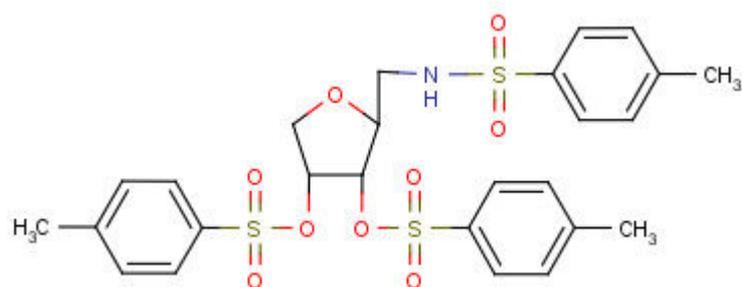
- **AB-00013336**



- **AB-00038826**

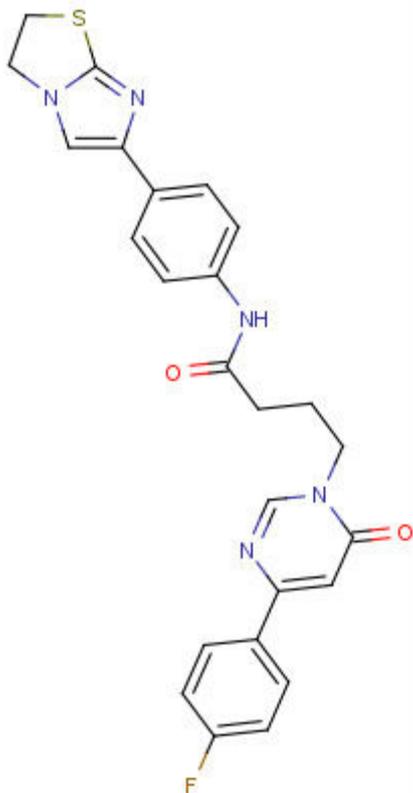


- **AB-00017251**

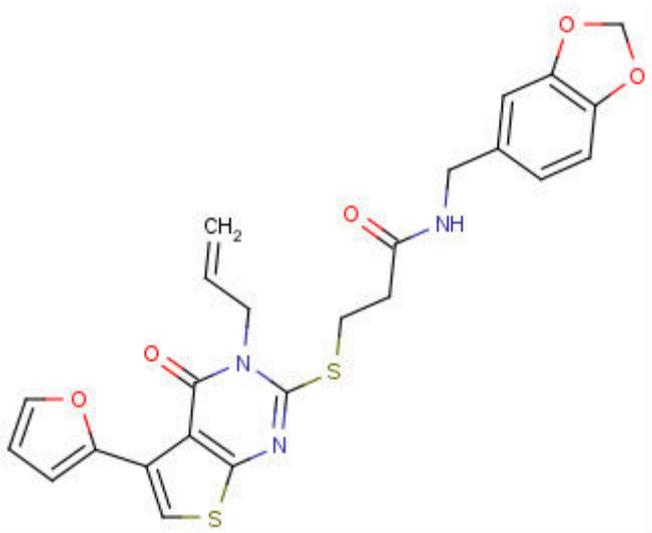


Moléculas o banco *Life Chemicals* que interagem com a proteína KRE2 de *P. lutzii* (Pb01):

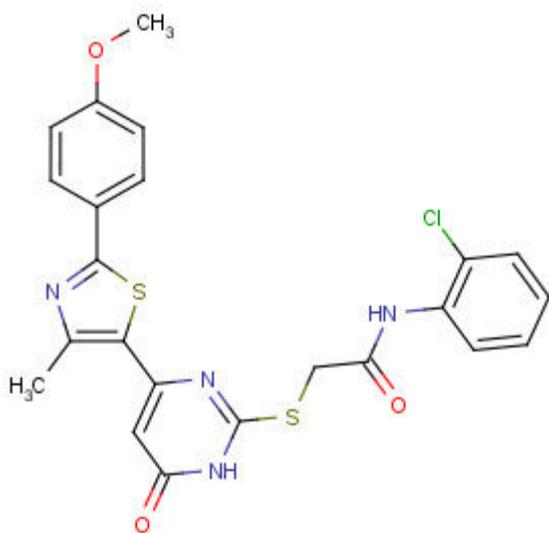
- F5912-0731



- F3394-0412



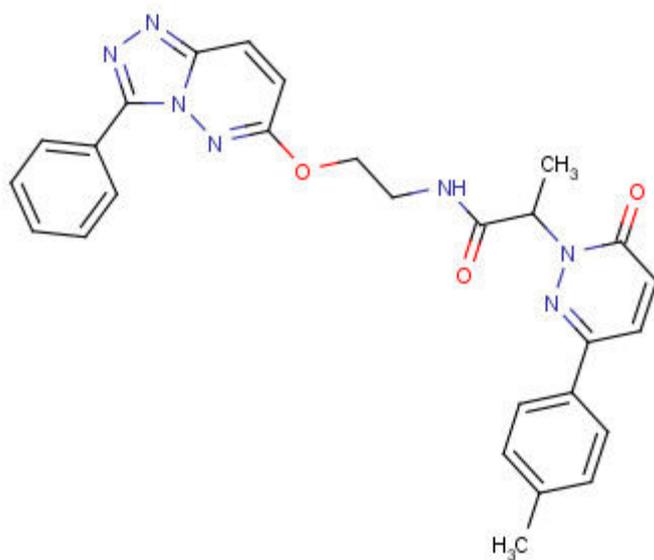
- **F3222-5837**



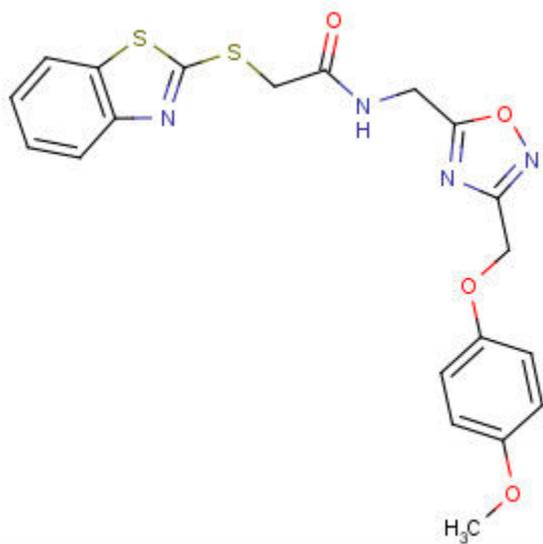
- **F5008-0377**



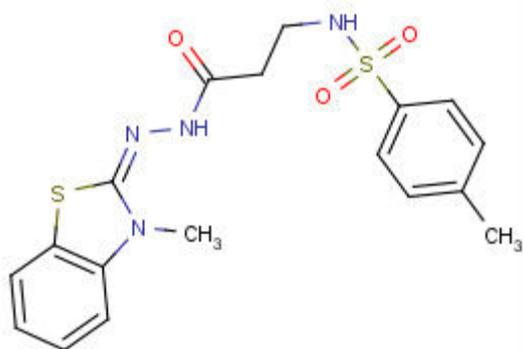
- F5652-2782



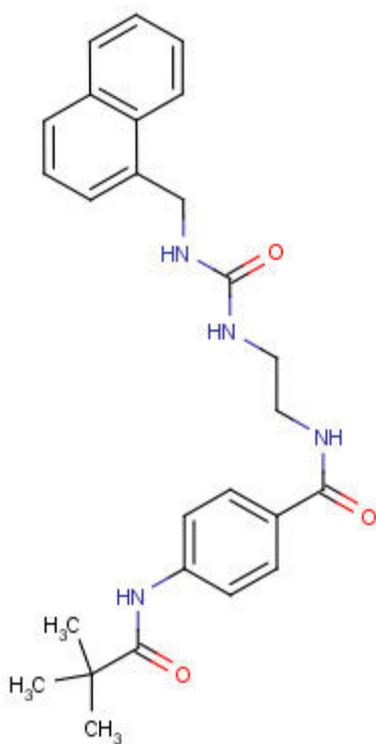
- F5882-1949



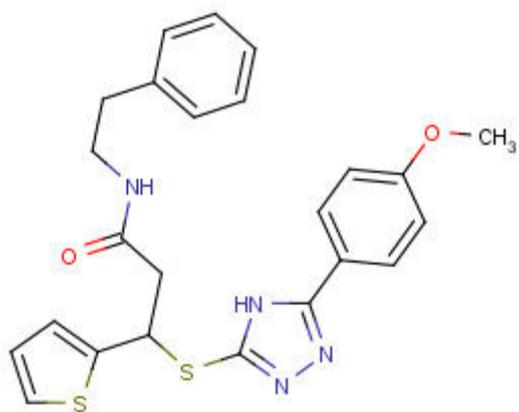
- **F3263-0059**



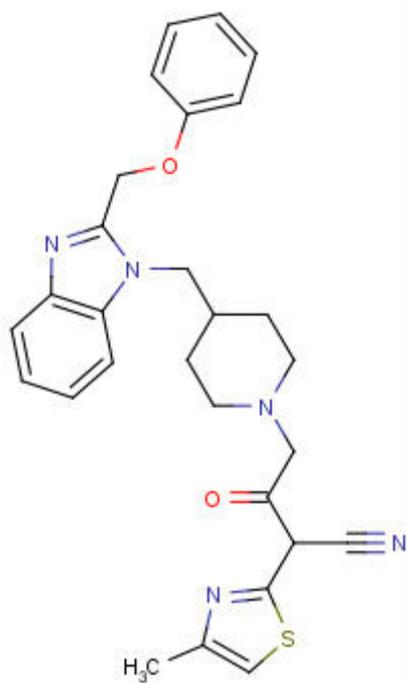
- **F5226-2261**



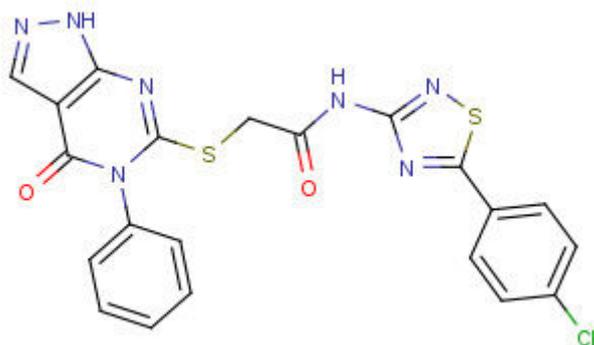
- **F3010-0057**



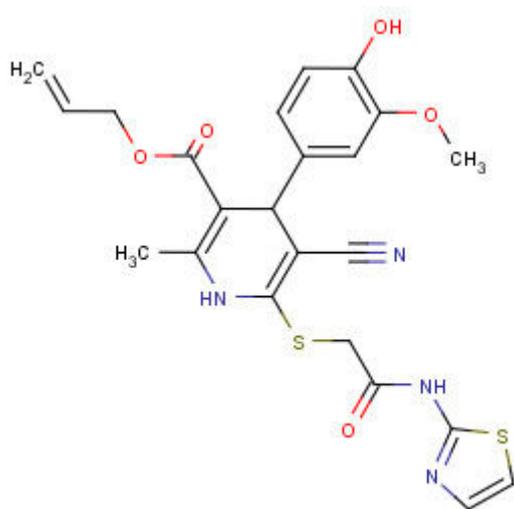
- **F5754-0452**



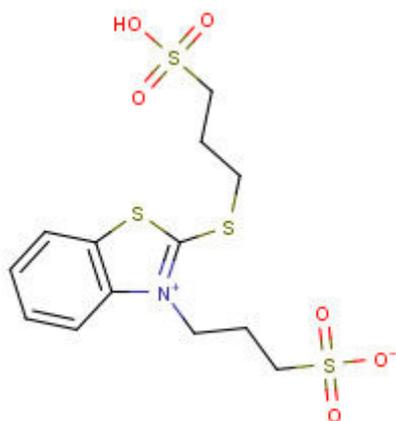
- **F3394-0585**



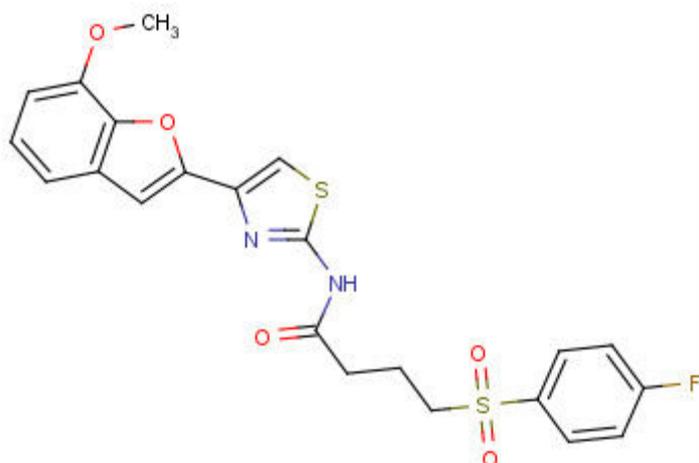
- **F1109-0100**



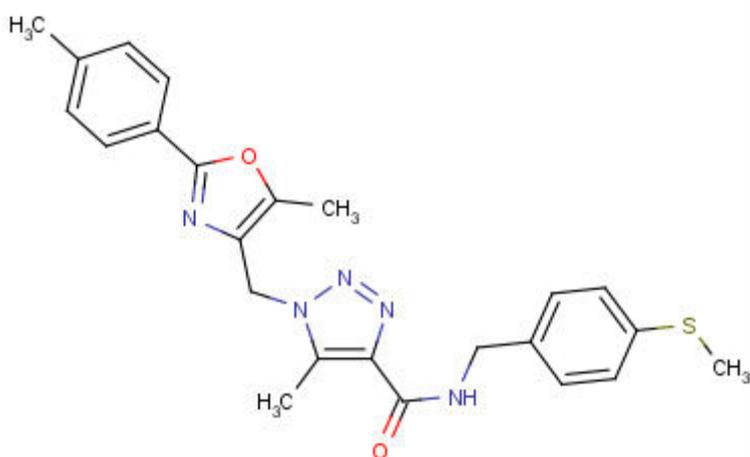
- **F0266-4227**



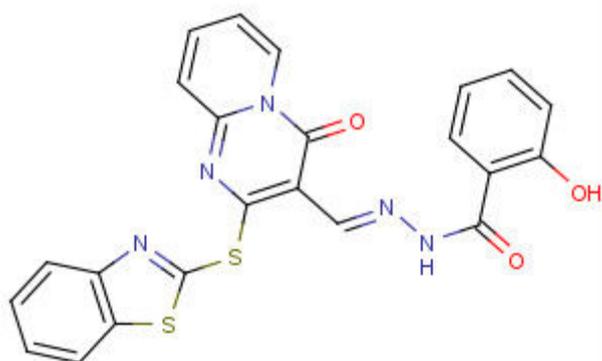
- **F2252-0157**



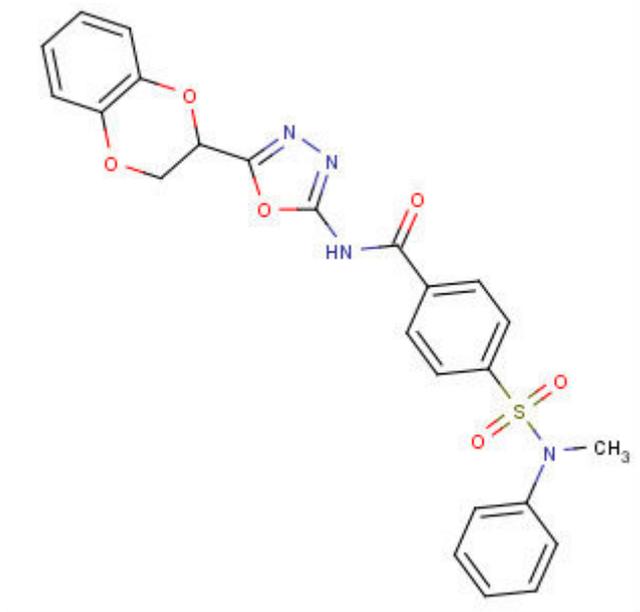
- **F3398-5211**



- **F0170-0365**

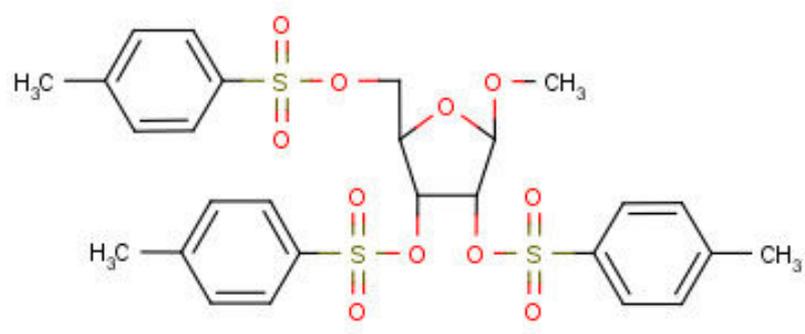


- F0608-0758

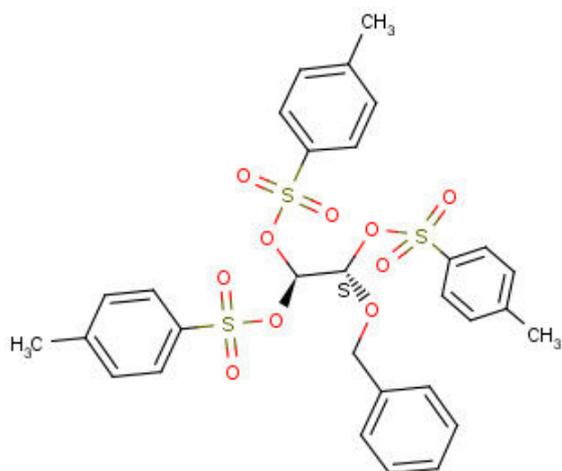


Moléculas o banco *Chimiotèque Nationale* que interagem com a proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01):

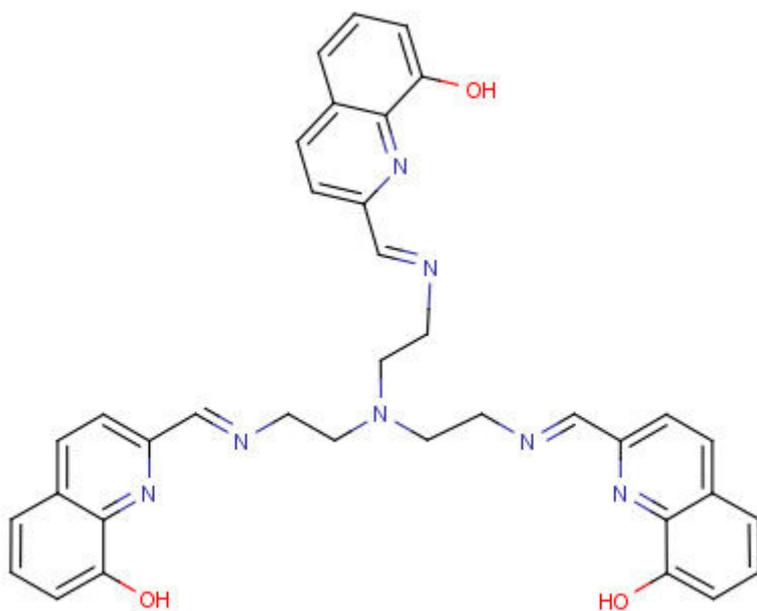
- AB-00017178



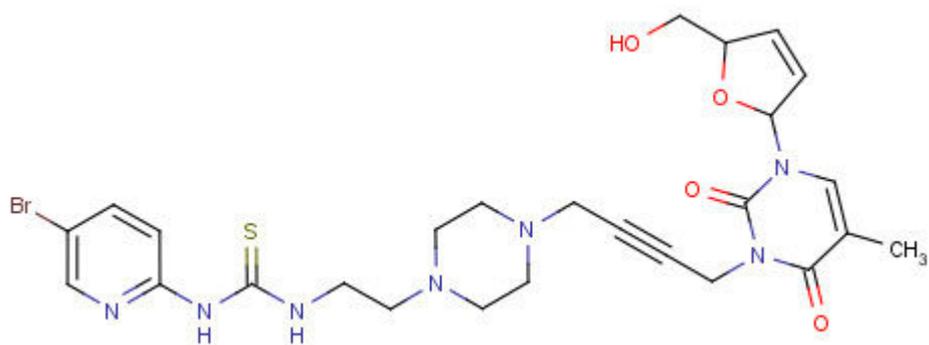
- **AB-00016618**



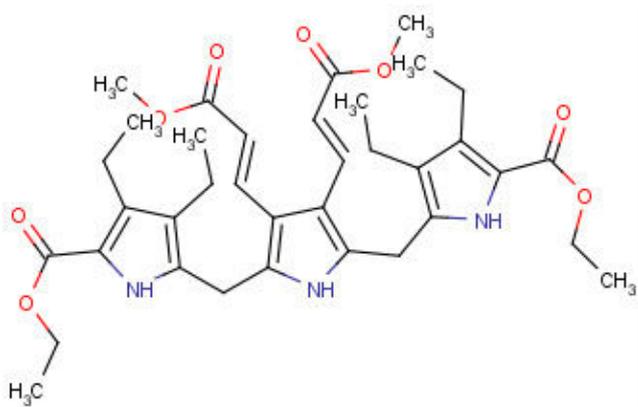
- **AB-00002516**



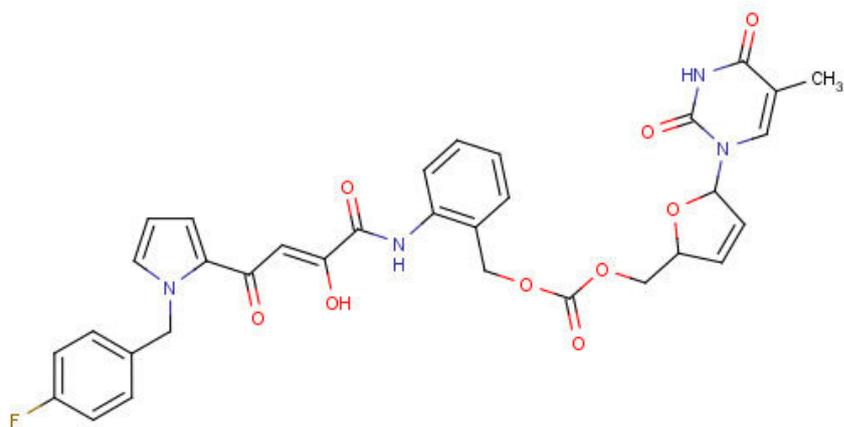
- **AB-00038847**



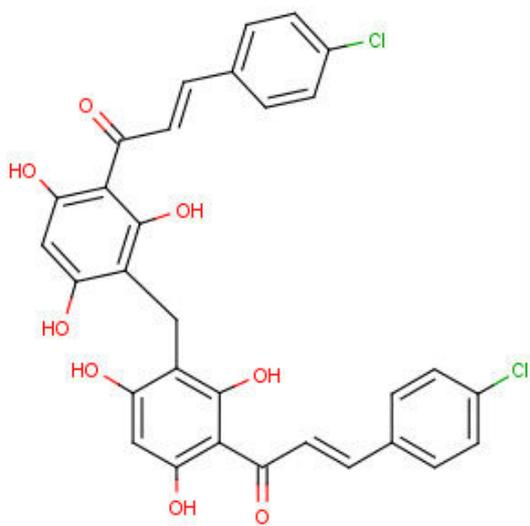
- **AB-00028970**



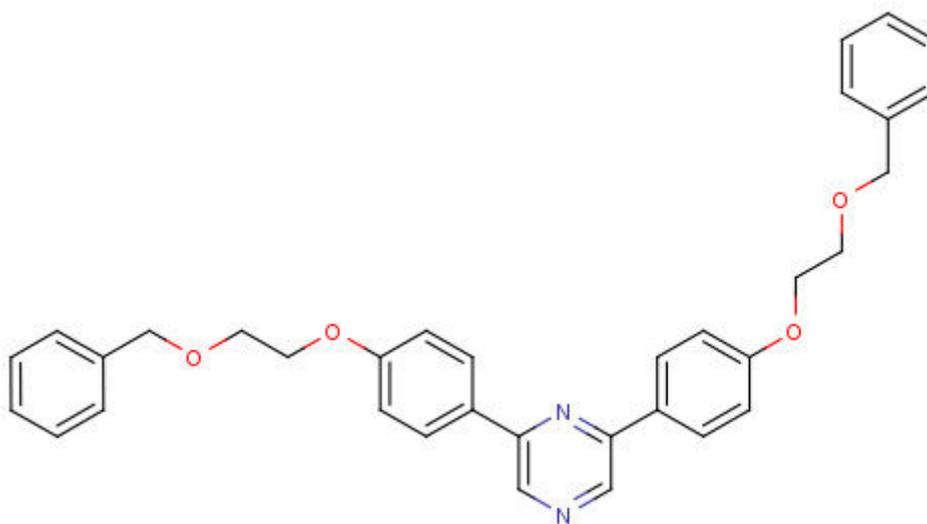
- **AB-00038778**



- **AB-00015119**

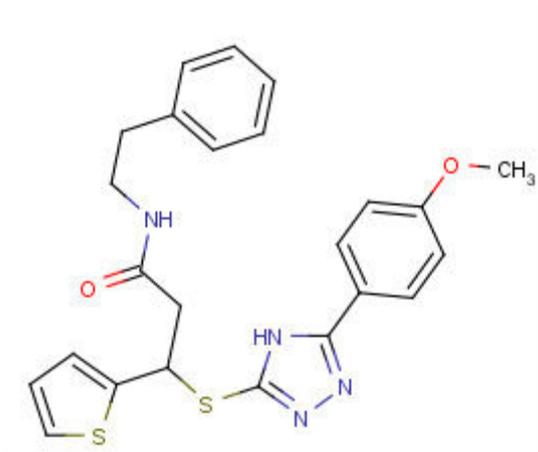


- **AB-00013165**

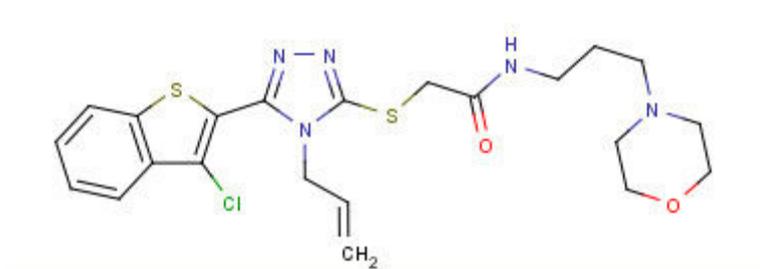


Moléculas o banco *Life Chemicals* que interagem com a proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01):

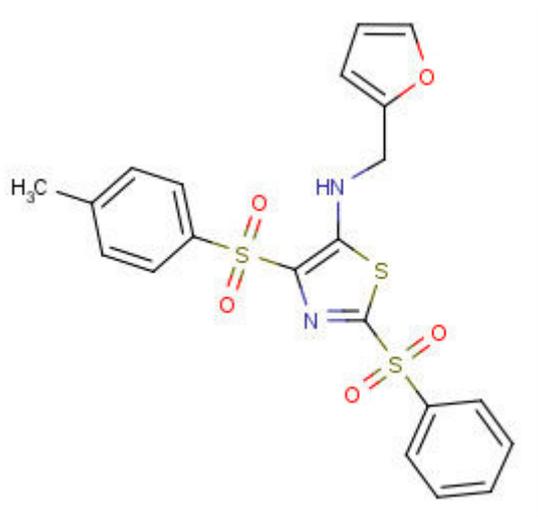
- F3010-0057



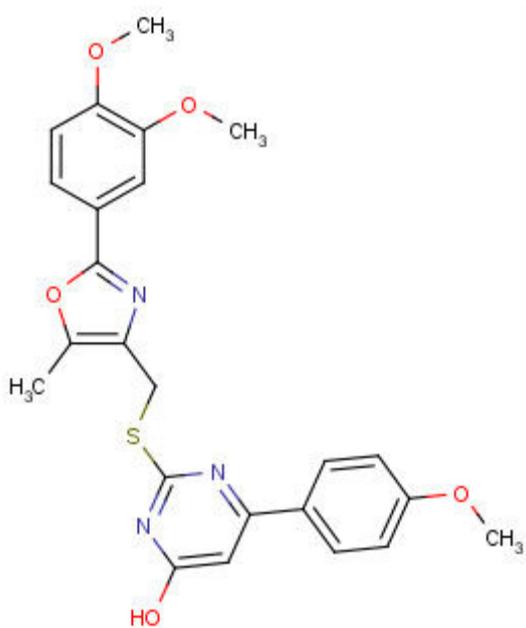
- F0876-0030



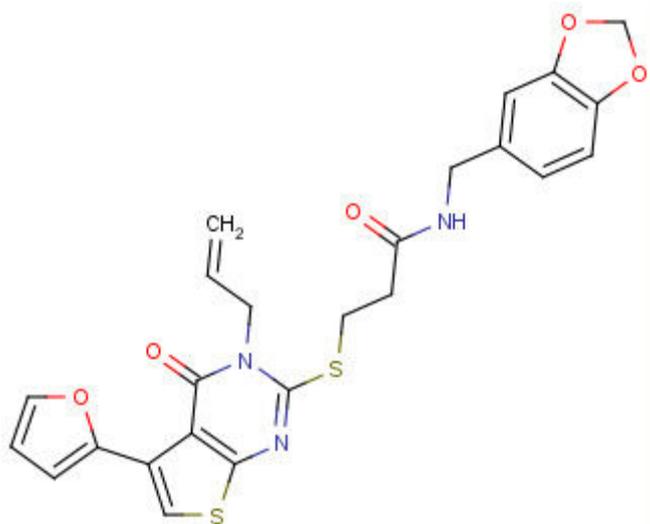
- F3307-0100



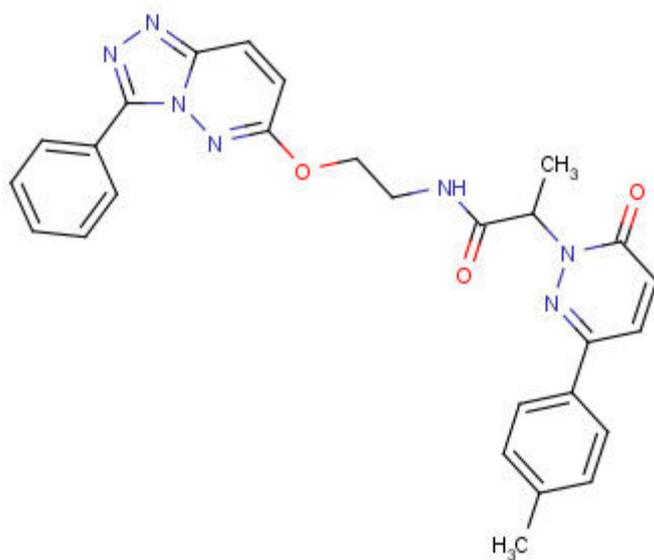
- **F3222-4930**



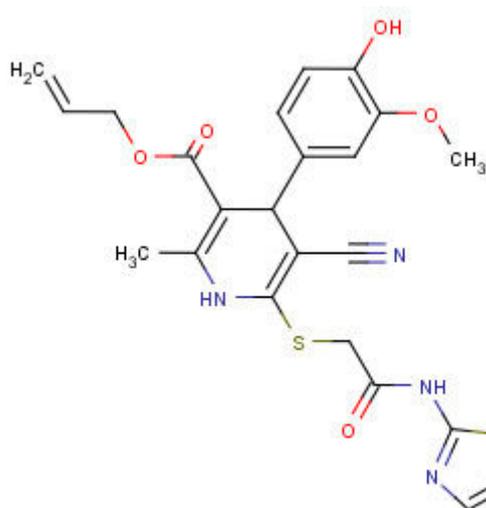
- **F3394-0412**



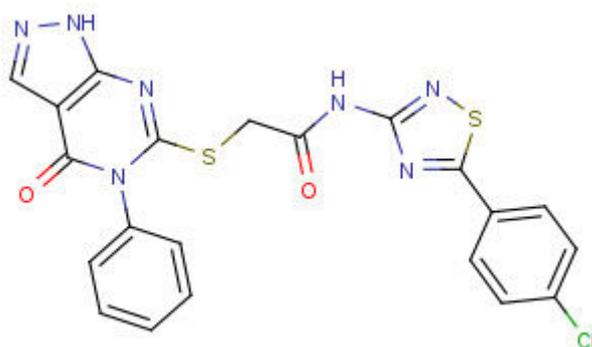
- **F5652-2782**



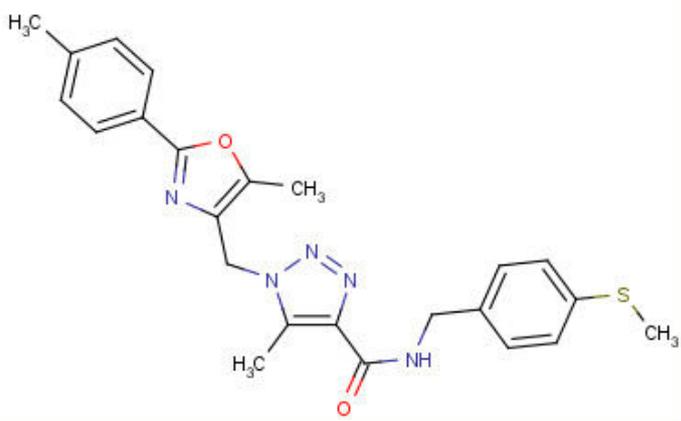
- **F1109-0100**



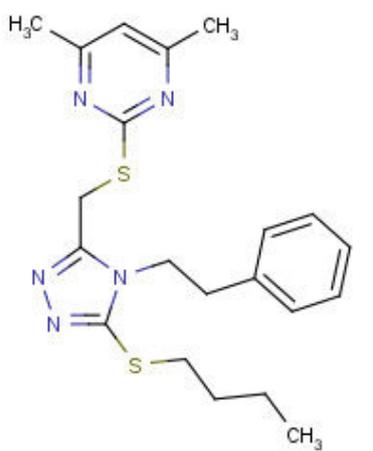
- **F3394-0585**



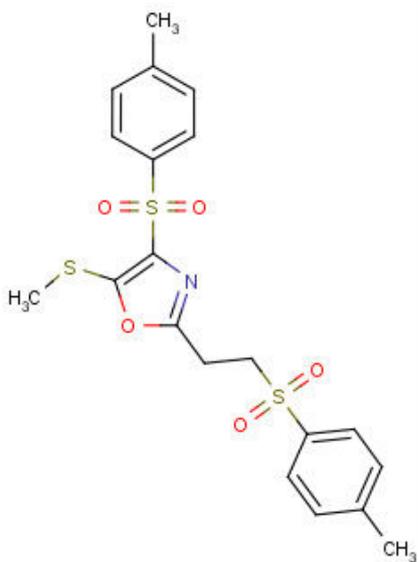
- **F3398-5211**



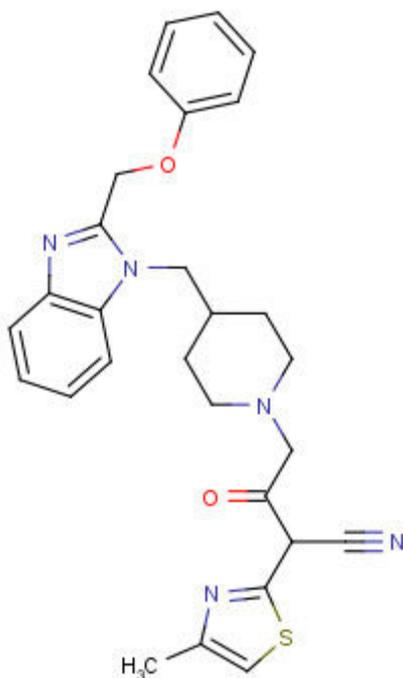
- **F1806-0122**



- **F3307-0033**



- **F5754-0452**



Os dois modelos construídos foram usados para realizar a varredura virtual de compostos depositados em bancos de dados, permitindo assim a seleção de moléculas que interagem com resíduos do sítio ativo das proteínas TRR1 e KRE2. No total, foram selecionadas 34 moléculas que interagem com KRE2 e 20 moléculas que interagem com TRR1. Um total de 22 moléculas do banco *Life Chemicals* foram sintetizadas e adquiridas, sendo que 7 delas apresentaram atividade antifúngica (3 que atuam provavelmente em TRR1 e 3 que atuam em KRE2) (**ver tópico 6.10 - Ensaio de atividade antifúngica *in vitro* - e Tabelas 5-8**).

O esquema de representações bidimensionais dos complexos proteína-ligante foram gerados pelo programa LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995), e uma inspeção visual das estruturas foi feita para verificar as interações que ocorrem entre os dois modelos e as principais moléculas selecionadas.

As **Figuras 15, 16 e 17** mostram as interações entre as moléculas F0876-0030, F1806-0122 e F3307-0100, respectivamente, e a proteína-alvo TRR1 nas 4 diferentes conformações. Já as **Figuras 18, 19, 20 e 21** mostram as interações entre as moléculas F0170-0365, F0266-4227, F0608-0758 e F5882-1949, respectivamente, e a proteína-alvo KRE2. Essas moléculas interagem com resíduos de aminoácido que fazem parte do sítio ativo das proteínas-alvo.

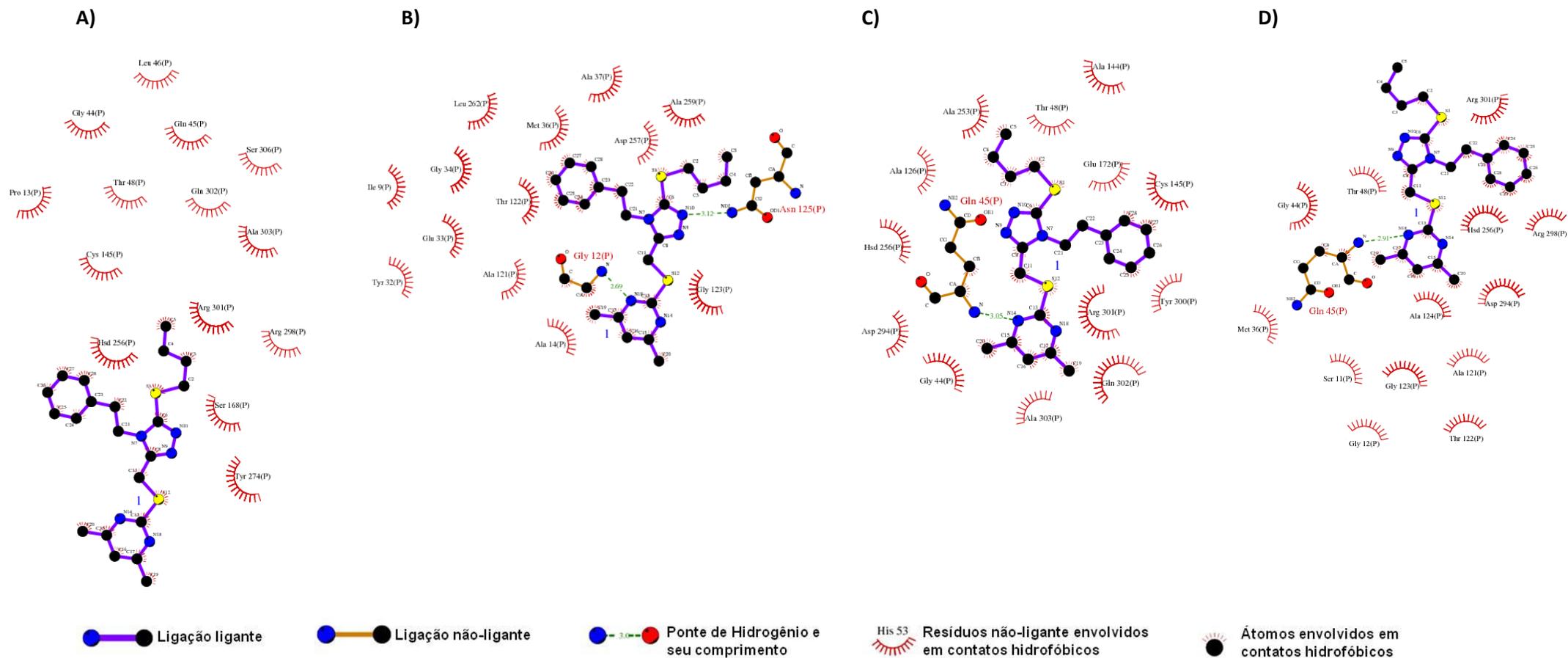


Figura 16. Diagrama das interações do complexo TRR1/F1806-0122 (*Life Chemicals*). A) TRR1 conformação 1. B) TRR1 conformação 2. C) TRR1 conformação 3. D) TRR1 conformação 4.

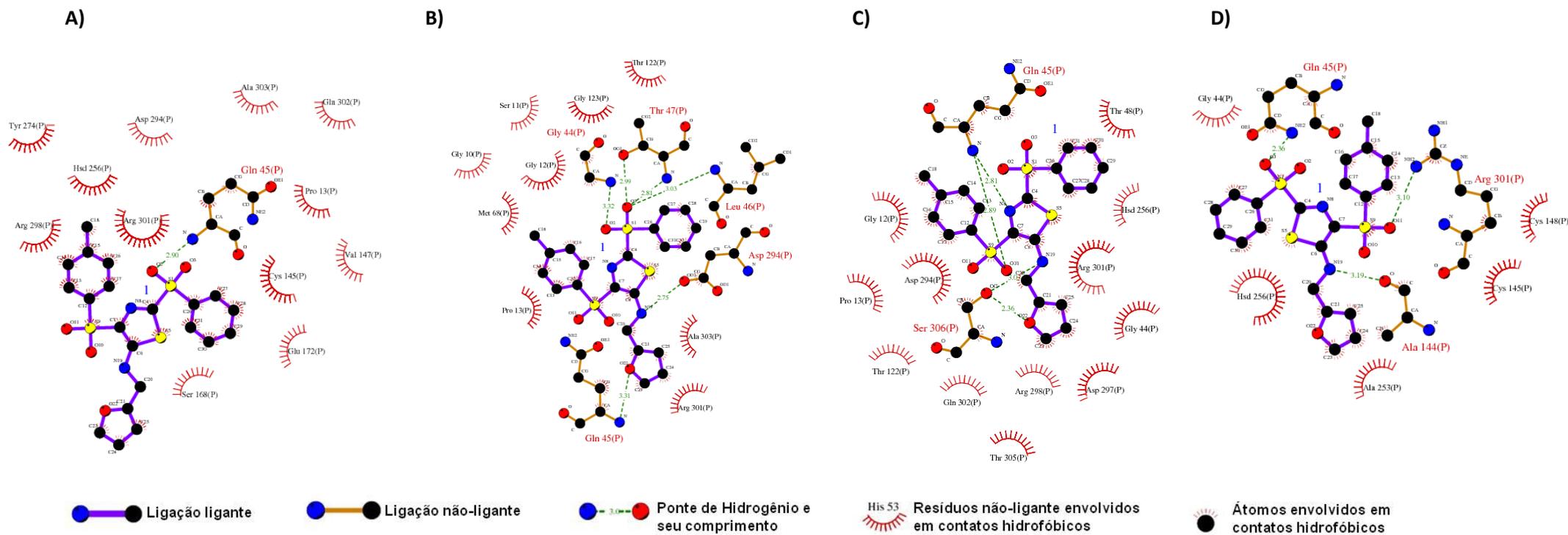


Figura 17. Diagrama das interações do complexo TRR1/F3307-0100 (*Life Chemicals*). A) TRR1 conformação 1. B) TRR1 conformação 2. C) TRR1 conformação 3. D) TRR1 conformação 4.

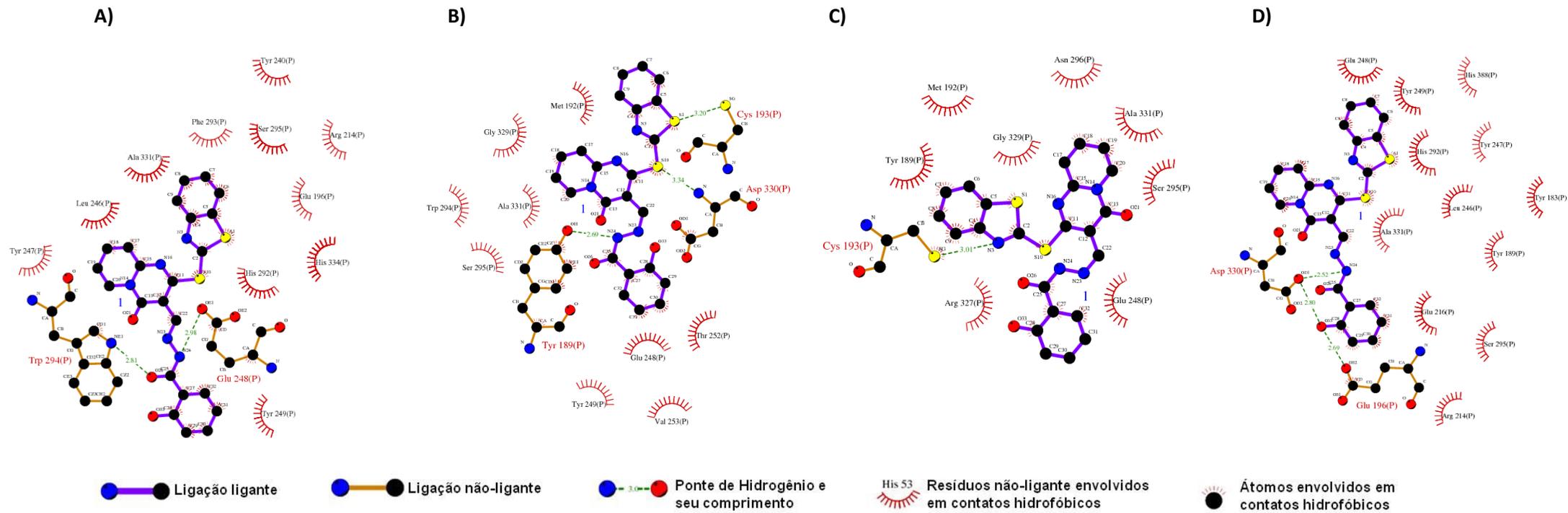


Figura 18. Diagrama das interações do complexo KRE2/FF0170-0365 (*Life Chemicals*). A) KRE2 conformação 1. B) KRE2 conformação 2. C) KRE2 conformação 3. D) KRE2 conformação 4.

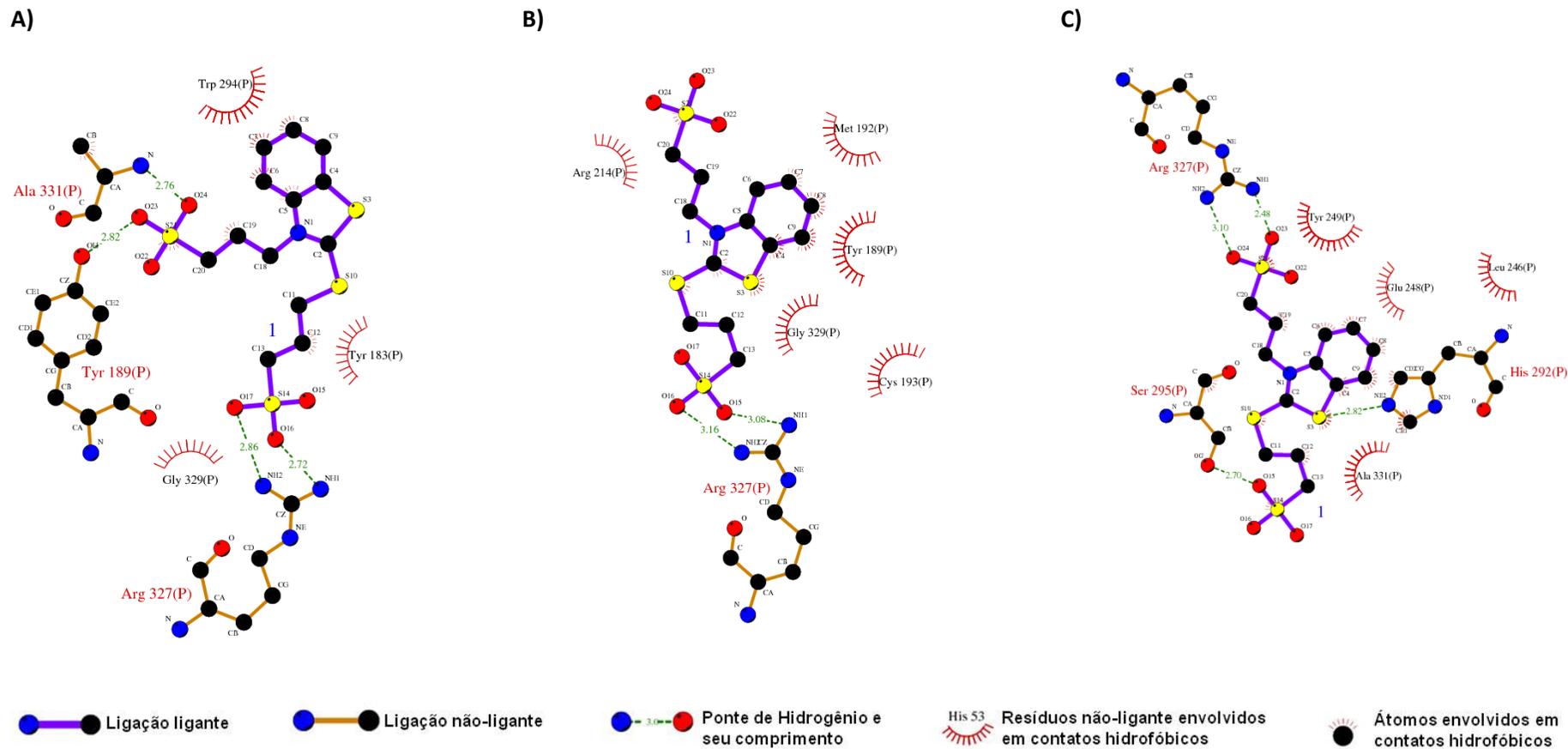


Figura 19. Diagrama das interações do complexo KRE2/F0266-4227 (*Life Chemicals*). A) KRE2 conformação 2. B) KRE2 conformação 3. C) KRE2 conformação 4. Observação: Não houve interação entre a molécula F0266-4227 e KRE2 conformação 1.

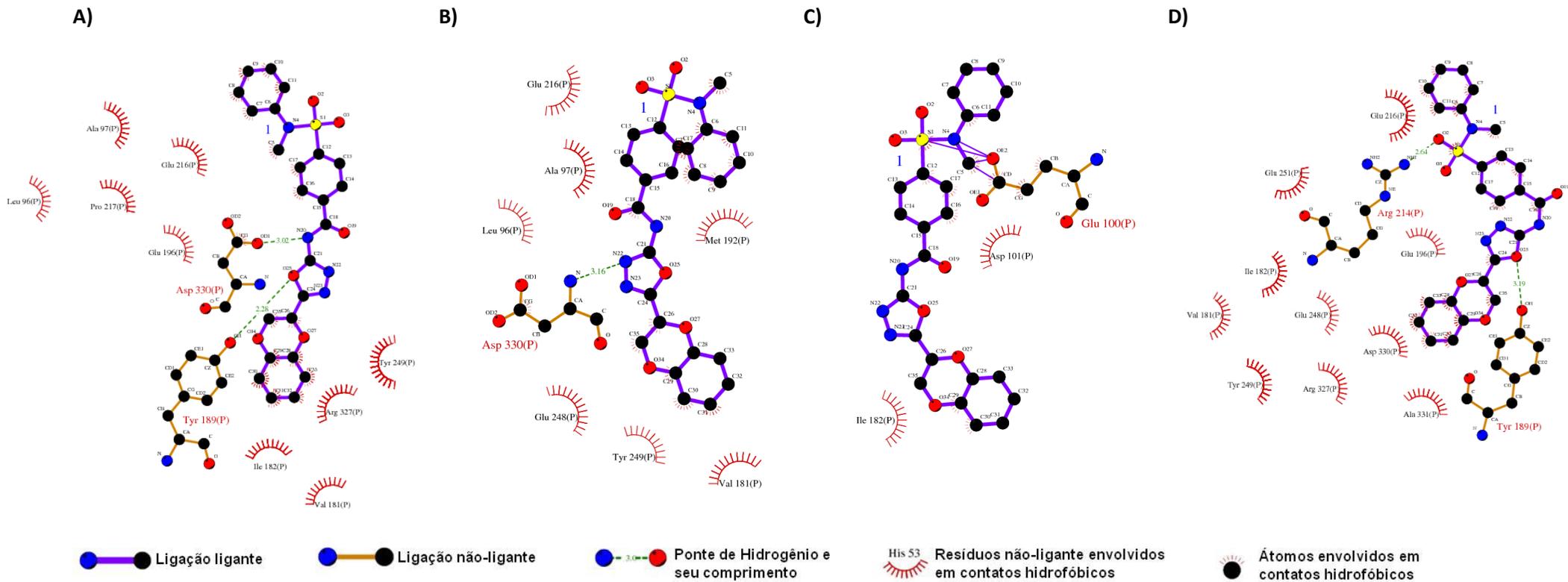


Figura 20. Diagrama das interações do complexo KRE2/F0608-0758 (*Life Chemicals*). A) KRE2 conformação 1. B) KRE2 conformação 2. C) KRE2 conformação 3. D) KRE2 conformação 4.

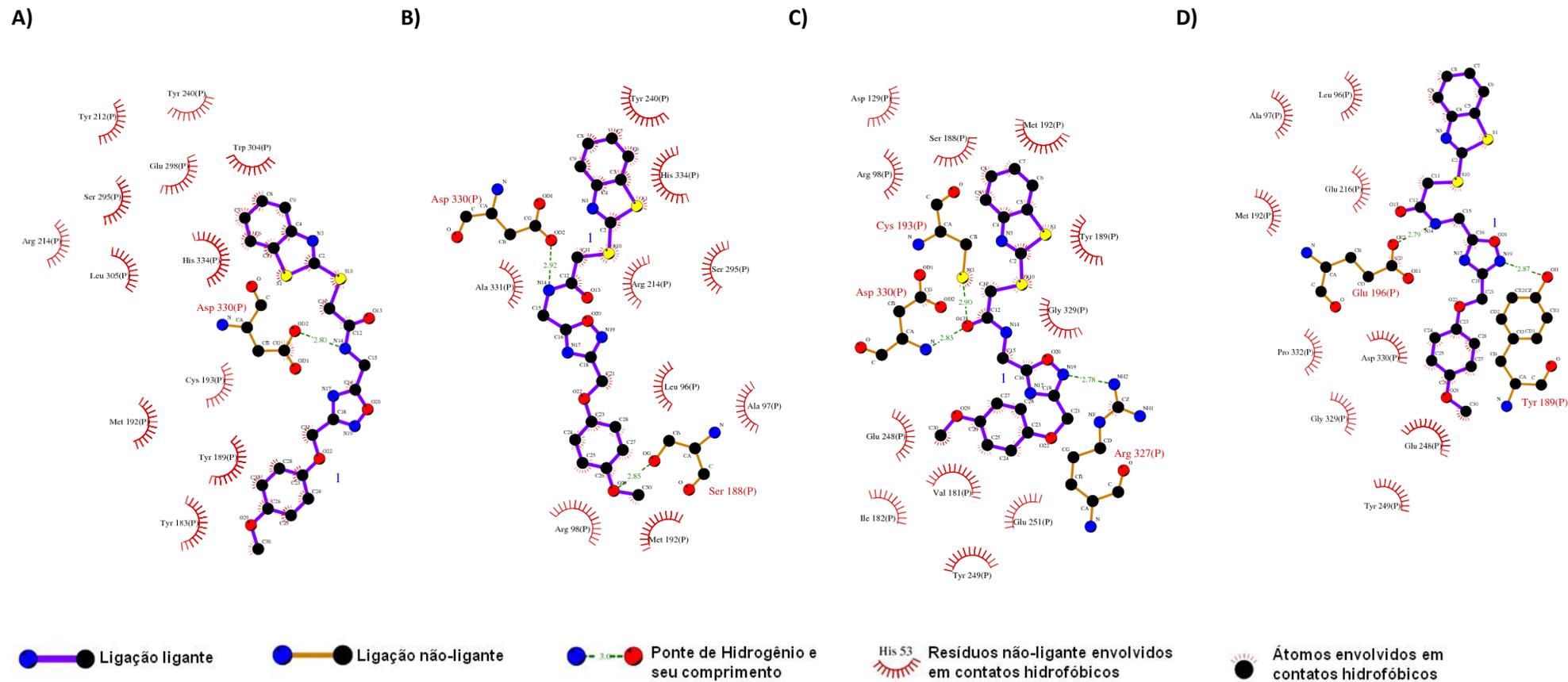


Figura 21. Diagrama das interações do complexo KRE2/F5882-1949 (*Life Chemicals*). A) KRE2 conformação 1. B) KRE2 conformação 2. C) KRE2 conformação 3. D) KRE2 conformação 4.

Um exemplo da aplicação do uso da varredura virtual de quimiotecas foi a descoberta de potenciais inibidores da aldose redutase, uma proteína que causa complicações crônicas da diabetes em humanos (Kraemer *et al.*, 2004). Apesar de um grande número 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 6 revelaram resultados satisfatórios.

Os processos de obtenção dos modelos protéicos TRR1 e KRE2 usando a estratégia da modelagem molecular por homologia, além da varredura virtual de quimiotecas para seleção de moléculas inibidoras, foram realizados na França, durante um doutorado sanduíche de 9 meses. Essa parte do projeto de doutorado foi feita no laboratório LORIA (*Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications*), na Universidade Henri Poincaré, Nancy I, em cooperação internacional com o Prof. Bernard Maigret, que vem utilizando as ferramentas de modelagem molecular e de varredura virtual com aplicação no desenho de novas drogas.

6.7) Expressão heteróloga dos genes-alvo selecionados em linhagens de *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

O gene *trr1* foi comercialmente sintetizado com códons preferenciais para *E. coli*, e clonado com sucesso no vetor pET21a na forma de um inserto contendo nas extremidades sítios para *NdeI-XhoI*. Entre o sítio de clonagem *XhoI* e o códon de parada da transcrição do gene (*stop codon*), há uma sequência de seis histidinas, permitindo que a proteína recombinante contenha uma cauda de poli-His na porção C-terminal. Essa sequência de seis histidinas facilita a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e detecção por western-blot (McCormick 1994; Mierendorf, 1994). A expressão da proteína TRR1 recombinante foi testada na linhagem de *E. coli* BL21 (λ DE3), com 0,5 mM de IPTG, a 37°C. Amostras da cultura de 3 clones, aleatoriamente selecionados, foram coletadas nos tempos de 0h e 6h de indução e analisadas por SDS-PAGE, e como observado na **Figura 22** foi possível identificar uma banda de aproximadamente 39kDa, correspondente a proteína recombinante. A massa molecular desta proteína foi consistente com estimada pelo programa Expasy.

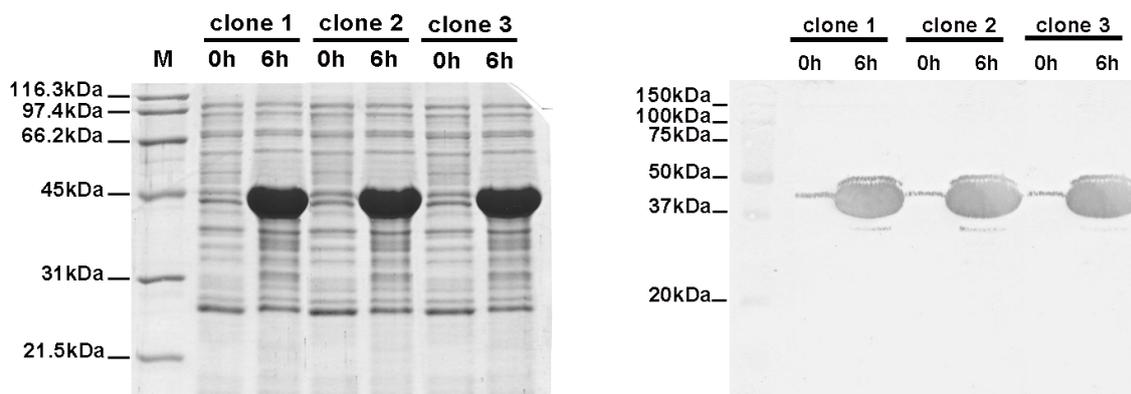


Figura 22. Análise da expressão da proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01) em três clones de *E. coli* BL21 (λ DE3) transformada. (A) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% após 6 horas de indução com IPTG (0,5mM). M) Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). (B) *western-blot* para confirmação da expressão da proteína TRR1 por três clones de *E. coli* BL21 (λ DE3). Marcador de massa proteica pré-corado *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (BIO-RAD).

A expressão heteróloga de TRR1 foi eficiente (25 mg/litro de cultura, calculado após realização de uma curva de indução em função do tempo), na fração solúvel do lisado bacteriano, sem formação de corpo de inclusão, desta forma facilitando a purificação e diminuindo as etapas do processo de purificação. O tempo de 16 horas (overnight) de indução foi o escolhido e padronizado para as purificações seguintes (**Figura 23**).

A TRR1 foi purificada por cromatografia de afinidade devido a mesma possuir uma cauda de histidina na sua extremidade. Esse método de purificação possui algumas vantagens, como a ligação específica e reversível da proteína-alvo na coluna de afinidade, além de alta seletividade e rendimento. Além disso, uma vantagem na adição dessa cauda é a fácil identificação da proteína por anticorpos anti-His em técnicas de imunoenensaio, como realizadas neste trabalho.

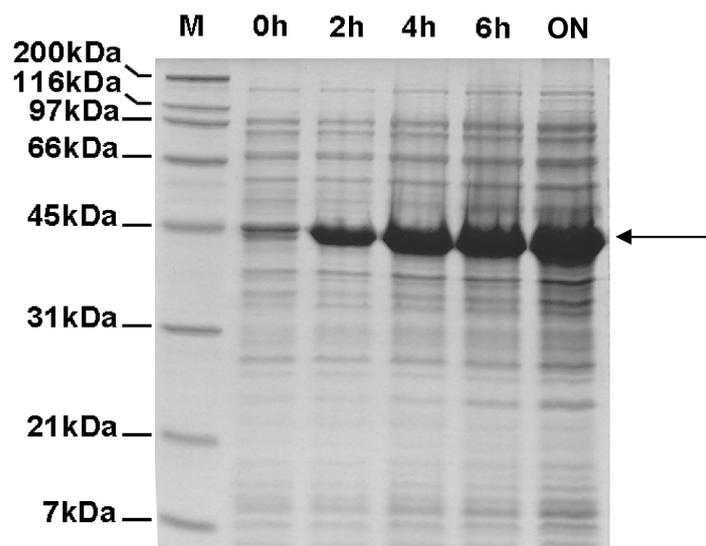


Figura 23. Análise da expressão da proteína TRR1 de *P. lutzii* (Pb01) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% ao longo do tempo de indução. A partir da adição do IPTG (0,5mM), foram coletadas alíquotas da cultura sob indução até o tempo de 16 horas (overnight - ON). A banda correspondente à proteína TRR1 está indicada por uma seta. M) Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

Como mostra a **Figura 24**, a purificação de TRR1 foi realizada com sucesso, obtendo um bom rendimento com alto grau de pureza. A proteína purificada se encontra, no momento, em fase de experimentos de cristalização para resolução da sua estrutura 3D, em colaboração com grupos da Universidade Católica de Brasília (UCB) e do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS). Pelos dados de modelagem, em princípio, a cauda de histidina não irá interferir na estrutura final da proteína se comparada com a nativa.

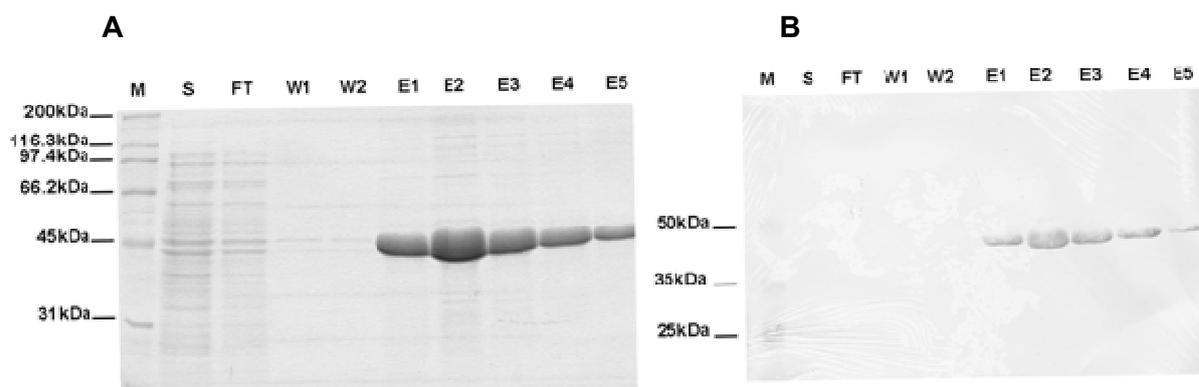
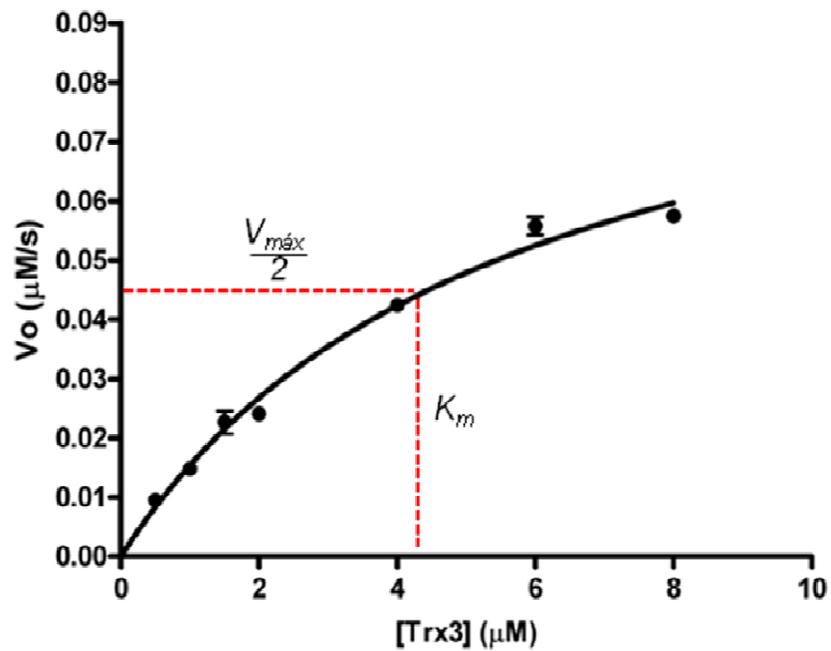


Figura 24. Análise da proteína TRR1 recombinante de *P. lutzii* (Pb01) purificada por cromatografia de afinidade, em coluna sepharose acoplada ao níquel da GE Healthcare. **A)** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. **B)** western-blot. (S) Fração solúvel do lisado de *E. coli* (BL21 λ DE3, PET21a::*trr1*) induzida com IPTG (0,5mM) por 16 horas, (FT) *Flow-through*. (W1 e W2) - Etapas de lavagem de 4 ml. (E1, E2, E3, E4 e E5) etapas de eluição, frações de 1 ml. Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). Observa-se nas etapas de eluição a presença de TRR1, banda de aproximadamente 39kDa.

6.8) Ensaio de atividade enzimática de TRR1 recombinante

Os estudos cinéticos da enzima tioredoxina redutase (TRR1) recombinante de *P. lutzii* (Pb01) foram realizados com o substrato tioredoxina de *S. cerevisiae* (Trx3). Isso foi possível pelo fato da proteína tioredoxina redutase de *P. lutzii* (Pb01) possuir 65% de identidade com a proteína tioredoxina redutase de *S. cerevisiae* (Tabela 3). Assim, apesar de não ter sido feito com o substrato enzimático obtido do mesmo organismo, esses ensaios possibilitaram avaliar a atividade enzimática da TRR1 de *P. lutzii* (Pb01) utilizando como substrato a Trx3 de *S. cerevisiae*. Os ensaios enzimáticos para determinação dos parâmetros cinéticos basearam-se na redução de DTNB gerando TNB (Arnér et al., 1999; Oliveira et al., 2010). Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram determinados variando a concentração de Trx3 de 0,5 a 8,0 μM (Figura 25), traçando o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk. Assim, a curva de atividade da enzima foi monitorada pela formação de TNB, para diferentes concentrações do substrato Trx3. Os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram 0,088 $\mu\text{M/s}$ e 4,12 μM . A velocidade de reação aumentou gradualmente à medida que a concentração de substrato aumenta, mostrando assim a capacidade da tioredoxina redutase em reduzir Trx3. No ensaio de atividade enzimática de TrxR1 sobre Trx3 de *S. cerevisiae* (Oliveira et al., 2010), o valor de K_m foi 1,1. Como esperado, o valor de K_m obtido no presente trabalho foi maior (4,12 μM) demonstrando que TRR1 de *P. lutzii* (isolado 01) tem uma menor afinidade pela Trx3 de *S. cerevisiae*.

A



B

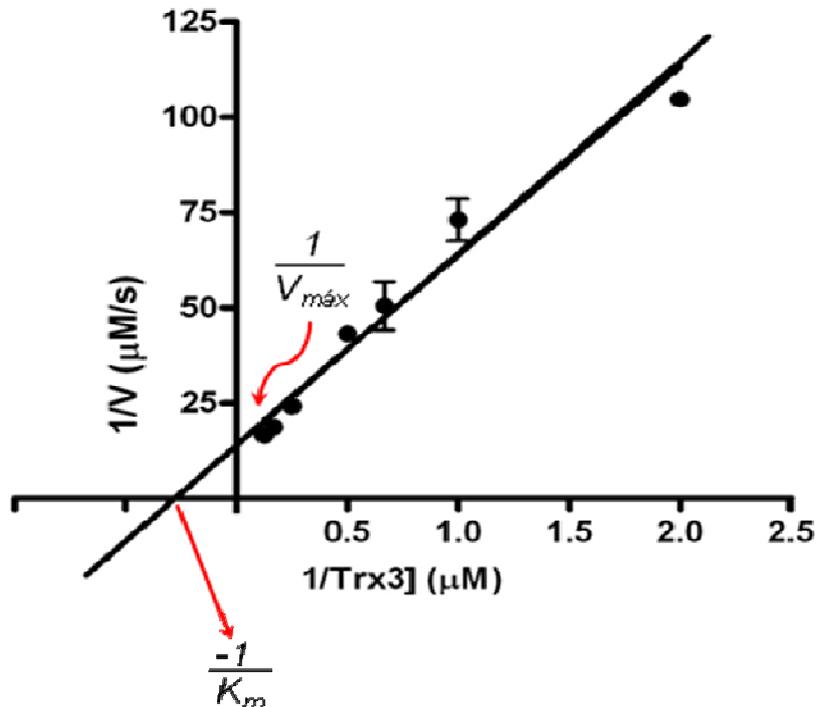


Figura 25. Determinação do K_m e $V_{\text{máx}}$ da enzima tioredoxina redutase recombinante de *P. lutzii* (Pb01) para o substrato Trx3 de *S. cerevisiae* (A) e duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (B). O K_m é a concentração do substrato (μM) na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima. $K_m = 4,12 \mu\text{M}$, $V_{\text{máx}} = 0,088 \mu\text{M/s}$, $K_{\text{cat}} = 46,71 \text{ s}^{-1}$

S. cerevisiae possui duas enzimas (isoformas) tioredoxina redutase localizadas em diferentes compartimentos, uma citosólica (TrxR1) e outra mitocondrial (TrxR2), e três tioredoxinas, duas citosólicas (Trx1 e Trx2) e uma mitocondrial (Trx3) (Zhang *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Trx1 e Trx2 de *S. cerevisiae* 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). Os autores demonstraram que TrxR1 citosólica é capaz de reduzir as três tioredoxinas, Trx1, Trx2 e Trx3 de *S. cerevisiae* com eficiência. Além disso, foi verificada a presença de *loops* na enzima tioredoxina importantes para a interação proteína-proteína. Análises estruturais de Trx1 e Trx2 de *S. cerevisiae* mostraram que essas enzimas possuem 3 *loops* altamente flexíveis, *loop* 1 (SGDK), *loop* 2 (ATWCGPCK) e *loop* 3 (AEVSSMP), que também podem estar envolvidos em sua interação com tioredoxina redutase (Amorim *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2008). O motivo conservado presente na sequência de resíduos de aminoácidos do *loop* 2, contendo os resíduos de cisteína que fazem parte do sítio catalítico, é conservado em todas as tioredoxinas de *S. cerevisiae* (Oliveira *et al.*, 2010), inclusive nas sequências de *P. lutzii* (isolado 01) e de *P. brasiliensis* (isolados 03 e 18). Apesar da interação entre a tioredoxina redutase e a tioredoxina ser espécie-específica, a conservação do *loop* 2 entre as tioredoxinas desses fungos pode explicar os resultados obtidos na realização dos ensaios de atividade de TRR1 de *P. lutzii* (isolado 01).

Foi realizada uma busca por ortólogos no genoma de *P. lutzii* (isolado 01) e *P. brasiliensis* (isolados 3 e 18), e foi constatada a presença de apenas uma TRR1 citosólica e duas tioredoxinas (Trx1 ou Trx2, Trx3 ortólogos de *S. cerevisiae*) nos genomas destes fungos. Não foi possível definir qual tioredoxina citosólica (Trx1 ou Trx2) está presente em *P. lutzii* (isolado 01) e *P. brasiliensis* (isolados 3 e 18). O alinhamento das sequências proteicas das tioredoxinas, Trx1, Trx2 e Trx3, gerou os dados filogenéticos possibilitando relacionar as sequências de *Paracoccidioides* com os ortólogos (**Figura 26**). A árvore filogenética mostrou a relação evolucionária de Trx no gênero *Paracoccidioides spp.* separando em diferentes grupos.

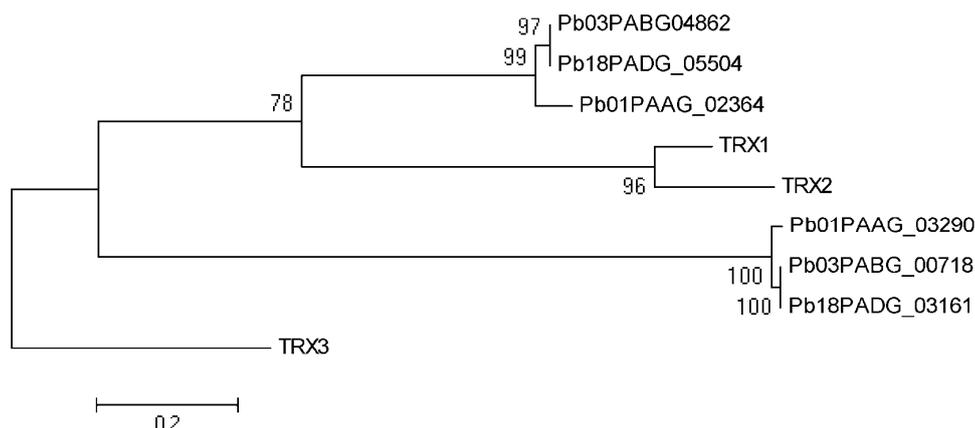


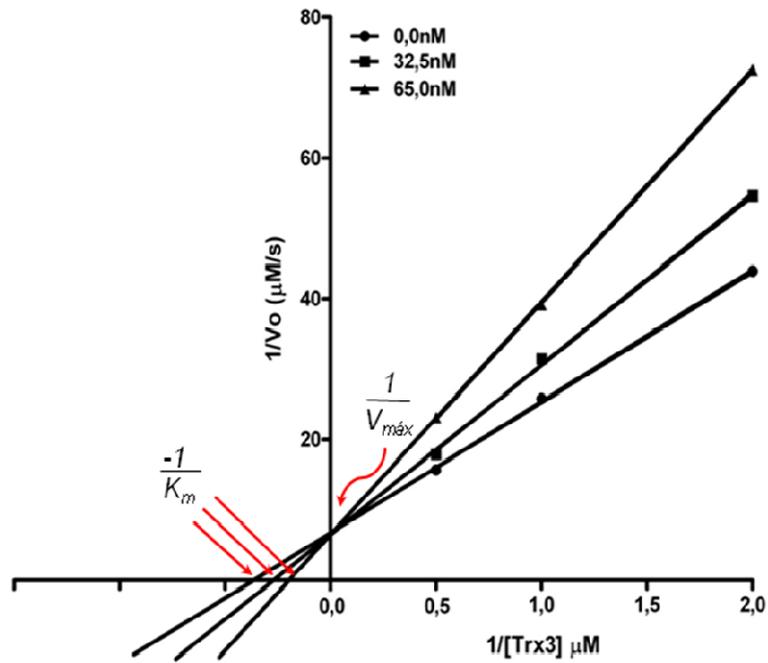
Figura 26. Análise filogenética entre fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. realizada por análise Bayesiana. Árvore filogenética do gene *trx3*. Pb01: *P. lutzii* (Pb01), Pb03: *P. brasiliensis* (Pb3), Pb18: *P. brasiliensis* (Pb18).

6.9) Ensaio de inibição da atividade de TRR1 recombinante

As moléculas inibidoras F0876-0030, F1806-0122 e F3307-0100 fazem parte das 22 moléculas do banco *Life Chemicals* que interagem com TRR1 e foram selecionadas para realizar os ensaios de inibição da atividade enzimática de TRR1 por apresentarem atividade antifúngica *in vitro* no gênero *Paracoccidioides* e com MIC menor em espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (ver tópico a seguir e Tabelas 5-8).

Os testes de inibição a partir dos ensaios de cinética enzimática da enzima purificada tioredoxina redutase foram realizados com Trx3 nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 μ M. Além disso, os inibidores testados apresentavam as seguintes concentrações: 32,5 e 65 nM (F0876-0030), 155 e 310 nM (F1806-0122) e 32,5 e 65 nM (F3307-0100). As reações foram realizadas na presença e na ausência de inibidor. Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram determinados a partir da equação de Michaelis-Menten e duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para ambas as condições (presença e ausência de inibidor). O ensaio com o inibidor F3307-0100 não pode ser considerado, ocorreu uma turbidez da solução e isso interferiu na leitura da absorbância a 412nm, impossibilitando assim a conclusão dos ensaios de inibição com essa molécula. Modificações no protocolo serão feitas e os ensaios com esse inibidor serão realizados em experimentos futuros. O perfil de inibição mostrado pela representação gráfica de Lineweaver-Burk (**Figura 27**) permitiu avaliar o tipo de inibição dos compostos F0876-0030 e F1806-0122, ambos inibem de maneira competitiva interagindo com o sítio ativo do substrato Trx3.

A



B

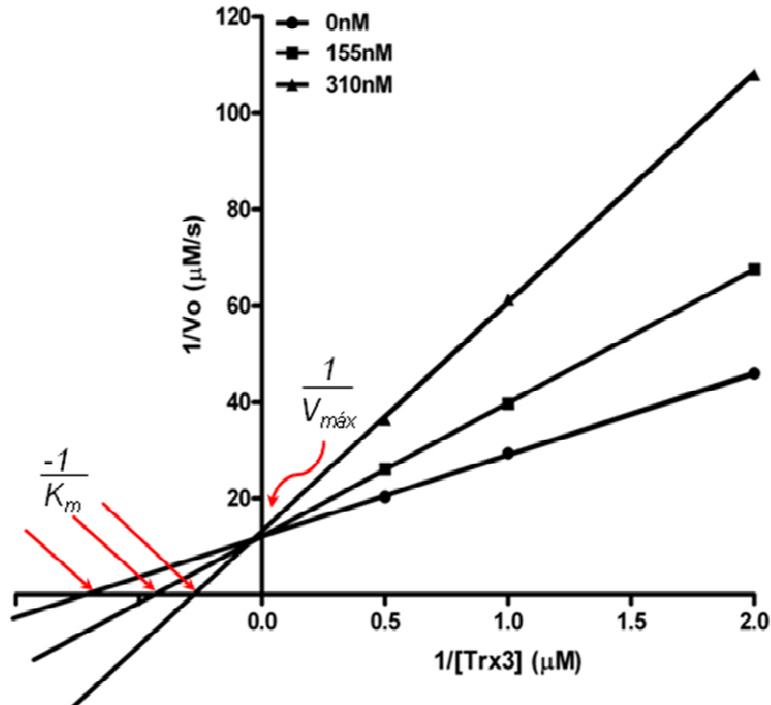


Figura 27. Representação gráfica de Lineweaver-Burk mostrando o perfil de inibição da enzima tioredoxina redutase recombinante de *P. lutzii* (Pb01) pelos compostos F0876-0030 e F1806-0122. Inibição competitiva pelos compostos F0876-0030 (A) e F1806-0122 (B). O gráfico está expresso como $1/V_o$ versus $1/[\text{Trx3}]$ (μM) na presença e ausência de inibidor (nM).

No estudo de cinética enzimática para os compostos F0876-0030 e F1806-0122 foi verificado que o valor de $V_{m\acute{a}x}$ não varia, enquanto que o valor de K_m aumenta (**Figura 27 A,B**). Isso indica que esses compostos realizam uma inibição reversível competitiva. No caso dos inibidores testados, os valores de K_i são: 298,8 nM (composto F0876-0030) e 204,6 nM (composto F1806-0122). Considerando uma concentração de 0,5 μ M do substrato Trx3, a porcentagem de inibição da tioredoxina redutase pela droga F0876-0030 a 32,5 nM foi de 14% e a 65 nM foi de 35,2%. Já a porcentagem de inibição da tioredoxina redutase pela droga F1806-0122 a 155 nM foi de 30% e a 310 nM foi de 56%, apresentando assim valor de IC_{50} próximo de 310 nM. A partir desses resultados foi possível identificar uma maior eficiência da molécula F0876-0030 em inibir a atividade de TRR1. Ensaios de inibição da atividade enzimática da tioredoxina redutase do protozoário *Plasmodium falciparum* com inibidores específicos, mostraram que o inibidor mais potente apresenta IC_{50} de 500 nM (Andricopulo et al., 2006). Esses resultados indicam que as moléculas F0876-0030 e F1806-0122 inibem diretamente a enzima tioredoxina redutase (TRR1) de *P. lutzii* (Pb01).

A avaliação *in silico* de um candidato a novo fármaco é uma proposição baseada em inferências, isto é, na analogia com compostos já existentes nos quais se possam inferir similaridades. Entende-se que a cooperação entre a predição teórica e a execução experimental contribui para a otimização das pesquisas na área. Este é um importante avanço na metodologia de pesquisa na química moderna que tem acrescentado aos pesquisadores mais ferramentas nas investigações e avaliações de resultados.

Recentemente, foram identificadas moléculas *drug-like* inibidoras da proteína dolicol fosfato manose sintase de *Trypanosoma brucei* para serem usadas no tratamento da doença do sono na África (Smith et al., 2009). Estes inibidores impedem a biossíntese de glicosilfosfatidilinositol, apresentando atividade tripanocida. 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 cinco potenciais compostos inibidores desse patógeno. Inibidores da proteína SecA de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, que causa uma doença em citrus, foram identificados por varredura virtual de quimiotecas e

apresentam capacidade de inibição com eficiência no crescimento deste patógeno (Akula *et al.*, 2011).

6.10) Ensaios de atividade antifúngica *in vitro*

As moléculas selecionadas pela varredura virtual que interagem com as proteínas TRR1 e KRE2 foram utilizadas em ensaios *in vitro* para avaliação da atividade antifúngica como inibidores. Vinte e duas moléculas do banco *Life Chemicals* foram adquiridas comercialmente e testadas contra *P. lutzii* (Pb01), 2 isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265), *C. albicans* (ATCC 90028), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. neoformans* (H99). O protocolo utilizado foi o de microdiluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras aos compostos inibidores. As concentrações mínimas inibitórias do crescimento dos patógenos em 50% e/ou 80% foram avaliadas pelos ensaios de MIC.

Como observado nas **Tabelas 5-8**, das 22 moléculas testadas 7 apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra pelo menos 3 fungos patogênicos. Quatro moléculas: F0170-0365, F0266-4227, F0608-0758 e F5882-1949 selecionadas por interagir com KRE2 no *docking* virtual e, três moléculas: F0876-0030, F1806-0122 e F3307-0100, selecionadas por interagir com TRR1.

As moléculas F0876-0030 e F1806-0122 interagem com a enzima TRR1 e inibem o crescimento de fungos do gênero *Paracoccidioides* spp. nas concentrações de 130 μ M (64 μ g/mL) e 19 μ M (8 μ g/mL) (MIC₅₀), respectivamente. Desta forma, nos ensaios *in vitro*, a molécula F1806-0122 apresenta melhor atividade antifúngica. Por outro lado, os resultados obtidos nos ensaios de inibição da atividade enzimática da TRR1 com estes inibidores (**Figura 27**), mostram que F0876-0030 é mais eficiente. Esses resultados não concordantes podem ser devido a estrutura química da molécula e de suas interações com a célula fúngica, dificultando o acesso da droga ao alvo molecular. Portanto, a parede celular, por exemplo, pode se comportar como uma barreira para entrada da molécula F1806-0122 na célula, este fato explicaria os valores de MIC maiores para essa molécula.

Em espécies de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, apenas uma molécula apresentou atividade, a F0608-0758, com concentração mínima inibitória (MIC₅₀) de 129 μ M (64 μ g/mL). Para o patógeno *C. neoformans* a melhor droga (F0608-0758) apresentou um MIC₅₀<101 μ M (50 μ g/mL) em experimentos iniciais que ainda serão repetidos para a determinação exata. Os MICs para o gênero *Paracoccidioides* foram menores do que para os outros fungos patogênicos, o que pode ser

consequência do uso da sequência TRR1 do *P. lutzii* para a modelagem molecular e os ensaios de *docking* das drogas. Projetos envolvendo a modelagem das sequências de *Candida* e *Cryptococcus* estão em andamento em nosso grupo. Os testes de plaqueamento dos patógenos após a leitura dos MICs, a fim de verificar se estas drogas possuem atividade fungicida ou fungistática, mostrou que para os fungos *Candida spp* e *C. neoformans* a melhor das drogas (F0608-0758) foi fungistática. Este teste não foi ainda realizado para o gênero *Paracoccidioides*.

De forma geral, as moléculas que apresentaram melhor atividade antifúngica foram F0608-0758 (KRE2) e F1806-0122 (TRR1), nas concentrações de 2µM (1µg/mL) e 19µM (8µg/mL) (MIC₅₀), respectivamente, foram capazes de inibir o crescimento de fungos do gênero *Paracoccidioides spp*, enquanto a anfotericina B e o fluconazol, drogas de referência, alcançaram os menores valores de 0,54µM (0,5µg/mL) e 0,8µM (0,25µg/mL) (MIC₅₀), respectivamente. A partir desses resultados, foi possível comparar a eficiência antifúngica entre as moléculas testadas e as drogas de referência anfotericina B e o fluconazol, verificando que, apesar das drogas de referência apresentarem os menores valores de MIC, verifica-se que as moléculas F0608-0758 e F1806-0122 apresentam grande eficiência antifúngica. De Vita e cols. (2012), por modificação da estrutura química e síntese de derivados de 2-(1H-imidazol-1-yl)-1-feniletanol, verificaram uma melhor atividade antifúngica de alguns derivados contra *C. albicans* e espécies não-*albicans*. A esterificação de alguns grupos químicos deu origem a compostos mais ativos, com baixos valores de MIC₅₀ (1µg/mL). A maior eficiência desses derivados mostra que as modificações na estrutura química de compostos podem ser exploradas para aumentar sua eficiência antifúngica. Ainda serão realizadas modificações na estrutura química das moléculas F0608-0758 e F1806-0122 visando um aumento da eficiência antifúngica contra os fungos analisados no presente trabalho, o que poderá levar ao desenvolvimento de drogas mais eficientes para o tratamento de infecções fúngicas.

Tabela 5. Atividade antifúngica (μM) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo TRR1

Molécula	<i>P. lutzi</i> (Pb01)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb265)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)			<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)			<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)			<i>Cryptococcus neoformans</i> (H99)	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F0876-0030	130	260	260	260	260	260	>260	>260	ND	>260	>260	ND	>260	>260	ND	>260	>260
F1109-0100	>517	>517	>517	>517	>517	>517	>517	>517	ND	>517	>517	ND	>517	>517	ND	>517	>517
F1806-0122	19	19	38,6	38,6	38,6	77,3	>619	>619	ND	>619	>619	ND	>619	>619	ND	>619	>619
F3010-0057	>551	>551	>551	>551	>551	>551	>551	>551	ND	>551	>551	ND	>551	>551	ND	>551	>551
F3222-4930	>550	>550	>550	>550	>550	>550	>550	>550	ND	>550	>550	ND	>550	>550	ND	>550	>550
F3307-0033	>566	>566	>566	>566	>566	>566	>566	>566	ND	>566	>566	ND	>566	>566	ND	>566	>566
F3307-0100	16,8	33,7	33,7	33,7	33,7	33,7	>539	>539	ND	>539	>539	ND	>539	>539	ND	>539	>539
F3394-0412	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516
F3394-0585	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516
F3398-5211	>572	>572	>572	>572	>572	>572	>572	>572	ND	>572	>572	ND	>572	>572	ND	>572	>572
F5652-2782	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	ND	>516	>516	ND	516	>516	ND	>516	>516
F5754-0452	>434	>434	>434	>434	>434	>434	>434	>434	ND	>434	>434	ND	>434	>434	ND	>434	>434
Anfotericina B	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,27	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	2,1	4,2
Fluconazol	0,8	1,6	1,6	3,2	1,6	3,2	1,6	>51,2	ND	6,4	12,8	ND	12,8	51,2	ND	ND	ND

ND (não determinado). MIC₅₀, MIC₈₀ e MFC₉₀ indicado em μM

Em vermelho – moléculas que foram testadas como inibidoras para a enzima TRR1 recombinante purificada

Tabela 6. Atividade antifúngica ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo TRR1

Molécula	<i>P. lutzii</i> (Pb01)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb265)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)			<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)			<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)			<i>Cryptococcus neoformans</i> (H99)	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F0876-0030	64	128	128	128	128	128	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F1109-0100	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F1806-0122	8,0	8,0	16	16	16	32	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3010-0057	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3222-4930	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3307-0033	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3307-0100	8,0	16	64	64	64	64	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3394-0412	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3394-0585	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3398-5211	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5652-2782	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5754-0452	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
Anfotericina B	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	4,0
Fluconazol	0,25	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	>16	ND	2,0	4,0	ND	4,0	16	ND	ND	ND

ND (não determinado). MIC₅₀, MIC₈₀ e MFC₉₀ indicado em $\mu\text{g/mL}$

Em vermelho – moléculas que foram testadas como inibidoras para a enzima TRR1 recombinante purificada

Tabela 7. Atividade antifúngica (μM) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo KRE2

Molécula	<i>P. lutzi</i> (Pb01)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb265)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)			<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)			<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)			<i>Cryptococcus neoformans</i> (H99)	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F0170-0365	135	270	270	270	270	270	>540	>540	ND	>540	>540	ND	>540	>540	ND	316	422
F0266-4227	155	311	311	622	311	622	>622	>622	ND	>622	>622	ND	>622	>622	ND	>622	>622
F0608-0758	16,2	32,4	2,0	4,0	4,0	8,1	129	129	129	129	259	259	129	259	259	<101	<101
F1109-0100	>517	>517	>517	>517	>517	>517	>517	>517	ND	>517	>517	ND	>517	>517	ND	>517	>517
F2252-0157	>539	>539	>539	>539	>539	>539	>539	>539	ND	>539	>539	ND	>539	>539	ND	>539	>539
F3010-0057	>551	>551	>551	>551	>551	>551	>551	>551	ND	>551	>551	ND	>551	>551	ND	>551	>551
F3222-5837	>513	>513	>513	>513	>513	>513	>513	>513	ND	>513	>513	ND	>513	>513	ND	>101 e <200	>101 e <200
F3263-0059	>632	>632	>632	>632	>632	>632	>632	>632	ND	>632	>632	ND	>632	>632	ND	>632	>632
F3394-0412	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516
F3394-0585	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516	ND	>516	>516
F3398-5211	>572	>572	>572	>572	>572	>572	>572	>572	ND	>572	>572	ND	>572	>572	ND	>572	>572
F5008-0377	>590	>590	>590	>590	>590	>590	>590	>590	ND	>590	>590	ND	>590	>590	ND	>590	>590
F5226-2261	>573	>573	>573	>573	>573	>573	>573	>573	ND	>573	>573	ND	>573	>573	ND	>573	>573
F5652-2782	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	>516	ND	>516	>516	ND	516	>516	ND	>516	>516
F5754-0452	>434	>434	>434	>434	>434	>434	>434	>434	ND	>434	>434	ND	>434	>434	ND	>434	>434
F5882-1949	289	289	289	>578	578	>578	>578	>578	ND	>578	>578	ND	>578	>578	ND	>578	>578
F5912-0731	>538	>538	>538	>538	>538	>538	>538	>538	ND	>538	>538	ND	>538	>538	ND	>538	>538
Anfotericina B	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,27	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	2,1	4,2
Fluconazol	0,8	1,6	1,6	3,2	1,6	3,2	1,6	>51,2	ND	6,4	12,8	ND	12,8	51,2	ND	ND	ND

ND (não determinado). MIC₅₀, MIC₈₀ e MFC₉₀ indicado em μM

Em vermelho – molécula com menor MIC para o gênero *Paracoccidioides*

Tabela 8. Atividade antifúngica ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* das moléculas do banco *Life Chemicals* que atuam sobre o alvo KRE2

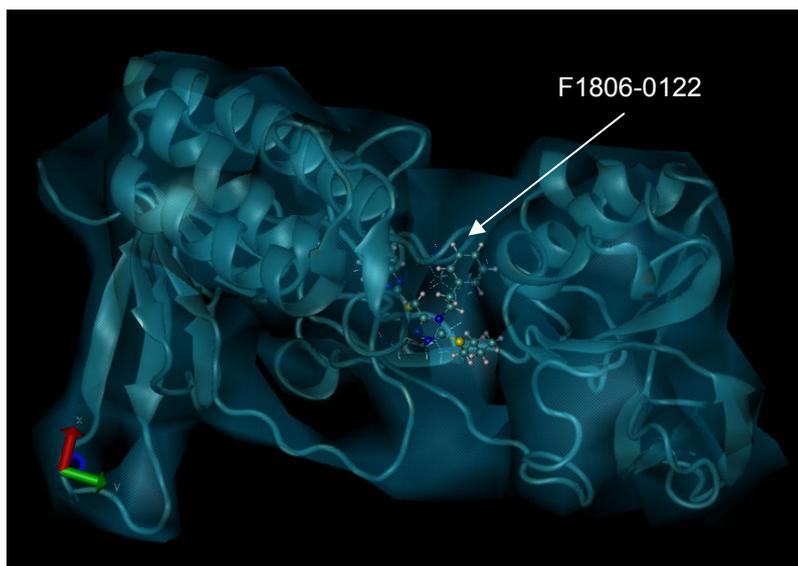
Molécula	<i>P. lutzii</i> (Pb01)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb18)		<i>P. brasiliensis</i> (Pb265)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)			<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)			<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)			<i>Cryptococcus neoformans</i> (H99)	
	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀	MFC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₈₀
F0170-0365	64	128	128	128	128	128	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	150	200
F0266-4227	64	128	128	256	128	256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F0608-0758	8,0	16	1,0	2,0	2,0	4,0	64	64	64	64	128	128	64	128	128	<50	<50
F1109-0100	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F2252-0157	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3010-0057	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3222-5837	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>50 e <100	>50 e <100
F3263-0059	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3394-0412	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3394-0585	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F3398-5211	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5008-0377	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5226-2261	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5652-2782	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5754-0452	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5882-1949	128	128	128	>256	256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
F5912-0731	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256	ND	>256	>256
Anfotericina B	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	4,0
Fluconazol	0,25	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	>16	ND	2,0	4,0	ND	4,0	16	ND	ND	ND

ND (não determinado). MIC₅₀, MIC₈₀ e MFC₉₀ indicado em $\mu\text{g/mL}$

Em vermelho – molécula com menor MIC para o gênero *Paracoccidioides*

A **Figura 28** mostra a molécula F1806-0122 **(A)** ancorada no sítio catalítico da proteína TRR1 e a molécula F0608-0758 **(B)** ancorada no sítio catalítico da proteína KRE2. É possível visualizar as moléculas em contato com a proteína nas cavidades onde ocorre a atividade enzimática. Juntamente com os resultados de atividade antifúngica em cultura, essas imagens confirmam a interação que ocorre entre esses inibidores e as proteínas-alvo.

A)



B)

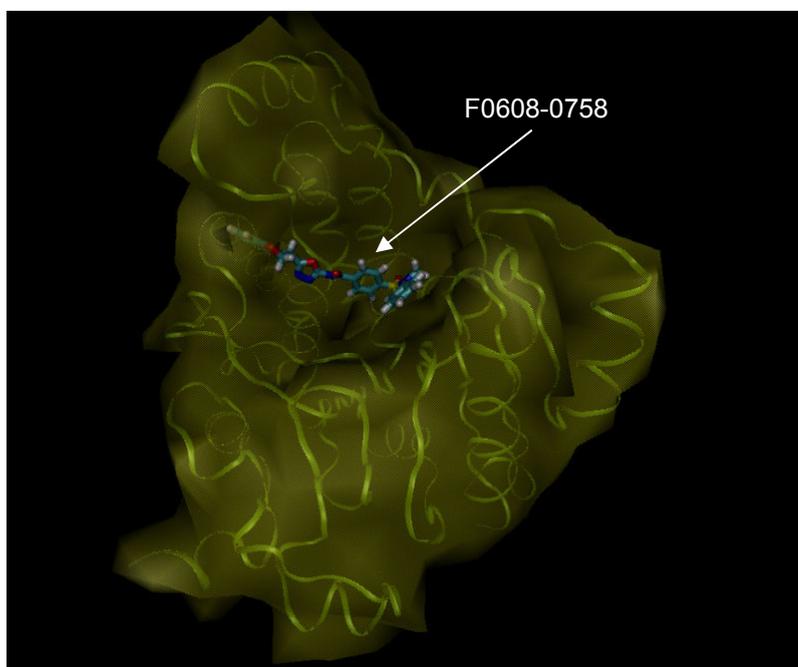


Figura 28. Moléculas do banco *Life Chemicals* ancoradas no sítio catalítico das proteínas-alvo. (A) Trr1 de *P. lutzii* interagindo com a molécula F1806-0122. (B) KRE2 de *P. lutzii* interagindo com a molécula F0608-0758. Imagens obtidas pelo programa VMD.

Os ensaios de atividade antifúngica dos compostos selecionados no banco de dados *Chimiotèque Nationale* serão realizados em experimentos futuros. Os valores das concentrações mínimas inibitórias melhores, quando testadas em fungos de gênero *Paracoccidioides* spp. , corroboram os dados de modelagem e varredura virtual, já que o modelo proteico utilizado foi o do *Paracoccidioides lutzii*.

Em relação ao desenvolvimento de drogas antifúngicas, não existem trabalhos de literatura que tenham demonstrado a eficiência de inibidores de crescimento do fungo identificados pela estratégia de varredura virtual de quimiotecas. No presente trabalho, moléculas selecionadas por varredura virtual em quimiotecas mostraram-se eficientes na inibição do crescimento de fungos patogênicos, em especial do gênero *Paracoccidioides*, representando assim um avanço nas pesquisas de desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

7. CONCLUSÕES

- Foram selecionados, por genômica comparativa, dois genes-alvo (*trr1* e *kre2*) conservados nos genomas dos fungos patogênicos *Paracoccidioides brasiliensis* (isolados Pb3 e Pb18), *P. lutzii* (isolado Pb01), *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, e ausentes no genoma humano.
- O gene *trr1* de *P. lutzii* (Pb01) foi expresso em *Escherichia coli*.
- A proteína TRR1 recombinante de *P. lutzii* (Pb01) foi produzida e purificada, e está sendo cristalizada em colaboração com grupos da Universidade Católica de Brasília (UCB) e do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)
- As estruturas das proteínas TRR1 e KRE2 de *P. lutzii* (isolado Pb01) foram preditas por modelagem molecular por homologia.
- A partir da varredura virtual de quimiotecas, 34 moléculas que interagem com KRE2 e 20 moléculas que interagem com TRR1 foram selecionadas dos bancos *Life Chemicals* e *Chimiotèque Nationale*.
- Foi confirmada a atividade antifúngica de 7 moléculas do banco *Life Chemicals* contra fungos do gênero *Paracoccidioides* spp., 3 contra *Cryptococcus neoformans* e uma única contra espécies de *Candida* spp.
- A atividade enzimática da proteína TRR1 recombinante foi confirmada por ensaios de cinética enzimática.
- A inibição da atividade enzimática da proteína TRR1 recombinante foi realizada com as moléculas F0876-0030 e F1806-0122 do banco *Life Chemicals*.
- Foi testada a atividade antifúngica *in vitro* de 22 moléculas, do banco *Life Chemicals*, contra os fungos patogênicos humanos *P. lutzii* (isolado Pb01), *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb265), *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*.
- As melhores moléculas selecionadas pelo teste de atividade antifúngica *in vitro* foram F0608-0758 (contra KRE2) e F1806-0122 (contra TRR1), pela capacidade de inibir o crescimento de fungos do gênero *Paracoccidioides* spp.

8. *PERSPECTIVAS*

- Realização de ensaios de sinergia com diferentes combinações das moléculas que apresentaram atividade antifúngica.
- Realização de ensaios de citotoxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica *in vivo* das 7 melhores moléculas selecionadas;
- Realização dos testes *in vivo* das moléculas selecionadas em modelo experimental animal.
- Alteração da estrutura química das moléculas do banco *Life Chemicals* que apresentaram atividade antifúngica contra os fungos patogênicos humanos *P. lutzii* (isolado Pb01), *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb265), *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*, visando uma maior eficiência da atividade antifúngica.
- Predição das estruturas da proteína TRR1 dos fungos *C. albicans* e *C. neoformans* por modelagem molecular por homologia e varredura virtual de quimiotecas.
- Teste da atividade antifúngica *in vitro* das moléculas do banco *Chimiotèque Nationale* contra os fungos patogênicos humanos *P. lutzii* (isolado Pb01), *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb265), *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*.
- Expressão heteróloga do gene *kre2* de *P. lutzii* (Pb01) em *Pichia pastoris*.
- Produção e purificação da proteína KRE2 recombinante de *P. lutzii* (Pb01).
- Análise da atividade enzimática da proteína KRE2 recombinante por ensaios de cinética enzimática.
- Análise da inibição da atividade enzimática da proteína KRE2 recombinante pelas moléculas FF0170-0365, F0266-4227, F0608-0758 e F5882-1949 do banco *Life Chemicals* que foram selecionadas por inibir a atividade antifúngica *in vitro* contra fungos patogênicos humanos.
- Análise da inibição da atividade enzimática das proteínas TRR1 e KRE2 recombinantes pelas moléculas selecionadas do banco *Chimiotèque Nationale*

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akula N, Zheng H, Han FQ, Wang N. (2011) Discovery of novel SecA inhibitors of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by structure based design. *Bioorg Med Chem Lett.* 15;21(14):4183-8.

Amaral, A.C., Bocca, A.L., Ribeiro, A.M., Nunes, J., Peixoto, D.L., Simioni, A.R., Primo, F.L., Lacava, Z.G., Bentes, R., Titze-de-Almeida, R., Tedesco, A.C., Morais, P.C., Felipe, M.S. (2009) Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother.* 63:526-33.

Amorim, G. C., Pinheiro, A. S., Netto, L. E. S., Valente, A. P., Almeida, F. C. M. (2007) NMR resolution structure of the reduced form of thioredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biomol. NMR* 38, 99–104.

Andrade, R.V., Paes, H.C., Nicola, A.M., Carvalho, M.J. A., Fachin, A.L., Cardoso, R. S., Silva, S.S., Fernandes, L., Silva, S.P., Donadi, E.A., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A.S., Soares, C.M.A., Brígido, M.M., Felipe, M.S.S. (2006) Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics* 7: 208.

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.

Arendrup, M.C., Fursted, K., Gahrn-Hansen, B., Jensen, I.M., Knudsen, J.D., Lundgren, B., Schonheyder, H.C., Tvede, M. (2005) Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol* 43:4434–4440.

Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V., Rex, J.H. (2002) In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 245±247.

Arnér, E.S., Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 267(20):6102-9.

Baddley, J.W., Moser, S.A. (2004) Emerging fungal resistance. *Clin Lab Med.* 24(3):721-35.

Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 10(5):411-21.

Barchiesi, F., Calabrese, D., Sanglard, D. *et al.* (2000) Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Ch* 44: 1578–1584.

Barh D, Jain N, Tiwari S, Parida BP, D'Afonseca V, Li L, Ali A, Santos AR, Guimarães 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.

Barreiro, E.J., Rodrigues, C.R. (1997) Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova* 20(1)

Barry, A.L., Brown, S.D. (1996) Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 34(9):2154-7.

Bassetti, M., Taramasso, L., Nicco, E., Molinari, M.P., Mussap, M., Viscoli, C. (2011) Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One.* 6(9):e24198.

Beautrait, A., Leroux, V., Chavent, M., Ghemtio, L., Devignes, M.D., Smaïl-Tabbone, M., Cai, W., Shao, X., Moreau, G., Bladon, P., Yao, J., Maigret, B. (2008) Multiple-step virtual screening using VSM-G: overview and validation of fast geometrical matching enrichment. *J Mol Model.* 14(2):135-48.

Bialek, R., Ibricevic, A., Fothergill, A., Begerow, D. (2000). Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J Clin Microbiol.* 38(9):3190-3.

Bleicher, K.H., Böhm, H.J., Müller, K., Alanine, A.I. (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov.* 2(5):369-78.

Borges-Walmsley, M., Chen, D., Shu, X., and Walmsley, A. (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 10: 80–87.

Boucher, H.W., Groll, A.H., Chiou, C.C., Walsh, T.J., 2004. Newer systemic antifungal agents: pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs* 64, 1997–2020.

Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 6: 89-117.

Brunskole, M., Stefane, B., Zorko, K., Anderluh, M., Stojan, J., Lanisnik Rizner, T., Gobec, S. (2008) Towards the first inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase from *Curvularia lunata*: synthesis of artificial substrate, homology modelling and initial screening. *Bioorg. Med. Chem.* 16 5881–5889.

Buitrago, M.J., Cuenca-Estrella, M. (2011) Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28.

Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J. P., Odds, F. C. and Gow, N. A. R. (1998) Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 7670-7675.

Caceres, R.A., Timmers, L.F.S., Vivan, A.L., Schneider, C.Z., Basso, L.A., Azevedo Jr, W.F. de, Santos, D.S. (2008) Molecular modeling and dynamics studies of cytidylate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Mol Model.* 14:427–434.

Caceres, R.A., Timmers, L.F.S., Dias, R., Basso, L.A., Santos, D.S., W.F., Azevedo Jr, W.F. (2008b) Molecular modeling and dynamics simulations of PNP from *Streptococcus agalactiae*. *Bioorg. Med. Chem.* 16:4984–4993.

Caffrey, C.R., Rohwer, A., Oellien, F., Marhöfer, R.J., Braschi, S., Oliveira, G., McKerrow, J.H., Selzer, P.M. (2009) A comparative chemogenomics strategy to predict potential drug targets in the metazoan pathogen, *Schistosoma mansoni*. *PLoS One*, 4(2):e4413.

Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, de la Pedrosa EG, Yagüe G, Guna R, Rubio C, Miranda C, Pazos C, Velasco D; (2011) Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(12):5590-6.

Carvalho, I., Pupo, M.T., Borges, A.D.L., Bernardes, L.S.C. (2003) Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 3, 428-438.

Cavasotto, C.N., Phatak, S.S. (2009) Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov Today*. 14(13-14):676-83.

Chapman, S.W., Sullivan, D.C., Cleary, J.D. (2008) In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 119:197-215.

Cheng, A.C., Coleman, R.G., Smyth, K.T., Cao, Q., Soulard, P., *et al.* (2007) Structurebased maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nat Biotechnol* 25: 71–75.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. (2011) Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 49(8):785-98.

Congreve, M. *et al.* (2005) Structural biology and drug discovery. *Drug Discov. Today* 10, 895–907.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 18(5):1441-54.

Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J.P., Eklund, H. (1996) Crystal Structure of Arabidopsis thaliana NADPH Dependent Thioredoxin Reductase at 2.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 264:1044-1057.

Darden, T., D. York, and L. Pedersen. (1993) Particle mesh Ewald: an N. log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98:10089 –10092.

Desjardins, C.A., Champion, M.D., Holder, J.W., Muszewska, A., Goldberg, J., Bailão, A.M., Brigido, M.M., Ferreira, M.E., Garcia, A.M., Grynberg, M., Gujja, S., Heiman, D.I., Henn, M.R., Kodira, C.D., León-Narváez, H., Longo, L.V., Ma, L.J., Malavazi, I., Matsuo, A.L., Morais, F.V., Pereira, M., Rodríguez-Brito, S., Sakthikumar, S., Salem-Izacc, S.M., Sykes, S.M., Teixeira, M.M., Vallejo, M.C., Walter, M.E., Yandava, C., Young, S., Zeng, Q., Zucker, J., Felipe, M.S., Goldman, G.H., Haas, B.J., McEwen, J.G., Nino-Veja, G., Puccia, R., San-Blas, G., Soares, C.M., Birren, B.W., Cuomo, C.A. (2011) Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 7(10):e1002345.

Dupont, B. (2002) Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 49 Suppl 1:31-6.

d'Enfert, C. (2006) Biofilms and their role in the resistance of pathogenic Candida to antifungal agents. *Curr Drug Targets.* 7(4):465-70

Enoch, D.A., Ludlam, H.A., Brown, N.M. (2006) Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol.*,55:809-818.

Espinel-Ingroff, A. (1998) In vitro activity of the new triazole, voriconazole (UK-109,496), against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 36: 198-202.

Espinel-Ingroff, A. (2003) *In vitro* antifungal activities of andilafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: Review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 20: 121-136

Espinel-Ingroff., A. (2009) Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Rev Iberoam Micol.* 26(1):15-22.

Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Silva, S.P., Maranhão, A.Q., Torres, F.A.G., Albuquerque, P. *et al.* (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST Analysis. *YEAST* 20: 263-271.

Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M. *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.

Ferreira, M.S., Borges, A.S. (2009) Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42(2):192-8.

Franzot, S.P., Mukherjee, J., *et al.*, (1998) Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect. Immun.* 66 (1), 89–97.

Galgiani, J., Ampel, N.M., Blair, J., Catanzaro, A. Coccidioidomycosis (2005) *Clin Infect Dis.* 4:1217–1223.

Gasteiger, J., Rudolph, C., Sadowski, J. (1990) Tetrahedron Comput. *Methods* 3, 537.

Ghosh, S., Nie, A., An, J., Huang, Z. (2006) Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 10(3):194-202.

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kötter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* (London), 418, 387–391.

Goldman, G.H., Dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D.C., De Souza Bernardes, L.A., Quiapin, A.C., et al. (2003). Expressed Sequence Tag Analysis of the Human Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase: Identification of Putative Homologues of *Candida albicans* Virulence and Pathogenicity. *Genes. Eukaryot. Cell.* 2: 34-48.

Gonzalez, A., Gomez, B.L., Diez, S., Hernandez, O., Restrepo, A., Hamilton, A.J., et al. (2005) Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*, 73:2486–95.

Groll, A.H., De Lucca, A.J., Walsh, T.J. (1998) Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.* 6:117–124.

Groll, A.H., Walsh, T.J. (2001) Caspofungin: pharmacology, safety and therapeutic potential in superficial and invasive fungal infections. *Expert Opin Investig Drugs* 10:1545–1558.

Gromer S, Wissing J, Behne D, Ashman K, Schirmer RH, Flohé L, Becker K. (1998) A hypothesis on the catalytic mechanism of the selenoenzyme thioredoxin reductase. *Biochem J.* 1;332 (Pt 2):591-2.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 1;37(9):1172-7.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.

Hendlich M, Rippmann F, Barnickel G. (1997) LIGSITE: automatic and efficient detection of potential small molecule-binding sites in proteins. *J Mol Graph Model.* 15(6):359-63, 389.

Häusler, A., Ballou, L., Ballou, C.E., Robbins, P.W. (1992) Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1, 89(15): 6846–6850.

Hector, R.F., Laniado-Laborin, R. (2005) Coccidioidomycosis - a fungal disease of the Americas. *PLoS Med.* 2e2.

Hector, R., Rutherford, G.W. (2007) The public health need and present status of a vaccine for the prevention of Coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1111:259–268.

Hillisch, A., Pineda, L.F., Hilgenfeld, R. (2004) Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today* 9:659-669.

Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 25;264(24):13963-6.

Hu, W., Sillaots, S., Lemieux, S., *et al.* (2007) Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *Plos Pathogens.* 3(3): 0001-0015.

Hung, C.Y., Yu, J.J., Seshan, K.R., Reichard, U., Cole, G.T. (2002) A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infect Immun.* 70:3443–3456.

Humphreys, D.D., Friesner, R.A., Berne, B.J. (1994) A multiple time step molecular dynamics algorithm for macromolecules. *Journal of Physical Chemistry* 98, 6885-6892.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 14(1):33-8, 27-8.

Jaccard, P. (1901) Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37, 547-579.

Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., Taylor, R. (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 267, 727-748.

Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 79:926-935.

Jung K, Park J, Choi J, Park B, Kim S, Ahn K, Choi J, Choi D, Kang S, Lee YH. (2008) SNUGB: a versatile genome browser supporting comparative and functional fungal genomics. *BMC Genomics.* 4;9:586.

Kairys, V., Fernandes, M.X., Gilson, M.K. (2006) Screening drug-like compounds by docking to homology models: a systematic study. *Journal of Chemical Information and Modeling* 46:365-379.

Karplus, M., McCammon, J.A. (2002) Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol.* 9(9):646-52.

Kasuga, T., White, T.J., Koenig, G., McEwen, J., Restrepo, A., Castaneda, E., Da Silva Lacaz, C., Heins-Vaccari, E.M., De Freitas, R.S., Zancope-Oliveira, R.M., Qin, Z., Negroni, R., Carter, D.A., Mikami, Y., Tamura, M., Taylor, M.L., Miller, G.F., Poonwan,

N., Taylor, J.W. (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 12:3383–3401.

Kauffman, C.A., Zarins, L.T. (1998) In vitro activity of voriconazole against *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 31(1):297-300.

Keating, G., Figgitt, D. (2003) Caspofungin: a review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis. *Drugs*.63(20):2235-63.

Keating, G.M. (2005) Posaconazole. *Drugs* 65:1553–67.

Kett, D.H., Azoulay, E., Echeverria, P.M., Vincent, J.L., (2011) *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med*. 39(4):665-70.

Kim, A., Nicolau, D.P., Kuti, J.L., (2011) Hospital costs and outcomes among intravenous antifungal therapies for patients with invasive aspergillosis in the United States. *Mycoses*. 54(5):e301-12.

Kontoyiannis DP, Lewis RE. (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*. 30;359(9312):1135-44.

Kortagere S, Welsh WJ, Morrisey JM, Daly T, Ejigiri I, Sinnis P, Vaidya AB, Bergman LW. (2010) Structure-based design of novel small-molecule inhibitors of *Plasmodium falciparum*. *J Chem Inf Model*. 24;50(5):840-9.

Kozubowski, L., Lee, S.C., Heitman, J. (2009) Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiol*. 11(3):370-80.

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.

Krieter, P., Flannery, B., Musick, T., Gohdes, M., Martinho, M., Courtney, R. (2004) Disposition of posaconazole following single-dose oral administration in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3543-3551.

Kumar, S., Chaudhary, K., Foster, J.M., Novelli, J.F., Zhang, Y., Wang, S., Spiro, D., Ghedin, E., Carlow, C.K.S. (2007) Mining Predicted Essential Genes of *Brugia malayi* for Nematode Drug Targets. *PLoS ONE* 2(11): e1189.

Kuroyanagi, J., Kanai, K., Sugimoto, Y., Horiuchi, T., Achiwa, I., Takeshita, H., Kawakami, K. (2010) 1,3-Benzoxazole-4-carbonitrile as a novel antifungal scaffold of β -1,6-glucan synthesis inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 1;18(21):7593-606.

Lai, C.C., Tan, C.K., Huang, Y.T., Shao, P.L., Hsueh, P.R. (2008) Current challenges in the management of invasive fungal infections. *J Infect Chemother.* 14(2):77-85.

Latgé, J.P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12: 310-350.

Latge, J.P. (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9, 382-389.

Li RK, Ciblak MA, Nordoff N, Pasarell L, Warnock DW, McGinnis MR. (2000) In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(6):1734-6.

Leclerc, M.C., Philippe, H., Gueho, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol.* 32(5):331-41.

Lennon, B.W., Williams, C.H. Jr., Ludwig, M.L. (2000) Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science.* 18;289(5482):1190-4.

Lewis, K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.*,322:107-31.

Lobsanov, Y.D., Romero, P.A., Sleno, B., Yu, B., Yip, P., Herscovics, A., Howell, P.L. (2004) Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J Biol Chem.* 23;279(17):17921-31.

Lussier, M., Sdicu, A.M., Ketela, T., Bussey, H. (1995) Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *J Cell Biol.* 131(4):913-27.

Lussier, M., Sdicu, A.M., Bussey, H. (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 6;1426(2):323-34.

Manavathum, E.E., Cutright, J.L., Chandrasekar, P.H. (1998) Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:3018–3021.

Manavathu, E.K., Cutright, J.L., Loebenberg, D., Chandrasekar, P.H. (2000) A comparative study of the in vitro susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). *J Antimicrob Chemother.* 46(2):229-34.

Marshall, G.R. (2004) Introduction to cheminformatics in drug discovery - A personal view. *Cheminformatics in drug discovery.* Weinheim: WILEY-VHC.

da Matta DA, de Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, Salomão R, Colombo AL. (2007) Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 57(4):399-404.

MacKerell, A.D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Jr., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L.,

Kuczera, K., Lau, F.T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reiher, W.E., III, Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M. (1998) All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem* 102:3586–3616.

McCormick, M., Yaeger, K., Novy, R., Van Oosbree, T. (1994) in *Novations* 2, 7.

Méan, M., Marchetti, O., Calandra, T. (2008) Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit. *Crit Care.*,12(1):204.

Mierendorf, R., Yaeger, K., Novy, R. (1994) in *Novations* 1, 1–3.

Mikulska M, Bassetti M, Ratto S, Viscoli C. (2011) Invasive candidiasis in non-hematological patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 3(1):e2011007.

Missall, T.A., Lodge, J.K. (2005) Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 4(2):487-9.

Moreau, S., Varache-Lembège, M., Larroure, S., Fall, D., Neveu, A., Deffieux, G., Vercauteren, J., Nuhrich, A. (2002) (2-Arylhydrazonomethyl)-substituted xanthenes as antimycotics: synthesis and fungistatic activity against *Candida* species. *Eur J Med Chem.* 37(3):237-53.

Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., Maccallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow, N.A. (2005) Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem.* 14;280(2):1051-60.

Ngamskulrungrroj, P., Gilgado, F., Faganello, J., Litvintseva, A.P., Leal, A.L., Tsui, K.M., Mitchell, T.G., Vainstein, M.H., Meyer W. (2009) Genetic diversity of the *Cryptococcus*

species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLoS One*. 10;4(6):e5862.

Nosanchuk JD, Gacser A. (2008) *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *Microbes Infect*. 10(9):973-7.

Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A.M., Restrepo, A., Colombo, A.L., (2010) Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 1;51(5):561-70

Oakley KL, Moore CB, Denning DW. (1998) In vitro activity of the echinocandin antifungal agent LY303,366 in comparison with itraconazole and amphotericin B against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 42(10):2726-30.

Odds, F.C. (2005) Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs. *Rev Iberoam Micol*. 22(4):229-37.

Oliveira, M.A., Discola, K.F., Alves, S.V., Medrano, F.J., Guimarães, B.G., Netto, L.E.S. (2010) Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 49:3317-3326.

Olson, J.A., Adler-Moore, J.P., Jensen, G.M., Schwartz, J., Dignani, M.C., Proffitt, R.T. (2008) Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(1):259-68.

Pappagianis, D. (1993) Coccidioidomycosis. *Semin Dermatol*. 12(4):301-9.

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. (2010) How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 9:203-14.

Pemán J, Salavert M. (2011) General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(2):90-8.

Perfect JR, Cox GM, Dodge RK, Schell WA, In vitro and in vivo efficacies of the azole SCH-56592 against *Cryptococcus neoformans*. (1996) *Antimicrob Agents Chemother* 40:1910-1913.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (2004) Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 42(10):4419-31.

Phillips, J., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R., Kale, L., Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26:1781–1802.

Pinheiro, A. S., Amorim, G. C., Netto, L. E., Almeida, F. C.,Valente, A. P. (2008) NMR solution structure of the reduced form of thioredoxin 1 from *Sacharomyces cerevisiae*. *Proteins* 70, 584–587.

Poirier, J.M., Cheymol, G. (1998) Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations. *Clin Pharmacokinet*35(6):461-73.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(3):513-21.

Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. (2008) Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 29(2):182-97.

Rispail, N., Soanes, D.M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., Valiante, V., Yang, M., Beffa, R., Brakhage, A.A., Gow, N.A., Kahmann, R., Lebrun, M.H., Lenasi, H., Perez-Martin, J., Talbot, N.J., Wendland, J., Di Pietro, A. (2009) Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 46(4):287-98.

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.

Romero PA, Lussier M, Sdicu AM, Bussey H, Herscovics A. (1997) Ktr1p is an alpha-1,2-mannosyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of the enzymic properties of soluble recombinant Ktr1p and Kre2p/Mnt1p produced in *Pichia pastoris*. *Biochem J*. 15;321 (Pt 2):289-95.

Sable, C.A., Strohmaier, K.M., Chodakewitz, J.A. (2008) Advances in antifungal therapy. *Annu Rev Med*. 59:361-79.

Saïdani, N., Grando, D., Valadié, H., Bastien, O., Maréchal, E. (2009) Potential and limits of in silico target discovery - Case study of the search for new antimalarial chemotherapeutic targets. *Infect Genet Evol*. 9(3):359-67.

Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. (1986) *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2 ed, Plainville, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J; Fritsch EF; Maniatis T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

San-Blas G. (1993) Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol*. 31(2):99-113.

San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*. 40(3):225-42.

Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. & Schneider, G. (2001). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98, 9533–9538.

Schelenz, S. (2008) Management of candidiasis in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. 61 Suppl 1:i31-4

Shao, J., Tanner, S.W., Thompson, N., Cheatham, T.E., III (2007) Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* 3: 2312-2334.

Shen Y, Liu J, Estiu G, Isin B, Ahn YY, Lee DS, Barabási AL, Kapatal V, Wiest O, Oltvai ZN. (2010) Blueprint for antimicrobial hit discovery targeting metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 19;107(3):1082-7.

Shenkin, P.S., McDonald, D.Q. (1994) Cluster analysis of molecular conformations. *J. Comput. Chem.* 15 :899-916.

Shoichet, B.K. (2004) Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 432, 862–865.

Singh, N., Paterson, D.L. (2005) Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 18(1):44-69.

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.

Sobue, S., Sekiguchi, K. (2004) Difference in percutaneous absorption and intracutaneous distribution in guinea pigs among topical antifungal drugs (tioconazole solution, tioconazole cream, miconazole nitrate solution and bifonazole solution). *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1428-1432.

Stahura, F.L., Bajorath, J. (2001) Bio- and chemoinformatics beyond data management: crucial challenges and future opportunities. *Drug Discovery Today*, 7: S41- S47.

Stahura, F.L., Bajorath, J. (2004) Virtual screening methods that complement HTS. *Comb Chem High Throughput Screening* 7:259–269

Steinbach, W.J., Perfect, J.R. (2003) Newer antifungal therapy for emerging fungal pathogens. *Int J Infect Dis* 7:5–20.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. (2009) Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009 Aug;52(2):273-83. Epub 2009 Apr 17.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weigthing, Position-Specific Gap Penalties and Weigth Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, 4673-4680.

Thomson, L. M., Bates, S., Yamazaki, S., Arisawa, M., Aoki, Y., Gow, N. A. R. (2000) Functional Characterization of the *Candida albicans* MNT1 Mannosyltransferase Expressed Heterologously in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* 275: 18933-18938.

Thön M, Al-Abdallah Q, Hortschansky P, Brakhage AA. (2007) The thioredoxin system of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem.* 14;282(37):27259-69.

Traeder, C., Kowoll, S., Arastéh, K. (2008) *Candida* infection in HIV positive patients 1985-2007. *Mycoses.* 51 Suppl 2:58-61.

Tragiannidis A, Roilides E, Walsh TJ, Groll AH. (2012) Invasive aspergillosis in children with acquired immunodeficiencies. *Clin Infect Dis.* 15;54(2):258-67.

De Vita, D., Scipione, L., Tortorella, S., Mellini, P., Di Rienzo, B., Simonetti, G., D'Auria, F.D., Panella, S., Cirilli, R., Di Santo, R., Palamara, A.T. (2012) Synthesis and antifungal activity of a new series of 2-(1H-imidazol-1-yl)-1-phenylethanolderivatives. *Eur J Med Chem.* 49:334-42.

te Velthuis, A.J., Bagowski, C.P. (2008) Linking fold, function and phylogeny: a comparative genomics view on protein (domain) evolution. *Curr Genomics.* 9(2):88-96.

Wagener, J., Echtenacher, B., Rohde, M., Kotz, A., Krappmann, S., Heesemann, J., Ebel, F. (2008) The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell.* 7(10):1661-73.

Waksman, G., Krishna, T. S. R., Williams, C. H. Jr & Kuriyan, J. (1994). *J. Mol. Biol.* 236, 800–816.

Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. (1995) LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 8(2):127-34.

Wang, P.F., Arscott, L.D., Gilberger, T.W., Müller, S., Williams, C.H. Jr. (1999) Thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*: evidence for interaction between the C-terminal cysteine residues and the active site disulfide-dithiol. *Biochemistry.* 9;38(10):3187-96.

Waszkowycz, B. *et al.* (2001) Large-scale virtual screening for discovering leads in the postgenomic era. *IBM Syst. J.* 40, 360–376.

Wheat, L.J. (2006) Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. *Mycoses.* 49:274–282.

Weisel, M., Proschak, E., Schneider, G. (2007) PocketPicker: analysis of ligand binding-sites with shape descriptors. *Chem Cent J.* 13;1:7.

White, T.A., Kell, D.B. (2004) Comparative genomic assessment of novel broad-spectrum targets for antibacterial drugs. *Comp Funct Genomics.* 5(4):304-27.

Williams CH Jr. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB J.* ;9(13):1267-76.

Williams, C.H., Arscott, L.D., Muller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K., Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* 267, 6110–6117.

Wills, E.A., Redinbo, M.R., Perfect, J.R. and Del Poeta, M. (2000). New potential targets for antifungal development. *Emerg. Therap. Targets* 4: 1-32.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* 39(3):309-17.

Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. (2003) Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol.* 41(11):5233-5.

Zhang, Z., Bao, R., Zhang, Y., Yu, J., Zhou, C.Z, Chen, Y. (2009) Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic thioredoxin reductase Trr1 reveals the structural basis for species-specific recognition of thioredoxin. *Biochim Biophys Acta.* 1794(1):124-8.

Zhong L, Arnér ES, Holmgren A. (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 23;97(11):5854-9.

10. ANEXO

- Trabalho publicado como primeira autora:

Abadio AKR, Kioshima ES, Teixeira MM, Martins NF, Maigret B, Felipe MS (2011) Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*, **12**:75.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens

Ana Karina R Abadio^{1,3}, Erika S Kioshima¹, Marcus M Teixeira¹, Natalia F Martins², Bernard Maignret³, Maria Sueli S Felipe^{1*}

Abstract

Background: The prevalence of invasive fungal infections (IFIs) has increased steadily worldwide in the last few decades. Particularly, there has been a global rise in the number of infections among immunosuppressed people. These patients present severe clinical forms of the infections, which are commonly fatal, and they are more susceptible to opportunistic fungal infections than non-immunocompromised people. IFIs have historically been associated with high morbidity and mortality, partly because of the limitations of available antifungal therapies, including side effects, toxicities, drug interactions and antifungal resistance. Thus, the search for alternative therapies and/or the development of more specific drugs is a challenge that needs to be met. Genomics has created new ways of examining genes, which open new strategies for drug development and control of human diseases.

Results: *In silico* analyses and manual mining selected initially 57 potential drug targets, based on 55 genes experimentally confirmed as essential for *Candida albicans* or *Aspergillus fumigatus* and other 2 genes (*kre2* and *erg6*) relevant for fungal survival within the host. Orthologs for those 57 potential targets were also identified in eight human fungal pathogens (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*). Of those, 10 genes were present in all pathogenic fungi analyzed and absent in the human genome. We focused on four candidates: *trr1* that encodes for thioredoxin reductase, *rim8* that encodes for a protein involved in the proteolytic activation of a transcriptional factor in response to alkaline pH, *kre2* that encodes for α -1,2-mannosyltransferase and *erg6* that encodes for $\Delta(24)$ -sterol C-methyltransferase.

Conclusions: Our data show that the comparative genomics analysis of eight fungal pathogens enabled the identification of four new potential drug targets. The preferred profile for fungal targets includes proteins conserved among fungi, but absent in the human genome. These characteristics potentially minimize toxic side effects exerted by pharmacological inhibition of the cellular targets. From this first step of post-genomic analysis, we obtained information relevant to future new drug development.

Background

The frequency and diversity of invasive fungal infections have changed over the last 25 years. The emergence of less common, but medically important, fungi has increased, especially in the large populations of immunocompromised patients and of those hospitalized with serious underlying diseases [1,2]. These patients develop more severe clinical forms of mycoses, which are commonly fatal, and they are more susceptible to infections

by opportunistic fungi than non-immunocompromised people [3]. The antifungal agents currently available for the treatment of systemic mycoses include four groups of drugs: polyenes (amphotericin B), azoles (fluconazole, itraconazole, ketoconazole, posaconazole and voriconazole), echinocandins (caspofungin, anidulafungin, and micafungin) and flucytosines [4]. Conventional amphotericin B, despite being a broad-spectrum fungicidal agent with little intrinsic or acquired resistance, is limited by its serious toxicities and lack of an oral formulation for systemic therapy. In recent years, three lipid formulations of amphotericin B (amphotericin B lipid

* Correspondence: msueli@unb.br

¹Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

complex, amphotericin B cholesteryl sulfate and liposomal amphotericin B) have been developed and approved by the Food and Drug Administration (FDA). Although less nephrotoxic than deoxycholate amphotericin B, lipid amphotericin B nephrotoxicity still limits treatment compared to the newer triazoles and echinocandins [5]. The triazoles are the most widely used antifungal agents and have activity against many fungal pathogens, with less serious nephrotoxic effects observed than with amphotericin B. However, the azoles antifungals have many drug-drug interactions with multiple drug classes owing to their interference with hepatic cytochrome P-450 enzymes [6]. Another problem with azoles therapy is the acquired resistance of many pathogens to these drugs, which is the most common cause of refractory infection. Thus, the search for alternative therapies and/or the development of more specific drugs is a challenge. Recently, efforts have been devoted to the chemistry side of discovering new antifungal agents, including the development of third-generation azoles or a new therapeutic class of antifungal drugs, such as echinocandins [7]. Additionally, nanotechnology approaches have improved the development of innovative products that reduce side effects by lowering dose administration of already available drugs, such as amphotericin B nanoencapsulated [8-10]. Many advances have been made in antifungal drug development in the past decade. However, the search for more specific drugs, in an effort to overcome the global problem of resistance to antifungal agents and minimize the serious side effects, is increasingly relevant and necessary.

Currently, drug research and development are expensive and time consuming. An estimated 14 years and an average of \$1.8 billion is the investment required to develop a new drug that will reach the market [11]. Selecting new molecular targets by comparative genomics, homology modeling and virtual screening of compounds is promising in the process of new drug discovery. In fact, technological advances over the past two decades have led to the accumulation of genome-wide sequence data for many different fungal species. As the number of sequenced genomes rapidly increases, searching and comparing sequence features within and between species has become a part of most biological inquiries [12]. Currently, 183 fungi genomes have been sequenced, either completely or are in the process of sequencing, and 40 human pathogenic fungi genomes have been sequenced. (Data collected on 09/07/2010 in the following databases: Fungal Genomes, TIGR, Sanger, Broad Institute and NCBI). Seven of the human pathogens are of great importance in systemic mycosis: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Histoplasma*

capsulatum, which are strong candidates for post-genomic studies.

Comparative genomics strategy is a useful tool in identifying potential new drug targets, such as putative essential genes and/or those affecting the cell viability that are conserved in pathogenic organisms [13-16]. By this methodology, ten genes conserved in three bacteria species (*Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* 0157: H7) were selected as candidates for an antibacterial drug [14]. Since the publication of the nematode *Brugia malayi* complete genome, Kumar and colleagues [15] conducted a comparison analysis between the genomes of *B. malayi* and *Caenorhabditis elegans* and were able to identify 7,435 orthologs genes, from which 589 were identified as essential, as well as absent in the human genome, resulting in a list of candidate target genes for new drug development. Recently, Caffrey and colleagues [16] identified new drug targets in the metazoan pathogen *Schistosoma mansoni*, the causative agent of Schistosomiasis. The authors identified 35 orthologs essential genes and potential drug targets against this human pathogen.

Here we identified potential drug targets applied to human fungal pathogens using comparative genomics strategy. Ten genes were present in all pathogenic fungi analyzed and absent in the human genome. Among them, four genes (*trr1*, *rim8*, *kre2* and *erg6*) were selected for future research and new drug development. Two of those genes codify for proteins (TRR1 and KRE2) that showed significant identity when compared to templates already deposited in the databank PDB (Protein Database Bank), which were used to perform homology modeling of both enzymes. These results will be used to virtually screen combinatorial libraries, offering new perspectives on technological development and innovation of antifungal agents against human pathogens.

Results and Discussion

Drug target selection

Direct demonstration of *A. fumigatus* and *C. albicans* gene essentiality was achieved using conditional promoter replacement (CPR) [17] and gene replacement and conditional expression (GRACE) strategies [18], respectively. Therefore, the initial ensemble of genes, experimentally described as essential in *C. albicans* and/or *A. fumigatus* were used to identify 55 orthologs. In addition, two non-essential genes (*kre2* and *erg6*), but which are important to cell viability within the host [19,20], were added to the list of possible drug targets. The alignments of those 57 sequences against the genome of the 8 pathogenic fungi *P. lutzii*, *P. brasiliensis* isolates (Pb18 e Pb3), *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* confirmed the

presence of all the genes (Additional file 1). As a result, ten conserved genes were selected as drug targets because they were present in all species analyzed and were also absent in the human genome, as shown in Table 1.

Six criteria were used to select the potential targets: 1) be essential or relevant for fungi survival; 2) be present in all analyzed pathogens, therefore allowing a broad spectrum of drug action; 3) be absent in the human genome, therefore avoiding unwanted side effects; 4) be preferentially an enzyme and have the potential for assayability; 5) not be auxotrophic, thereby avoiding host provision of the necessary substrate for the blocked pathway; and 6) have a cellular localization potentially accessible to the drug activity. Applying these criteria, four potential drug targets were identified: *trr1*, *rim8*, *kre2* and *erg6* genes. Only *trr1* and *rim8* are essential genes, but *kre2* and *erg6* are involved in cell viability and survival within the host. In addition, those genes were also identified as potential drug targets in *P. lutzii* isolate Pb01 transcriptome, as described by Felipe and colleagues [21].

The *trr1* is an essential gene that encodes for the cytoplasmic enzyme thioredoxin reductase [22]. This protein plays a critical role in maintaining the cell redox status [22] and is part of the complex so-called thioredoxin system, which contains thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (Trr) and NADPH, protecting cells against oxidative stress [23]. Thioredoxin reductase is necessary for the viability of *C. neoformans* [24] and is essential for erythrocytic stages in *Plasmodium falciparum* [25]; it also appears to be essential for growth in *S. aureus* [26]. *S. cerevisiae* strain deleted for *trr1* gene

is hypersensitive to hydrogen peroxide and high temperatures [27,28].

The *rim8* is also an essential gene that encodes for a protein involved in the proteolytic activation of a transcriptional factor in response to alkaline pH and is located near the plasma membrane [29]. RIM8 (for yeasts) or PalF (for filamentous fungi) protein binds strongly to the C-terminal cytoplasmic tail of the seven transmembrane domains, the putative pH sensor PalH. Alignment of protein sequences suggests structural similarity of RIM8 to mammalian arrestins, but the sequence similarity was restricted to short stretches of amino acid sequences, mostly corresponding to β -strands in arrestin crystal structures [30]. The RIM8 protein performs an essential step in the signaling pathway activating RIM101, which, in turn, regulates alkaline pH-response. This pathway is also involved in the activation of the yeast-to-hyphal transition required for host-pathogen interaction [31].

The *kre2* gene encodes for the enzyme α -1,2-mannosyl-transferase that is located in the Golgi complex. It has a short amino-terminal cytoplasmic domain, a hydrophobic membrane-spanning domain and a large carboxy-terminal catalytic domain [32]. This enzyme is responsible for the addition of the α -1,2-linked mannose residues to O-linked carbohydrates and is also involved in N-linked glycosylation [33-36]. Cell wall-associated proteins are commonly glycosylated and defects in this process may result in protein misfolding, instability, and/or reduced enzymatic activity [36]. Absence of MNT1p in *S. cerevisiae* resulted in the synthesis of truncated O-linked oligosaccharides and this interfered with the functioning and/or synthesis of cell wall compounds [33,34]. Mutants of *C. albicans*

Table 1 Potential target genes selected for new antifungal drug development

Gene	Biological process	Cytolocalization	PDB template	Organism	E-value	PDB sequence identity (%)
<i>trr1</i>	Cell redox homeostasis	Cytoplasm	1ITJ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3e-115	65
			1VDC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1e-94	57
<i>aur1</i>	Cellular metabolism	Golgi and membrane	*	*	*	*
<i>mak5</i>	Ribosome biogenesis	Nucleolus	1HV8	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	7e-42	30
<i>chs1</i>	Cell wall biogenesis/ degradation	Membrane	*	*	*	*
<i>tom40</i>	Protein transport	Mitochondrion membrane	2QK9	<i>Homo sapiens</i>	0.8	34
<i>kre6</i>	Cell wall biogenesis/ degradation	Golgi apparatus Membrane	2VY0	<i>Pyrococcus furiosus</i>	6e-4	32
<i>fks1</i>	Cell wall organization/ biogenesis	Membrane	1R1M	<i>Neisseria meningitidis</i>	0.3	32
<i>kre2</i>	Protein mannosilation	Golgi membrane	1S4N	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6e-96	50
<i>erg6</i>	Ergosterol biosynthesis	Endoplasmatic reticulum membrane	3BUS	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	5e-18	32
<i>rim8</i>	pH-response regulator	Cytoplasm	3G3L	<i>Bacteroides fragilis</i>	3,9	38

*Structure absent in PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

that lack CaMNT1 and CaMNT2 have truncated O-mannan, marked reduction in adherence and attenuated virulence [34]. Although CaMNT1p is not essential for viability, MNT1p-mediated O-glycosylation of proteins of *C. albicans* is essential for normal host-fungus interactions [37].

The *erg6* gene encodes for the enzyme Δ -(24)-Sterol C-methyltransferase that is located in the endoplasmic reticulum. It shows a transmembrane portion and an active site positioned toward the cytoplasm [38,39]. This enzyme catalyzes the attachment of a methyl group acting in a bifurcation point of the ergosterol/cholesterol biosynthesis pathway [40]. In *S. cerevisiae*, *erg6* mutants showed alteration in membrane fluidity and permeability [41,42]. In *C. albicans*, mutants that do not synthesize Δ -(24)-Sterol C-methyltransferase showed an increase in the plasma membrane permeability, resulting in cells with severely compromised phenotypes [20]. *erg6* mutants, in *Candida lusitanae*, showed a severe growth defect and decreased ergosterol content [43].

Conserved domains in protein sequences and phylogenetic analysis

A multiple protein sequence alignment showed the presence of conserved domains mainly in the catalytic site of the four selected candidates (Additional files 2, 3, 4, 5). The catalytic site of the protein TRR1 contains the four-amino acid-residue sequence Cys-Ala-Thr-Cys [44,22,45], and these two highly conserved cysteine residues (Cys142 and Cys145 in *C. albicans*) are essential for its redox activity (Additional file 2). RIM8 protein alignments showed that in the C-terminal domain, the residue Ile-331 of *A. nidulans*, involved in PalF-PalH receptor binding, was conserved in all the fungi sequences (it is located in position Ile-320 in *P. brasiliensis*). The amino acid residue Ser-86 of *A. nidulans*, present in the N-terminal domain and responsible for PalF-PalH interaction and pH signaling, was replaced by the conserved Cys-75 in *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, Cys-76 in *C. immitis* and Cys-77 in *A. fumigatus* (Additional file 3).

The catalytic site of KRE2 proteins contains the conserved amino acid residues His312, His377, Asp350 and Glu318 in *C. albicans*. If those residues are individually replaced, in *C. albicans*, the enzyme activities are fully abolished [46,47]. Our analysis showed highly conserved catalytic domains of all the sequences of the analyzed proteins for all the pathogenic fungi. The domain YNLCHFWSNFEL, previously described as important to the catalysis mechanism, was also conserved in all fungi analyzed (Additional file 4).

The ERG6 protein showed four conserved regions in several sterol methyltransferase (SMT) proteins, including Regions II, III and IV, generally present in AdoMet-

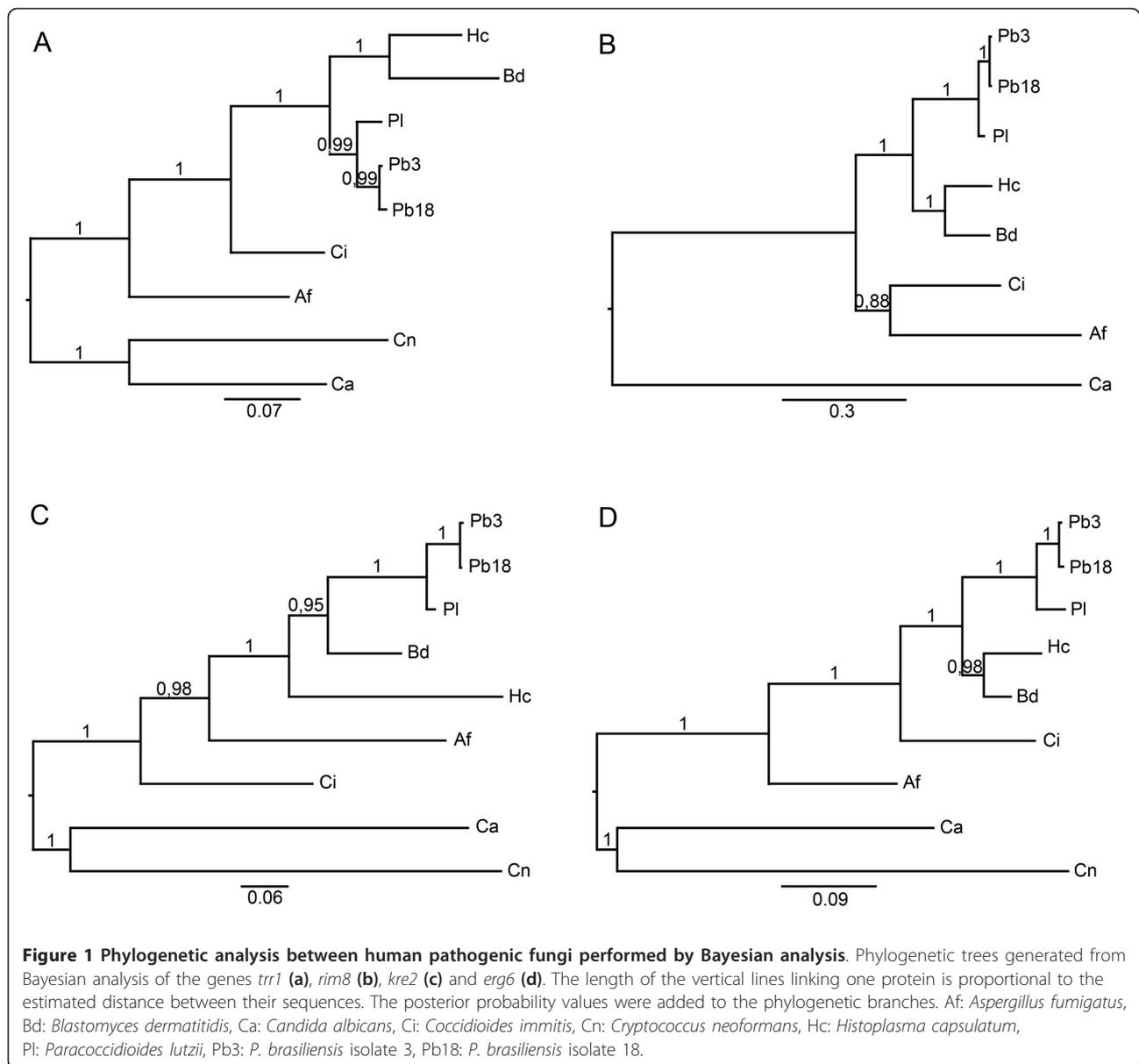
dependent enzymes and, Region I, observed in all SMT enzymes [48]. Region I, a highly conserved region rich in aromatic amino acids, contains a signature motif YEXGWG [49]. The mutation of the amino acid residues situated in Region I altered the catalytic behavior of the fungal SMT [50-52]. In addition, specific-site mutation in Region II and Region III of ERG6 protein showed that certain residues (Cys128, Gly129, Pro133 and Ala193 in *S. cerevisiae*) were important to C-methylation activity [52]. All important amino acid residues for ERG6 protein activity were conserved in all fungi genomes analyzed (Additional file 5).

The alignments of protein sequences were also used in phylogenetic studies performed by Bayesian analysis to construct phylogenetic trees relating TRR1, RIM8, KRE2 and ERG6 orthologs. The phylogenetic trees showed the evolutionary relationships between the different species used in this work and separated them in different groups (Figure 1). *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *A. fumigatus* and *C. immitis* were clustered apart from *C. albicans* and *C. neoformans*. The posterior probability values were added to the phylogenetic branches and received values near 1, showing the consistency and reliability of these branches. In the four phylogenetic trees, the *P. brasiliensis* isolate Pb01 was separated from the other isolates (Pb3 and Pb18). These findings are in agreement with Teixeira *et al.* 2009 [53], in which 13 single-locus topologies showed that the genus *Paracoccidioides* contains two highly divergent groups. As proposed by Teixeira and colleagues [53], these results reinforce the existence of two species for *Paracoccidioides* genus: *P. brasiliensis* (Pb18 and Pb3) and *P. lutzii* (Pb01).

Homology modeling of TRR1 and KRE2

In the absence of experimentally solved structures, computational methods were used to predict 3D protein models and provide information regarding protein functions and structures [54]. Homology modeling is efficient in new drug design, from the biological target conception through new drug discovery [55]. Of the four selected potential targets obtained from our comparative genomic analyses, only TRR1 and KRE2 showed a reasonable sequence identity to the templates found in PDB (Table 1). Consequently, we performed the homology modeling only for these two proteins.

According to the BLAST search performed on the entire PDB database, the thioredoxin reductase (TRR1) of *P. brasiliensis* showed good sequence identity with two templates, specifically 3ITJ (PDB ID) of *S. cerevisiae* (65% sequence identity) and 1VDC (PDB ID) of *Arabidopsis thaliana* (57% sequence identity). In the case of α -1,2-mannosyltransferase (KRE2) of *P. brasiliensis*, only the PDB template 1S4N (PDB ID) of *S. cerevisiae* showed a



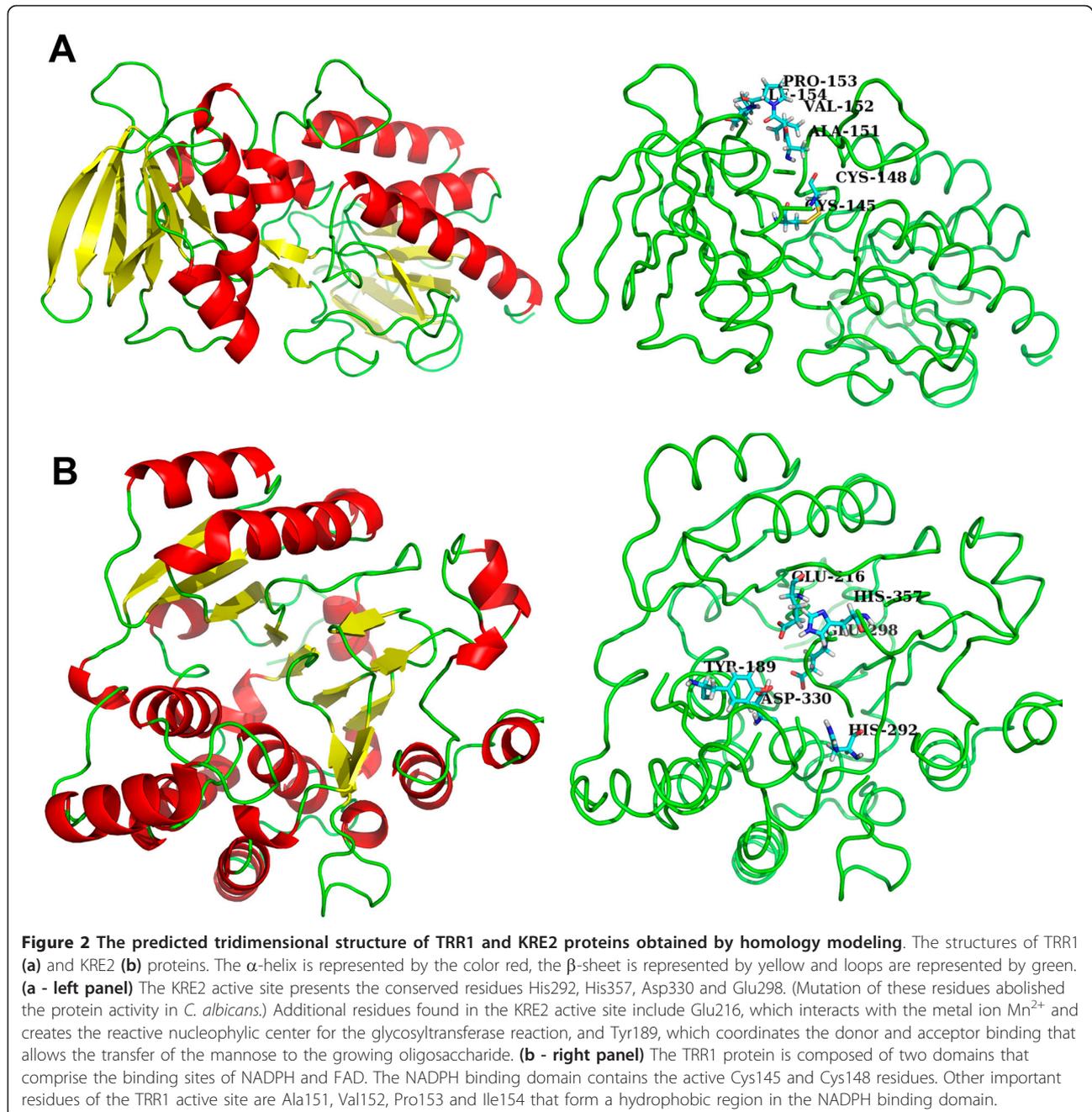
reasonable sequence identity (50%). Starting from the BLAST alignment between *P. brasiliensis* TRR1 and KRE2 proteins with the PDB templates as found above, we manually modified them in order to preserve the secondary structures and the correspondence between cysteine residues (Additional file 6a and 6b).

In these alignments between the target sequences and template structures, a fragment of the C-terminus region of TRR1 (Glu325-Leu358) and of the N-terminus region of KRE2 (Met1-Phe70) did not align. Therefore, a BLAST search with the fragment sequences was performed to verify if these regions had similarity with proteins deposited in the PDB. No confirmation was found, so these fragment terminus regions of TRR1 and KRE2

were removed from the models. This was legitimate, since these fragments are not involved in the active site of the proteins and should not interfere with the virtual screening that we intend to perform using these models.

The refinement of the homology models was obtained through molecular mechanics optimization; the stable structures of TRR1 and KRE2 are displayed in Figure 2. Figure 2a shows that the enzyme TRR1 has 9 helices and 17 sheets. Figure 2b shows that the enzyme KRE2 has 18 helices and 11 sheets.

The TRR1 monomeric protein of *S. cerevisiae* is composed of two domains that form the binding sites of NADPH and FAD similar to plants. The FAD molecule is bound to the *S. cerevisiae* TRR1 protein and is



stabilized by interactions with the residues Pro13, Glu33, Gln45, Asn54, Gln136, Asp288 and Gln296. The NADPH binding domain contains active cysteine residues and is linked to the FAD domain by a short β -sheet [56,57]. Figure 2a shows the two domains in the *P. brasiliensis* TRR1 model.

In KRE2 protein, the catalytic mechanism of the active site involves nucleophilic substitutions mediated by acidic amino acid residues and an essential Mn^{2+} cofactor. Heterologous expression of site-specific mutants of *C. albicans* MNT1 protein in *Pichia pastoris* confirmed

the nature of a nucleophilic reaction center, where the two conserved histidines (His292 and His357 in *P. brasiliensis*) that coordinated the metal ion cofactor Mn^{2+} and created the reactive nucleophilic center required the nonprocessing, GDP-mannose-dependent, retaining glycosyltransferase reaction [46]. However, Lobsanov and colleagues [47] examined the structure and catalysis mechanism of *S. cerevisiae* KRE2 enzyme (1S4N template) by crystallography and proposed a novel mechanism for this interaction, and the precise function for the conserved amino acids was determined by site-direct

mutagenesis by Thomson and colleagues [46]. The proposed mechanism of retaining glycosyltransferases such as CaMNT1p involves a two-step displacement. The first step involves attack on the sugar anomeric center by one of the carboxylates, and then a second carboxylate acts as the active site nucleophilic to displace the GDP from the sugar nucleotide, leading to formation of a glycosyl-enzyme intermediate. The metal ion Mn^{2+} is coordinated by a direct interaction of the residue glutamate (Glu216 in KRE2 protein of *P. brasiliensis*) as shown in Figure 2b, right panel. Transfer of the mannose to the growing oligosaccharide is completed by displacement of the enzyme from the intermediate by the hydroxyl group of the acceptor [46]; in *C. albicans* KRE2 protein, tyrosine (Tyr209) coordinates the donor and acceptor binding from the N-terminal domain and plays a role in the catalysis [47].

Conclusions

We reported a comparative genomic strategy to provide a list of potential antifungal drug targets for the human pathogenic fungi *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. immitis*, *C. neoformans* and *H. capsulatum*. The preferred profile for fungal targets was proteins conserved among these fungi, but absent in the human genome, aiming to minimize the potential toxic side effects exerted by pharmacological inhibition of the cellular targets. In general, the potential drug targets were selected following the criteria of essentiality, presence in all human pathogenic fungi considered here, absence in humans, be preferentially an enzyme, not be auxotrophic and have accessible cell localization.

In silico and manual mining provided four genes as potential drug targets: *trr1* that encodes for thioredoxin reductase, *rim8* that encodes for a protein involved in the proteolytic activation of a transcriptional factor in response to alkaline pH, *kre2* that encodes for α -1,2-mannosyltransferase and *erg6* that encodes for Δ -(24)-Sterol C-methyltransferase. The increase in structural databases allows the satisfactory prediction of structures by theoretical methods, with advantages over more costly experimental methods. We performed the homology modeling for the potential targets that were identified to have a known 3D structure and that showed good sequence identity to the templates found in PDB, TRR1 and KRE2. In the absence of structures solved experimentally, the available homology modeling tools were extremely useful for the structural prediction of the TRR1 and KRE2 proteins. From this first step of post-genomic analysis, we obtained relevant information for future technological development. Moreover, these results are being used to virtually screen chemical

libraries, which are under progress, generating new perspectives on technological development and innovation of antifungal agents to these human pathogens.

Methods

Comparative analysis of human pathogenic fungi genomes and drug target selection

The identification of potential drug targets was based on 55 genes experimentally confirmed as essential for *Candida albicans* [17] or *Aspergillus fumigatus* [18]. In these cases, the genes were experimentally confirmed as essential and represent a large spectrum of biological functions, such as cellular metabolism, cell wall organization and biogenesis, ergosterol biosynthesis, ribosomal biogenesis and post-translational modification of protein [17,18]. Other 2 genes (*kre2* and *erg6*) were added to the initial screening since they were described as potential drug targets [21].

The 57 gene sequences were retrieved from the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and were used to screen the *P. brasiliensis* Pb01 transcriptome database (<https://helix.biomol.unb.br/Pb/>) using blastn. The sequences of *Paracoccidioides lutzii* isolate Pb01 were not applied as a filter since all 57 genes were present and expressed in its genome/transcriptome. Subsequently, the presence of these genes in the 2 isolates of *P. brasiliensis* (Pb3 and Pb18) was confirmed. Using the isolate Pb01 sequence, released by Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/>), the orthologs search in other pathogenic fungi (*A. fumigatus* Af293, *B. dermatitidis* ER3, *C. albicans* WO1, *C. immitis* H538.4, *C. neoformans* serotype B, *H. capsulatum* NAM1) and human genome was completed using blastx because we have focused in the development of a new antifungal not only for the *Paracoccidioides* species but for all medically important fungi. The cut-off established for determining the presence of an ortholog was a maximum E-value of 0.00001 ($1e-5$). A manual curation was performed to select the potential drug targets following the criteria of essentiality, be present in pathogenic fungi, be absent in humans, be preferentially an enzyme, not be auxotrophic and have accessible cell localization.

Multiple alignments of the orthologs genes and phylogenetic analysis

Sequences were aligned by the ClustalW using dynamic programming and hierarchical methods [58] available in the BioEdit software [59]. The program identified conserved regions in the protein sequences between orthologs target genes by multiple sequence alignments.

The sequences were also used for phylogenetic analysis by Bayesian inference using Mr. Bayes software,

version 3.1.2 [60]. Detected gaps in sequence alignments were considered missing data and coded in terms of presence or absence. The amino acid substitution model selected was JTT [61]. The Markov Chain Monte Carlo (MCMC) was initiated from a random tree and processed for 1000000 generations; sample trees were retrieved every 1000 generations. Log-likelihood values were plotted against the generation number, and the first 25% of samples were discarded ("burn-in"). The remaining samples were used to determine the distribution of posterior probability values. Phylogenetic trees were produced with the help of the Treeview and Figtree 1.0 software.

Protein structure prediction

There is no crystallographic structure presently available for TRR1 and KRE2 of *P. brasiliensis* and also for the other pathogenic fungi. Therefore, the 3D structures of TRR1 and KRE2 of *P. brasiliensis* were constructed by homology modeling based on known structures with high percentage of identity in amino acid sequences. We have initially modeled *P. brasiliensis* proteins but it will be similar for the other pathogenic fungi since the sequences of the proteins are highly conserved. The known template structures were searched in the PDB. There were two templates for TRR1 protein: 3ITJ (PDB ID) of *S. cerevisiae* and 1VDC (PDB ID) of *A. thaliana*. There was one template for KRE2 protein: 1S4N (PDB ID) of *S. cerevisiae*. The templates structures for ERG6 and RIM8 showed low sequence identity, then not allowed the construction of 3D structures for these proteins by molecular modeling. The amino acid residue sequences of TRR1 and KRE2 were compared with the primary sequences of the structures deposited in the PDB using the BLAST program. The homologous sequences allowed the construction of a 3D model of TRR1 and KRE2 using the homology module of the Insight II software package (Biosym/MSI, San Diego, Accelrys Inc. 2001). Briefly, the target sequences were aligned with the template structures, and coordinates from the templates were transferred to the targets TRR1 and KRE2. For model optimization, the backbone atoms of the structures were initially frozen and only the side chains were allowed to move for a selective minimization by conjugate gradient method. A second selective minimization, also by conjugate gradient method, was performed with only atoms of the complementary determining region (CDR) loops moving. The last minimization was performed by Steepest-descent method with all atoms of the structure relaxed, resulting in whole, refined 3D structures. The molecular visualization was performed by PyMOL open-source software version 0.99rc6 (Delano Scientific LLC, 2006).

Additional material

Additional file 1: Essential genes found in *C. albicans* and/or *A. fumigatus* and orthologs in other human pathogenic fungi.

Additional file 2: Amino acid alignment between conserved protein residues of TRR1, in the human pathogenic fungi. Amino acid sequence analysis of TRR1 protein. Af: *Aspergillus fumigatus*, Bd: *Blastomyces dermatitidis*, Ca: *Candida albicans*, Ci: *Coccidioides immitis*, Cn: *Cryptococcus neoformans*, Hc: *Histoplasma capsulatum*, Pb01: *Paracoccidioides brasiliensis* isolate 01, Pb3: *P. brasiliensis* isolate 3, Pb18: *P. brasiliensis* isolate 18. Positions of identity are indicated with asterisks, a semicolon indicates conserved substitutions, and a dot shows a semi-conservative substitution.

Additional file 3: Amino acid alignment between conserved protein residues of RIM8, in the human pathogenic fungi. Amino acid sequence analysis of RIM8 protein. Af: *Aspergillus fumigatus*, Bd: *Blastomyces dermatitidis*, Ca: *Candida albicans*, Ci: *Coccidioides immitis*, Cn: *Cryptococcus neoformans*, Hc: *Histoplasma capsulatum*, Pb01: *Paracoccidioides brasiliensis* isolate 01, Pb3: *P. brasiliensis* isolate 3, Pb18: *P. brasiliensis* isolate 18. Positions of identity are indicated with asterisks, a semicolon indicates conserved substitutions, and a dot shows a semi-conservative substitution.

Additional file 4: Amino acid alignment between conserved protein residues of KRE2, in the human pathogenic fungi. Amino acid sequence analysis of KRE2 protein. Af: *Aspergillus fumigatus*, Bd: *Blastomyces dermatitidis*, Ca: *Candida albicans*, Ci: *Coccidioides immitis*, Cn: *Cryptococcus neoformans*, Hc: *Histoplasma capsulatum*, Pb01: *Paracoccidioides brasiliensis* isolate 01, Pb3: *P. brasiliensis* isolate 3, Pb18: *P. brasiliensis* isolate 18. Positions of identity are indicated with asterisks, a semicolon indicates conserved substitutions, and a dot shows a semi-conservative substitution.

Additional file 5: Amino acid alignment between conserved protein residues of ERG6, in the human pathogenic fungi. Amino acid sequence analysis of ERG6 protein. Af: *Aspergillus fumigatus*, Bd: *Blastomyces dermatitidis*, Ca: *Candida albicans*, Ci: *Coccidioides immitis*, Cn: *Cryptococcus neoformans*, Hc: *Histoplasma capsulatum*, Pb01: *Paracoccidioides brasiliensis* isolate 01, Pb3: *P. brasiliensis* isolate 3, Pb18: *P. brasiliensis* isolate 18. Positions of identity are indicated with asterisks, a semicolon indicates conserved substitutions, and a dot shows a semi-conservative substitution.

Additional file 6: Manual alignments performed between *P. brasiliensis* proteins and the PDB templates. (a) TRR1 protein and templates 3ITJ and 1VDC. The boxes represent the template regions that were used as references for the homology modeling of TRR1 protein. In the alignment between TRR1 protein and the templates, the big boxes indicate that the 1VDC template was used as reference and the small box indicates that the reference was the 3ITJ template. Considering the global alignment, 3ITJ is the best template to use as a reference to perform the homology modeling of *P. brasiliensis* TRR1 protein. However, some regions of the 1VDC template present identical amino acids to *P. brasiliensis* TRR1 protein, and those are different in the 3ITJ template. The following colors represent amino acids: white (identical amino acids between TRR1 protein and the two templates), green (identical amino acids between TRR1 protein and 1VDC template), red (identical amino acids between TRR1 protein and 3ITJ template), orange (unique amino acids in 3ITJ template), dark blue (unique amino acids in 1VDC template), and light blue (unique amino acids in TRR1 protein). The cysteine residues that form the disulfide bonds are conserved between TRR1 protein and the two templates. (b) KRE2 protein and template 1S4N. The boxes represent the template regions that were used as references for the homology modeling of KRE2 protein. In the alignment between KRE2 protein and the 1S4N template, the boxes indicate the regions that were used as references for 3D structure construction of KRE2. The following colors represent amino acids: white (identical amino acids between KRE2 protein and the template), purple (similar amino acids between KRE2 protein and the template), red (unique amino acids in KRE2 protein), and light blue (unique amino acids in 1S4N template). The cysteine residues that form the disulfide bonds are conserved between KRE2 protein and the template.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Brazilian Agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAP-DF (Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal) for financial support.

Author details

¹Department of Cellular Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil.
²Embrapa - Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil. ³Lorrain Laboratory of Computing Research and its Applications, University Henri Poincaré-Nancy I, Nancy, France.

Authors' contributions

AA, NM, MF and EK planned and designed the study, developed the experiments and completed the data analysis, wrote the main draft of the paper and supported the preparation of the figures and tables. BM participated in the homology modeling experiments and helped in the manuscript editing. MT participated in the phylogenetic analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 26 August 2010 Accepted: 27 January 2011

Published: 27 January 2011

References

- McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW: Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 2001, **33**:641-647.
- Alvez F, Figueras C, Roselló E: Emerging invasive fungal infections. *An Pediatr (Barc)* 2010, **73**:52.e1-52.e6.
- Sable CA, Strohmaier KM, Chodakewitz JA: Advances in antifungal therapy. *Annu Rev Med* 2008, **59**:361-379.
- Chapman SW, Sullivan DC, Cleary JD: In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2008, **119**:197-215.
- Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ: Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* 2009, **69**:361-92.
- Brüggemann RJ, Alffenaar JW, Blijlevens NM, Billaud EM, Kosterink JG, Verweij PE, Burger DM: Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clin Infect Dis* 2009, **48**:1441-58.
- Fera MT, La Camera E, De Sarro A: New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert review of anti-infective therapy* 2009, **7**:981-998.
- Wong-Beringer A, Jacobs RA, Guglielmo BJ: Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis* 1998, **27**:603-18.
- Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC, Proffitt RT: Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:259-268.
- Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DL, Simioni AR, Primo FL, Lacava ZG, Bentes R, Titz-de-Almeida R, Tedesco AC, Morais PC, Felipe MS: Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *J Antimicrob Chemother* 2009, **63**:526-533.
- Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL: How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2010, **9**:203-14.
- Jung K, Park J, Choi J, Park B, Kim S, Ahn K, Choi J, Choi D, Kang S, Lee YH: SNUGB: a versatile genome browser supporting comparative and functional fungal genomics. *BMC Genomics* 2008, **9**:586.
- Janaki C, Joshi RR: Accelerating Comparative Genomics Using Parallel Computing. *In Silico Biology* 2003, **3**:429-440.
- White TA, Kell DB: Comparative genomic assessment of novel broad-spectrum targets for antibacterial drugs. *Comp Funct Genomics* 2004, **5**:304-327.
- Kumar S, Chaudhary K, Foster JM, Novelli JF, Zhang Y, Wang S, Spiro D, Ghedin E, Carlow CKS: Mining Predicted Essential Genes of *Brugia malayi* for Nematode Drug Targets. *PLoS ONE* 2007, **2**:e1189.
- Caffrey CR, Rohwer A, Oellien F, Marhöfer RJ, Braschi S, Oliveira G, McKerrow JH, Selzer PM: A comparative chemogenomics strategy to predict potential drug targets in the metazoan pathogen, *Schistosoma mansoni*. *PLoS One* 2009, **4**:e4413.
- Roemer T, Jiang B, Davison J, Ketela T, Veillette K, Breton A, Tandia F, Linseau A, Sillaots S, Marta C, Martel N, Veronneau S, Lemieux S, Kauffman S, Becker J, Boone C, Bussey H: Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Molecular Microbiology* 2003, **50**:167-181.
- Hu W, Sillaots S, Lemieux S, Davison J, Kauffman S, Breton A, Linseau A, Xin C, Bowman J, Becker J, Jiang B, Roemer T: Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 2007, **3**:e24.
- Buurman ET, Westwater C, Hube B, Brown AJ, Odds FC, Gow NA: Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyltransferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:7670-5.
- Jensen-Pergakes KL, Kennedy MA, Lees ND, Barbuch R, Koegel C, Bard M: Sequencing, Disruption, and Characterization of the *Candida albicans* Sterol Methyltransferase (ERG6) Gene: Drug Susceptibility Studies in erg6 Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998, **42**:1160-1167.
- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brígido MM, PbGenome Network: Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 2005, **280**:24706-24714.
- Williams CH, Arscott LD, Muller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang PF, Veine DM, Becker K, Schirmer RH: Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* 2000, **267**:6110-6117.
- Arnér ES, Holmgren A: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000, **267**:6102-6109.
- Missall TA, Lodge JK: Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 2005, **4**:487-9.
- Krnajski Z, Gilberger TW, Walter RD, Cowman AF, Muller S: Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *J Biol Chem* 2002, **277**:25970-25975.
- Uziel O, Borovok I, Schreiber R, Cohen G, Aharonowitz Y: Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. *J Bacteriol* 2004, **186**:326-334.
- Machado AK, Morgan BA, Merrill GF: Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1997, **272**:17045-17054.
- Pearson GD, Merrill GF: Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* 1998, **273**:5431-5434.
- Peñalva MA, Arst HN Jr: Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002, **66**:426-446.
- Herranz S, Rodríguez JM, Bussink HJ, Sánchez-Ferrero JC, Arst HN Jr, Peñalva MA, Vincent O: Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:12141-12146.
- Davis D, Edwards JE Jr, Mitchell AP, Ibrahim AS: *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 2000, **68**:5953-5959.
- Lussier M, Sdicu AM, Ketela T, Bussey H: Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment. *J Cell Biol* 1995, **131**:913-927.
- Häusler A, Ballou L, Ballou CE, Robbins PW: Yeast glycoprotein biosynthesis: MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**:6846-6850.
- Hill K, Boone C, Goebel M, Puccia R, Sdicu AM, Bussey H: Yeast KRE2 Defines a New Gene Family Encoding Probable Secretory Proteins, and Is Required for the Correct N-Glycosylation of Proteins. *Genetics* 1992, **130**:273-283.
- Lussier M, Sdicu AM, Bussereau F, Jacquet M, Bussey H: The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**:15527-15531.
- Wagener J, Echtenacher B, Rohde M, Kotz A, Krappmann S, Heesemann J, Ebel F: The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the

- opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell* 2008, **7**:1661-1673.
37. Munro CA, Bates S, Buurman ET, Hughes HB, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Bain JM, Brand A, Hamilton S, Westwater C, Thomson LM, Brown AJ, Odds FC, Gow NA: Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* 2005, **280**:1051-1060.
 38. McCammon MT, Hartmann Ma, Bottema CD, Parks LW: Sterol methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 1984, **157**:475-483.
 39. Natter K, Leitner P, Faschinger A, Wolinski H, McCraith S, Fields S, Kohlwein SD: The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:662-672.
 40. Nes WD, Janssen GG, Bergenstrahle A: Structural requirements for transformation of substrates by the (S)-adenosyl-L-methionine:delta 24 (25)-sterol methyl transferase. *J Biol Chem* 1991, **266**:15202-15212.
 41. Gaber RF, Copple DM, Kennedy BK, Vidal M, Bard M: The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Molecular and Cellular Biology* 1989, **9**:3447-3456.
 42. Zweytick D, Leitner E, Kohlwein SD, Yu C, Rothblatt J, Daum G: Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 2000, **267**:1075-1082.
 43. Young LY, Hull CM, Heitman J: Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:2717-2724.
 44. Veine DM, Mulrooney SB, Wang PF, Williams CH Jr: Formation and properties of mixed disulfides between thioredoxin reductase from *Escherichia coli* and thioredoxin: evidence that cysteine-138 functions to initiate dithiol-disulfide interchange and to accept the reducing equivalent from reduced flavin. *Protein Sci* 1998, **7**:1441-50.
 45. Zhang Z, Bao R, Zhang Y, Yu J, Zhou CZ, Chen Y: Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic thioredoxin reductase Trr1 reveals the structural basis for species-specific recognition of thioredoxin. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1794**:124-128.
 46. Thomson LM, Bates S, Yamazaki S, Arisawa M, Aoki Y, Gow NA: Functional characterization of the *Candida albicans* MNT1 mannosyltransferase expressed heterologously in *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* 2000, **275**:18933-8.
 47. Lobsanov YD, Romero PA, Sleno B, Yu B, Yip P, Herscovics A, Howell PL: Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J Biol Chem* 2004, **279**:17921-17931.
 48. Nes WD, McCourt BS, Zhou W, Ma J, Marshall JA, Peek LA, Brennan M: Overexpression, purification, and stereochemical studies of the recombinant (S)-adenosyl-L-methionine: D24(25)- to D24(28)-sterol methyl transferase enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 1998, **353**:297-311.
 49. Nes WD, Marshall JA, Jia Z, Jaradat TT, Song Z, Jayasimha P: Active site mapping and substrate channeling in the sterol methyltransferase pathway. *J Biol Chem* 2002, **277**:42549-56.
 50. Nes WD, McCourt BS, Marshall JA, Ma J, Dennis AL, Lopez M, Li H, He L: Site-directed mutagenesis of the sterol methyl transferase active site from *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of novel 24-ethyl sterols. *J Org Chem* 1999, **64**:1535-1542.
 51. Nes WD: Enzyme redesign and interactions of substrate analogues with sterol methyltransferase to understand phytosterol diversity, reaction mechanism and the nature of the active site. *Biochem Soc Trans* 2005, **33**:1189-1196.
 52. Ganapathy K, Jones CW, Stephens CM, Vatsyayan R, Marshall JA, Nes WD: Molecular probing of the *Saccharomyces cerevisiae* sterol 24-C methyltransferase reveals multiple amino acid residues involved with C2-transfer activity. *Biochim Biophys Acta* 2008, **1781**:344-351.
 53. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS: Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 2009, **52**:273-83.
 54. Cavasotto CN, Phatak SS: Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov Today* 2009, **14**:676-683.
 55. Marshall GR: Introduction to cheminformatics in drug discovery - A personal view. In *Cheminformatics in drug discovery. Volume 23*. Edited by: Tudor I, Oprea, Weinhein: WILEY-VHC; 2004, ISBN: 3-527-30753-2.
 56. Dai S, Saarienen M, Ramaswamy S, Meyer Y, Jacquot JP, Eklund H: Crystal Structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH Dependent Thioredoxin Reductase at 2.5 Å Resolution. *J Mol Biol* 1996, **264**:1044-1057.
 57. Oliveira MA, Discola KF, Alves SV, Medrano FJ, Guimarães BG, Netto LES: Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry* 2010, **49**:3317-3326.
 58. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-80.
 59. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.
 60. Ronquist F, Huelsenbeck JP: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003, **19**:1572-4.
 61. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM: The Rapid Generation of Mutation Data Matrices from Protein Sequences. *Comput Appl Biosci* 1992, **8**:275-282.

doi:10.1186/1471-2164-12-75

Cite this article as: Abadio et al.: Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics* 2011 **12**:75.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

