



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL

EVELINY ABREU DE ANDRADE VIEIRA

24 Δ -ESTEROL METILTRANSFERASE DE *Sporothrix schenckii* :
CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE UM ALVO BIOTECNOLÓGICO
PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE

FORTALEZA – CEARÁ

2018

EVELINY ABREU DE ANDRADE VIEIRA

**24 Δ -ESTEROL METILTRANSFERASE DE *Sporothrix schenckii* :
CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE UM ALVO BIOTECNOLÓGICO
PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Helena Carla Castro Cardoso de Almeida.

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Alves Miceli.

FORTALEZA – CEARÁ

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas**

Vieira, Evelyny Abreu de.

24?-Esterol metiltransferase de *Sporothrix schenckii* : caracterização in silico de um alvo biotecnológico para o tratamento da esporotricose [recurso eletrônico] / Evelyny Abreu de Vieira. -2018.

1 CD-ROM: il.; 4 $\frac{3}{4}$ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 95 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado profissional) -Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza, 2018.

Área de concentração: Medicina Veterinária.

Orientação: Prof.^a Ph.D. Helena Carla Castro Cardoso de Almeida.

Coorientação: Prof. Dr. Leonardo Alves Miceli.

1. Modelagem molecular. 2. Zoonose. 3. Fungo. I.Título.

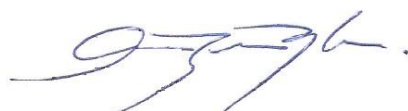
EVELINY ABREU DE ANDRADE VIEIRA

**24 Δ -ESTEROL METILTRANSFERASE DE *Sporothrix schenckii* :
CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE UM ALVO BIOTECNOLÓGICO
PARA O TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE**

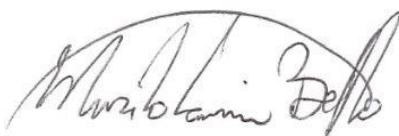
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Medicina Veterinária.

Aprovada em: 04 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Andrea Regina de Souza Baptista
Universidade Federal Fluminense – UFF



Prof. Dr. Murilo Lamin Bello
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Universidade Federal Fluminense – UFF

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o grande mentor de toda a criação. Aos meus pais Elizeu e Pascoalina, por me darem todo apoio para a realização de meu sonho. Ao meu filhinho Isaac, por me ensinar a ser uma pessoa questionadora. À minha irmã Danielle, que sempre acreditou em mim. Aos meus orientadores, por me ensinarem que a docência é uma missão que requer paciência e dedicação. À MPBiotec por me fornecer tantos conhecimentos. À Universidade Federal Fluminense, por ter cedido a mim professores altamente capacitados. Às bancas examinadoras, por terem exercido sua função com justiça e profissionalismo. E a todos os amigos e colaboradores que me incentivaram a vencer mais uma etapa de minha vida.

“O começo de todas as ciências é o
espanto de as coisas serem o que são”.

(Aristóteles)

RESUMO

A Esporotricose é uma infecção fúngica causada por alguns membros do complexo *Sporothrix* cuja escala epidêmica está se tornando preocupante, principalmente no estado do Rio de Janeiro. Visando o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento da esporotricose, este trabalho se propôs a utilizar a bioinformática, também conhecida como biotecnologia ouro, para caracterizar através da construção de um modelo estrutural *in silico* a 24 Δ -esterol metiltransferase (24SMT), enzima com papel importante na síntese da membrana e um grande potencial para ser um alvo biotecnológico, tendo como resultado principal um modelo a ser utilizado em projetos de P&D de novos antifúngicos usando uma abordagem computacional comparativa. O modelo 3D da 24SMT foi construído por homologia utilizando dois programas de modelagem molecular (Swiss Model e I-Tasser) e diferentes templates, buscando selecionar aqueles que permitiriam conservar as características indicadas por estudos experimentais descritos na literatura. O alinhamento de sequência primária, a predição de sítio ativo e a modelagem confirmaram regiões conservadas e relação próxima de outras metiltransferases. A comparação dos modelos 3D mostrou uma conservação global da topologia 2D e das estruturas com diferentes áreas de superfície acessíveis a solvente e potenciais eletrostáticos dessa família de enzimas. Embora a estrutura da 24SMT mantenha as principais características de uma metiltransferase típica, essa proteína também apresenta algumas diferenças, devido principalmente a inserções e deleções de sequências (ex: loop 90-115) como revelado pela análise estrutural realizada neste estudo. Essas diferenças podem ser exploradas para o desenho de novos fármacos mais específicos, evitando o processo de multiresistências.

Palavras-chave: Modelagem molecular. Zoonose. Fungo.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a fungal infection caused by some members of the *Sporothrix* complex whose epidemic scale is becoming a concern, especially in the state of Rio de Janeiro. Aiming to develop more effective and less toxic medicines for the treatment of sporotrichosis, this work has proposed to use bioinformatics, also known as gold biotechnology, to characterize by building a structural model in silico to 24 Δ -sterol methyltransferase (24SMT), an enzyme with important role in membrane synthesis and a great potential to be a biotechnological target, with the main result being a model to be used in R & D projects of new antifungals using a comparative computational approach. The 3D model of the 24SMT was constructed by homology using two molecular modeling programs (Swiss Model and I-Tasser) and different templates, seeking to select those that would allow to preserve the characteristics indicated by experimental studies described in the literature. Primary sequence alignment, active site prediction, and modeling confirmed conserved regions and close relationship to other methyltransferases. The comparison of 3D models showed an overall conservation of the 2D topology and structures with different solvent accessible surface areas and electrostatic potential of this family of enzymes. Although the structure of 24SMT retains the main characteristics of a typical methyltransferase, this protein also exhibits some differences, mainly due to insertions and deletions of sequences (eg loop 90-115) as revealed by the structural analysis performed in this study. These differences can be explored to design more specific new medicines, avoiding the multiresistance process.

Keywords: Molecular modeling. Zoonosis. Fungus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1 - | Distribuição Global e incidência relativa da esporotricose..... | 16 |
| Figura 2 - | Apresentações clínicas da Esporotricose em humanos. (a) linfocutânea, (b) cutânea fixa, (c) lesões ulceradas em paciente que dormia com seu gato, (d) esporotricose oro-labial em paciente que beijava seu gato..... | 17 |
| Figura 3 - | Antifúngicos de primeira escolha (A) e de segunda escolha, e caso de resistência (B) no tratamento da Esporotricose grupamento azol está circulado em vermelho na estrutura dos antifúngicos da classe dos azóis..... | 18 |
| Figura 4 - | Programa de validação Ramachandran. Gráficos gerados e utilizados para a validação de modelos mostrando as diferentes regiões sombreadas de acordo com o quanto as combinações de ângulos phi-psi são favoráveis. Em (A) a versão original do programa (1992) e (B) uma versão posterior atualizada baseada em um conjunto de dados mais nova (1998), incluindo mais estruturas de alta resolução..... | 50 |
| Figura 5 - | Etapas da execução do projeto..... | 53 |
| Figura 6 - | Sequência da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do <i>Sporothrix schenckii</i> utilizada para a construção do modelo por homologia..... | 54 |
| Figura 7 - | Ambiente do programa I-Tasser (acima) e Swiss Model (abaixo) gratuito para instituições acadêmicas..... | 55 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 8 - | Domínios conservados da superfamília SMT ADOMET dependente detectados na sequência da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do <i>Sporothrix schenckii</i> utilizada para a construção do modelo por homologia utilizando o programa CD search do site NCBI..... | 57 |
| Figura 9 - | Escore <i>T-coffee</i> resultante da comparação das sequências dos templates sugeridos pelo Swiss Model (esquerda) e pelo I-Tasser (Direita) com a sequência da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do <i>Sporothrix schenckii</i> a ser utilizada para a construção do modelo por homologia..... | 58 |
| Figura 10 - | Alinhamento múltiplo das sequências dos templates do <i>Swiss Model</i> (acima) e do <i>I Tasser</i> (abaixo) com a 24SMT do <i>S. Schenckii</i> | 59 |
| Figura 11 - | <i>Motifs</i> resultantes do alinhamento entre a proteína homóloga e os templates do <i>Swiss Model</i> (acima) e do <i>I-tasser</i> (abaixo)..... | 61 |
| Figura 12 - | Estrutura 3D dos templates selecionados pelo <i>Swiss Model</i> em 3D (-) e pelo I-Tasser (.) para a construção do modelo do 24 SMT..... | 64 |
| Figura 13 - | Comparação do mapa de potencial eletrostático da superfície dos templates selecionados pelo Swiss Model e pelo I Tasser..... | 65 |
| Figura 14 - | Análise da qualidade da estrutura do template 4iv0 através do Gráfico de Ramachandran..... | 67 |
| Figura 15 - | Análise da qualidade da estrutura do template 1kph através do Gráfico de Ramachandran..... | 68 |
| Figura 16 - | Zoom do Sítio de ligação do template 1kph, mostrando os aminoácidos envolvidos na reatividade enzimática..... | 69 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 17 - | Zoom do Sítio de ligação do template 4iv0, mostrando os aminoácidos envolvidos na rede de interações necessárias para a reatividade enzimática..... | 70 |
| Figura 18 - | Alinhamentos entre modelos 1 e 2 os seus templates 1kph e 4iv0..... | 71 |
| Figura 19 - | Análise da qualidade da estrutura do modelo 1 através do Gráfico de Ramachandran..... | 72 |
| Figura 20 - | Análise da qualidade da estrutura do modelo 2 através do Gráfico de Ramachandran..... | 73 |
| Figura 21 - | Alinhamento múltiplo da sequência do modelo 2 do 24SMT com a de outros microorganismos de importância médica e/ou econômica, incluindo: <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Neosartorya fumigata</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Sporothrix brasiliensis</i> , <i>Ashbya gossypii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Candida albicans</i> | 74 |
| Figura 22 - | Comparação dos mapas de potencial eletrostático do modelo 2 da 24 SMT (maior acima) e dos <i>templates</i> (menor abaixo) apontados pelos programas de modelagem por homologia pela similaridade estrutural. Carga positiva em azul, carga negativa em vermelho, alfa-helice em vermelho e beta - pregueada em verde..... | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Alguns programas utilizados na área de construção modelos por modelagem comparativa ou por homologia..... | 40 |
| Tabela 2 - | Comparação do alinhamento dos <i>templates</i> com os respectivos modelos da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do <i>S.schenckii</i> para a obtenção do RMSD (RMSD = Raiz do Desvio Médio Quadrático = Å)..... | 63 |
| Tabela 3 - | Classificação dos <i>templates</i> por estequiometria, proteína e microrganismo..... | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| YNB | <i>Yeast Nitrogen Base</i> |
| PDA | <i>Potato Dextrose Agar</i> |
| STI | Espaçador Interno Contínuo |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PAMPs | Padrões Moleculares Associados aos Patógenos |
| PRRs | Receptores de Reconhecimento de Padrões |
| CoA | Coenzima A |
| 24-SMT | 24-Esterol Metiltransferase |
| 14DM | 14-Demetilase |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| MD | <i>Molecular Dynamics</i> |
| PCA | <i>Principal Component Analysis</i> |
| SAR | <i>Structure-Activity Relationship</i> |
| BPTI | Tripsina Pancreática Bovina |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| NAS | Academia Nacional de Ciências |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| PDB | <i>Protein Database</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information,</i> |
| RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> |
| SPDBV | <i>Swiss PDB Viewer</i> |
| ADOMET | S- Adenosil L-Metionina |
| MEME | <i>Multiple EM for Motif Elicitation</i> |
| C | Carbono |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|---------------|
| Δ | Delta |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Célsius |
| % | Por Cento |
| Å | Ângstrons |
| α | Alfa |
| b | Beta |

SUMÁRIO

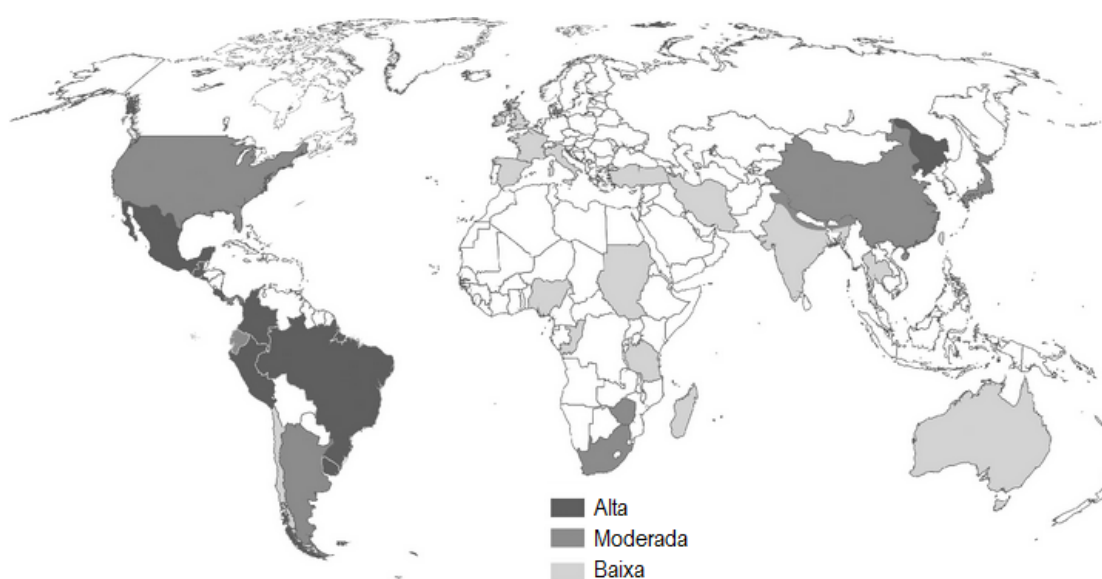
| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | A ESPOROTRICOSE E O <i>Sporothrix</i> : BREVE APRESENTAÇÃO | 16 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 19 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 3.1 | O FUNGO “ <i>Sporothrix</i> ”..... | 22 |
| 3.2 | ESPOROTRICOSE..... | 23 |
| 3.3 | EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL..... | 24 |
| 3.4 | IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA..... | 27 |
| 3.5 | PATOGENIA..... | 28 |
| 3.6 | FORMAS DE DIAGNÓSTICO..... | 29 |
| 3.7 | FORMAS DE TRATAMENTO..... | 30 |
| 3.8 | ENZIMAS-ALVO DO <i>Sporothrix</i> | 31 |
| 3.9 | ENZIMA 24 Δ -ESTEROL METILTRANSFERASE (24 SMT)..... | 33 |
| 3.10 | MODELAGEM MOLECULAR: UMA FERRAMENTA DA BIOINFORMÁTICA..... | 35 |
| 4 | OBJETIVOS | 52 |
| 4.1 | GERAL..... | 52 |
| 4.2 | ESPECÍFICOS..... | 52 |
| 5 | METODOLOGIA | 53 |
| 5.1 | MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA 24 Δ - ESTEROL METILTRANSFERASE DO <i>Sporothrix schenckii</i> | 54 |
| 5.2 | VALIDAÇÃO DO MODELO POR HOMOLOGIA | 56 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 7 | CONCLUSÃO | 80 |
| | REFERÊNCIAS | 81 |
| | APÊNDICE | 95 |
| | APÊNDICE A - ARTIGO PARA SUBMISSÃO..... | 96 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESPOROTRICOSE E O *Sporothrix*: BREVE APRESENTAÇÃO

A esporotricose é uma infecção fúngica de implantação traumática endêmica em regiões tropicais e subtropicais, mas que pode ser encontrada em vários outros países (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; CHARLES *et al.*, 2017; LEE e LAU, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição Global e incidência relativa da esporotricose.



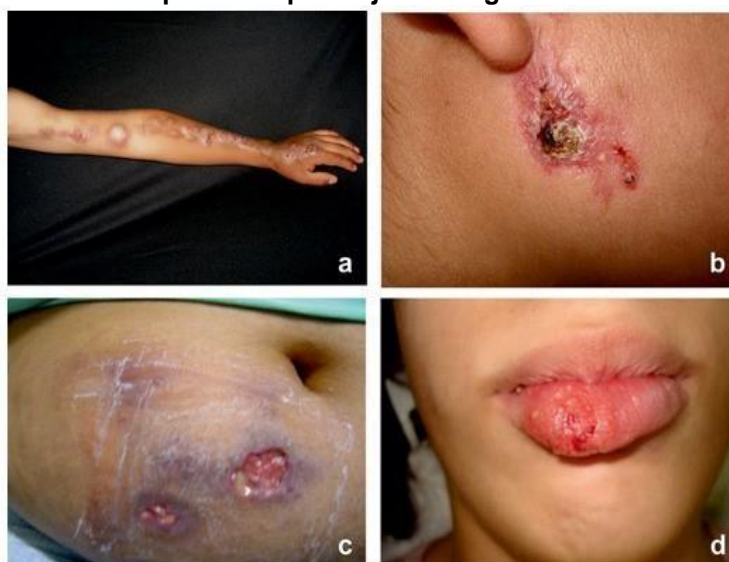
Fonte: Adaptada de Chakrabarti *et al.*, 2015.

O complexo *Sporothrix* reúne os agentes etiológicos da esporotricose que afetam humanos e vários animais domésticos e não domésticos como cães, gatos, suínos, caprinos, equinos, bovinos, ratos, golfinhos e alguns animais silvestres (QUINN *et al.*, 2007; SCHUBACH *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2006; MADRID *et al.*, 2007). Essa infecção fúngica consiste em uma micose subcutânea que pode envolver outros sítios como vasos linfáticos, músculos, fáscias, cartilagens e ossos (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; TELLEZ *et al.*, 2014; ZHONGMING e NIELSEN, 2017; CHARLES *et al.*, 2017).

No Brasil, em especial no Rio de Janeiro, as espécies causadoras da esporotricose são *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo essa última a espécie mais patogênica e virulenta, envolvendo inclusive casos de pacientes humanos (Figura

2) imunodeprimidos (ex: HIV- positivos). A infecção pelo fungo dá-se por inoculação dos conídios através de injúrias ao manipular terra e plantas, havendo também casos descritos de transmissão zoonótica - por arranhões, mordidas e contatos muito próximos com gatos infectados - particularmente no Brasil (SCHUBACH *et al.*, 2001; BARROS *et al.*, 2011; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; EYER-SILVA *et al.*, 2017; GREMIÃO *et al.*, 2017).

Figura 2 - Apresentações clínicas da Esporotricose em humanos. (a) linfocutânea, (b) cutânea fixa, (c) lesões ulceradas em paciente que dormia com seu gato, (d) esporotricose oro- labial em paciente que beijava seu gato.



Fonte: Adaptada de Chakrabarti *et al.*, 2015.

O fungo em questão apresenta estrutura celular comum a todos os fungos sendo sua parede celular composta por carboidratos, incluindo macromoléculas de quitina com ligações cruzadas de celulose na sua forma de hifas, na forma de levedura a parede celular contém proteína complexada com polissacarídeos e uma série de compostos lipídicos. Na bicamada da membrana celular, o esterol predominante é o ergosterol (QUINN *et al.*, 2002).

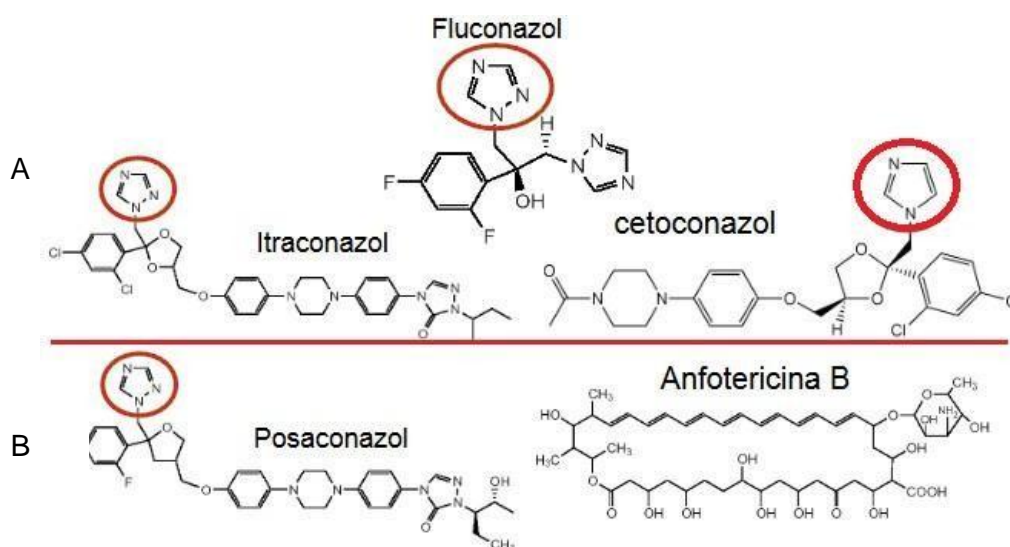
A parede celular é a principal estrutura dos fungos envolvida na interação com o hospedeiro e sua imunogenicidade é mediada por uma variedade de moléculas que incluem glicoproteínas, polissacarídeos, lipídios e pigmentos (PONTÓN *et al.*, 2001; GOYAL *et al.*, 2018; CASSILLY e REYNOLDS, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018). Esse padrão de imunogenicidade torna essas moléculas possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes sorológicos para o diagnóstico e tratamento da esporotricose (RUIZ-BACA *et al.*, 2009;

TEIXEIRA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2018).

Assim, as formas de diagnóstico mais utilizadas são os exames diretos de exudatos purulentos de lesões de gatos para a observação da forma leveduriforme (QUINN *et al.*, 2007), o cultivo do fungo em ágar Sabouraud com dextrose para demonstração do dimorfismo (KAUFFMAN *et al.*, 1999; MORRIS *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2011), ainda a análise histopatológica, apesar de menos específica (KAUFFMAN, 2006; RODRIGUES, 2015; CHARLES *et al.*, 2017; ARENAS *et al.*, 2018; TIRADO-SÁNCHEZ E BONIFAZ, 2018) e ensaios de imunoabsorção enzimática *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) tem demonstrado boa confiabilidade (TORIELLO *et al.*, 1992).

A forma de tratamento mais utilizada para essa infecção se constitui na administração na alimentação de uma solução saturada de potássio iodado, bastante comum em países de terceiro mundo devido ao baixo custo, e o uso dos azoles itraconazol, fluconazol e cetoconazol, sendo o itraconazol mais utilizado devido à sua alta taxa de sucesso no tratamento (Figura 3). Outras alternativas utilizadas quando há resistência ou intolerância são a terbinafina, a anfotericina-B, a flucitosina e o ainda pouco estudado nesse quadro patológico, posaconazol ou ruconazol (MAHAJAN, 2014; STOPIGLIA *et al.*, 2014; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017; VETTORATO *et al.*, 2018).

Figura 3 - Antifúngicos de primeira escolha (A) e de segunda escolha, em caso de resistência (B) no tratamento da Esporotricose. O grupamento azol está circulado em vermelho na estrutura dos antifúngicos da classe dos azóis.



Fonte: Arquivo Pessoal

2 JUSTIFICATIVA

Na últimas décadas a esporotricose tem ressurgido como uma infecção fúngica importante, principalmente devido à mudanças em questões cruciais como o padrão epidemiológico, distribuição global, evolução taxonômica e ocorrência de múltiplos surtos (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; EYER-SILVA *et al.*, 2017; CASSILLY e REYNOLDS, 2018).

No Brasil, especialmente no Rio de Janeiro, a esporotricose espalhou-se a ponto de tornar-se um problema de saúde pública, considerando-se que tanto as pessoas como os animais acometidos são das classes mais desfavorecidas e carecem de tratamento gratuito fornecido pelo governo, o que onera os cofres públicos. A disseminação dessa doença para outros estados devido ao alto turismo no Rio de Janeiro e a forte virulência do fungo também são fatores preocupantes. Além disso, o tratamento tem longa duração, não sendo de dose única, dificultando a continuidade e a conclusão do tratamento, principalmente dos animais infectados (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; Lee e Yu-Lung, 2017).

A esporotricose no Brasil é a maior coorte de esporotricose humana e animal já registrada no mundo caracterizadas pela disseminação cutânea local em humanos sem doença subjacente (ROSSATO *et al.*, 2018). Dentro desse contexto, a resistência e os efeitos colaterais ainda são um dos principais problemas no tratamento da esporotricose, que apresenta uma gravidade maior para os pacientes imunodeprimidos (AROOQUI e YOUNESS, 2018). As infecções fúngicas tem crescido de forma significativa nesses pacientes que incluem os indivíduos HIV- positivos, os transplantados de órgãos, recém-nascidos prematuros, idosos, indivíduos com doenças terminais e/ou em tratamento com imunossupressor, aumentando o uso dos antifúngicos disponíveis, o que por vezes limita o tratamento de infecções futuras e/ou recorrentes (BROWN *et al.*, 2012; ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2014; JAMPILEK *et al.*, 2016; ROEMER E KRYSAN, 2014).

Várias estratégias podem ser empregadas para desenvolver novos antifúngicos e um dos principais requisitos para o desenvolvimento de medicamentos é a identificação de alvos celulares relevantes para testar essas terapias. Neste cenário, a identificação e o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos com baixa toxicidade para o hospedeiro, bem como dos alvos

moleculares fúngicos que sejam bastante específicos, se tornam muito interessantes, como temas para pesquisas na área acadêmica e potenciais para o desenvolvimento na área de pesquisa, desenvolvimento e biotecnologia (PARENTE-ROCHA *et al.*, 2017).

Além do desenvolvimento de novas terapias que envolvem a identificação de compostos bioativos presentes em plantas, animais e microorganismos (KHOTIMCHENKO, 2018; WANG *et al.*, 2018), estratégias distintas podem ser aplicadas para identificar os novos alvos biotecnológicos que possam originar um tratamento que permita transpor a resistência fúngica e que promova uma melhor qualidade de vida dos pacientes infectados. Abordagens recentes aplica a análise de bioinformática para pesquisar em bancos de dados genômicos as sequências de peptídeos que possuem as características físico-químicas dos antifúngicos ou de enzimas importantes e específicas dos ciclos celulares fúngicos (PÉREZ-SÁNCHEZ, 2010; ORTEGA, 2015; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2015). Isso inclui métodos transcriptômicos e proteômicos e de modelagem molecular comparativa e por homologia que podem contribuir para a compreensão do papel dessas moléculas bem como do possível mecanismo de ação dos agentes antifúngicos em potencial (VALLE-AVILES, 2007; RANGEL-GAMBOA *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015)

Visando o desenvolvimento de drogas mais eficazes e acessíveis para o tratamento da esporotricose, é necessário um melhor entendimento do funcionamento de suas enzimas, principalmente as que estão envolvidas com a produção de componentes da parede celular, sendo a estrutura tridimensional dessas moléculas extremamente importante para a definição da composição e do modo de interação dos sítios de ligação deste catalisador que afeta a fluidez da membrana celular fúngica (PARENTE-ROCHA *et al.*, 2017).

Na busca por alvos biotecnológicos, enzimas como a $\Delta 24$ -Esterol Metiltransferase (24SMT), que catalisa a reação de metilação do esterol da membrana celular e que desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento do *S. brasiliensis* e do *S. schenckii*, hoje classificado como um complexo, são atualmente potencialmente interessantes. A literatura aponta que o efeito antiproliferativo via ruptura da homeostase do ergosterol, reforça essa enzima como um alvo promissor a ser explorado para novas terapias antifúngicas contra a esporotricose, seja como tratamento exclusivo ou em combinação com

itraconazol (BORBA-SANTOS *et al.*, 2016). Contudo, para explorar esse potencial, se torna necessário caracterizar estruturalmente essa enzima, o que pode ser realizado de forma teórica, em ambiente *in silico*, com baixo custo e baixo risco, utilizando a biotecnologia ouro, ou seja, a bioinformática (DASILVA, 2004).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O FUNGO *Sporothrix*

Sporothrix é um complexo de fungos saprófitas, sendo encontrados no solo, plantas e vegetais em decomposição. Esses fungos são cosmopolitas com preferência por países tropicais, contudo, já foram encontrados em países da Ásia, Europa e América do Norte devido a exposições acidentais de viajantes a esses fungos (BARROS; ALMEIDA-PAES; SCHUBACH, 2011; DIAZ, 1989; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; CHAKRABARTI *et al.*, 2015; LEE e YU-LUNG, 2017).

Apesar de ser saprófita, esse fungo já foi observado em superfícies de madeira, que é um ambiente favorável para o fungo, tais como portões e armários devido a característica natural dos gatos de coçar as unhas nas árvores, na madeira dos móveis e portões e enterrar seus dejetos em solos contaminados pelo fungo, contaminando assim suas unhas (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

A contaminação de residências e hospitais veterinários pode ocorrer tanto como consequência da presença de gatos afetados pela micose como por animais saudáveis com alta quantidade de fungos em suas unhas. Usando swabs orais, Schubach e colaboradores em 2001 foram capazes de isolar esse fungo de gatos saudáveis que viviam junto com gatos diagnosticados com esporotricose, enquanto Souza e colaboradores, anos depois, isolaram o fungo das unhas de gatos saudáveis (SOUZA *et al.*, 2006).

Com relação à morfologia, o *Sporothrix* é um fungo dimórfico, crescendo em forma de micélio a 25 °C e progredindo para a forma de levedura a 37 °C. A fase micelial é caracterizada por hifas septadas e ramificadas contendo conidióforos finos apresentando pequenas vesículas no ápice com arranjos dispostos em grupos semelhantes a flores. Os conídios se separam dos conidióforos e às vezes ficam organizados bilateralmente ao longo das hifas. A fase de levedura é pleomórfica, com células em forma de fuso e/ou ovais que são semelhantes a um "charuto" (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006).

Macroscopicamente, o *Sporothrix* aparece como uma colônia branca cremosa que ao longo do tempo se torna mais escura em meios como ágar Sabouraud (contendo cloranfenicol ou cicloheximida) ou ágar Batata que requer

pelo menos cinco a sete dias para o seu desenvolvimento. A forma leveduriforme é obtida por cultivo em meios enriquecidos à medida que o meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Infusão de Cérebro e Coração) é mantido a 35-37 °C (LEGARRAGA, 2016).

O *Sporothrix* é capaz de produzir melanina tanto na sua forma filamentosa como leveduriforme. A produção de melanina é considerada como um fator de virulência, dificultando a fagocitose, associando-se a uma maior capacidade invasiva e possível resistência a antifúngicos (LEGARRAGA, 2016). Outros fatores de virulência são a termotolerância, ou seja, a capacidade dos fungos em suportar e crescer na temperatura corpórea dos hospedeiros endotérmicos, isto é, a 37° C (HOGAN *et al.*, 1996), atividades proteolíticas com a ajuda de proteases, lipases e ureases que facilitam a adesão e penetração de fungos nas células e tecidos do hospedeiro, inclusive nos tecidos do sistema imune e adesinas que conferem a adesão primária a células endoteliais, epiteliais e aos componentes da matriz extracelular garantindo uma invasão efetiva dos tecidos do hospedeiro por patógenos. (FREITAS *et al.*, 2014) e o peróxido de ergosterol, que funciona como estratégia de escape pelo fungo (SGARBI *et al.*, 1997; CARLOS *et al.*, 2009).

O *Sporothrix schenckii* foi isolado pela primeira vez por Benjamim Schenck, no ano de 1896. A amostra foi coletada de um paciente que apresentava uma lesão na mão e braço direitos. Este isolado do abscesso do paciente foi então estudado pelo micologista Erwin Smith, que concluiu que o fungo pertencia ao gênero *Sporotrichum*. Dois anos mais tarde, o fungo observado por Schenck foi classificado por Hektoen e Perkins como *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PEERKINS, 1900) . No Brasil, as primeiras informações sobre a esporotricose datam de 1907, quando Lutz e Splendore relataram as primeiras ocorrências do fungo em pacientes brasileiros que contraíram o fungo através da mordedura de ratos infectados (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

3.2 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma infecção fúngica oportunista emergente em países com climas tropicais e subtropicais causada pelo complexo de espécies *Sporothrix*. Essa micose subcutânea crônica tem a resposta imune do hospedeiro, que inclui humanos e animais domésticos, principalmente gatos, com um papel

central no desenvolvimento desta doença (SCHUBACH *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2006; MADRID *et al.*, 2007; GARCÍA-LOZANO *et al.*, 2018).

O complexo *Sporothrix* é composto pelas espécies *Sporothrix schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. albicans*, *S. mexicana* e *S. luriei*, (formalmente *S. schenckii* var. *luriei*) (MARIMON *et al.*, 2008; MADRID *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). A distinção entre essas espécies foi baseada nos aspectos de sequenciamento do gene da calmodulina; perfil de assimilação de fontes de carbono (sacarose, rafinose e ribitol) tendo como meio básico o *Yeast Nitrogen Base* (YNB), o diâmetro médio das colônias, além da morfologia dos conídios nos cultivos após incubação nas temperaturas de 20, 30, 35 e 37 °C por 21 dias no meio Ágar Batata Dextrose (PDA) (CRUZ *et al.*, 2013).

No Brasil, em especial no Rio de Janeiro, as principais espécies causadoras da esporotricose são *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo a última a espécie mais patogênica (ROSSATO *et al.*, 2018). A infecção pelo fungo dá-se por inoculação dos conídios através de ferimentos na pele ao manipular terra e plantas ou em contato com gatos infectados (SCHUBACH *et al.*, 2001, MACÊDO-SALES *et al.*, 2018).

O grupo de risco se constitui de pessoas que lidam com agricultura, jardinagem e mineração, este último com menor grau de risco e, nos centros urbanos, é crescente o número de pessoas que se infectam por terem contato com gatos de vida errante doentes (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2014, MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). O *S. globosa* já foi associado principalmente a lesões cutâneas em humanos (CHAKRABARTI, 2015), enquanto o *S. brasiliensis* é altamente virulento e relacionado aos felinos essencialmente no Brasil (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018), enquanto o *Sporothrix schenckii* causa micose subcutânea crônica benigna (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

3.3 EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL

O complexo *Sporothrix*, por ter predileção por ambientes de taxas de umidade que variam de 95 a 100% (MACKINNON *et al.*, 1968) e por solos altamente ricos em matéria orgânica (CRUZ *et al.*, 2013), foi encontrado principalmente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, pois possuem solos e clima mais favoráveis ao seu crescimento (SANCHOTENE *et al.*, 2015). No Rio Grande do Sul a prevalência de esporotricose é causada pelo fungo *S. schenckii*

sendo 75% dos casos causados pela exposição do paciente à matéria orgânica contaminada, não verificando transmissão zoonótica da esporotricose (ROSA *et al.*, 2005). Há relatos de caso de esporotricose em Minas Gerais (RODRIGUES & RESENDE, 1996) e no Norte brasileiro (TALHARI *et al.*, 1988).

A inoculação subcutânea pode ocorrer de forma isolada, por meio de traumatismos com plantas e madeiras, por arranhaduras e mordeduras de animais portadores ou infectados ou por formas incomuns, como picada de inseto e outras formas de transmissão por animais como roedores, cães, tatus, cavalos e aves (KWON-CHUNG *et al.*, 1992). A infecção extracutânea em que o *Sporothrix* dissemina-se para os órgãos internos pode ocorrer ocasionalmente através da inalação do fungo (REIS *et al.*, 2009).

Nos centros urbanos, os gatos tem um papel importante na transmissão da esporotricose, tendo sido descrita por diversos pesquisadores (READ *et al.*, 1982; DUNSTAN *et al.*, 1986; MARQUES *et al.*, 1993; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Individualmente, também, a doença pode ser adquirida pelo manuseio de culturas do fungo em laboratórios (THOMPSON *et al.*, 1977).

As formas de infecção caracterizam os grupos de risco como sendo as pessoas que lidam com terra e plantas como agricultores, jardineiros, mineradores, gatos de vida errante, pessoas que lidam com esses gatos e, atualmente, os grupos de risco emergentes que são os pesquisadores do fungo *Sporothrix* e os veterinários e enfermeiros dos hospitais veterinários, devido ao aumento da presença de animais doentes em consultórios e internados (KAUFFMAN *et al.*, 1999; SCHUBACH *et al.*, 2001).

Nos centros urbanos do Rio de Janeiro, a epidemiologia da infecção tornou-se diferente da natural, tanto para gatos como para humanos, devido à alta proliferação de gatos de vida errante e ao contato do ser humano com esses animais infectados (CRUZ *et al.*, 2013; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Os animais de vida errante infectam-se ao entrar em contato com as leveduras presentes na superfície das lesões ulceradas ou pelos ferimentos produzidos por mordeduras ou arranhaduras de gatos doentes (CRUZ *et al.*, 2010). Há ainda a possibilidade de gatos infectarem-se a partir do contato direto com solos e plantas, o que os torna principais agentes de transmissão da doença e, portanto, um hospedeiro chave na ecoepidemiologia da doença, principalmente nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (CRUZ *et al.*, 2013; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018)

Já os seres humanos que costumam criar ou cuidar dos gatos de vida errante, contraem o fungo ao entrar em contato com ferimentos supurados dos animais doentes ou sofrerem arranhaduras ou mordeduras de animais infectados (CRUZ *et al.*, 2013; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018).

De acordo com amostras clínicas e ambientais de diversas regiões do Brasil analisadas por Rodrigues em, 2010, demonstrou-se que as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii* tinham ampla distribuição geográfica no país, sendo a espécie *S. brasiliensis* isolada com alta frequência de gatos no estado do Rio Grande do Sul e as espécies *Sporothrix brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa* mais comuns no estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dentre os casos de esporotricose que ocorreram na cidade do Rio de Janeiro entre os anos de 2005 a 2012, 43,86% foram diagnosticados, por citologia e cultivo, como sendo o agente causador o *S. schenckii* (CRUZ *et al.*, 2013). Contudo, os dados envolvendo *S. brasiliensis* vem subindo assustadoramente, visto que ele é uma espécie mais virulenta (SANCHOTENE, 2015).

Apesar de esporotricose ter sido relatada nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, o estado mais acometido na qual a epidemia tomou proporções alarmantes foi o Rio de Janeiro. Um estudo de duas séries de casos, a primeira com 178 pacientes humanos atendidos de 1998 a 2001 (BARROS *et al.*, 2004) e a segunda com 572 pacientes atendidos de 2002 a 2004 (MARTINS *et al.*, 2006), mostrou que o tempo de evolução das lesões até o atendimento no IPEC/Fiocruz foi diminuindo: enquanto nos 2 primeiros anos apenas 20% dos pacientes chegavam ao IPEC antes de 4 semanas de evolução, em 2004 essa proporção aumentou para mais de 70% (BARROS *et al.*, 2010).

A análise dos dados epidemiológicos e socioambientais mostrou que a epidemia apresenta um perfil bem delineado: distribuição geográfica com concentração de casos na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro e arredores; e acometimento predominantemente de mulheres na faixa etária de 40 a 59 anos dedicadas ao lar, seguidas por estudantes, em ambos os casos com hábito de cuidar de gatos com esporotricose (BARROS *et al.*, 2004 e BARROS *et al.*, 2008). Esse perfil sugere que são as mulheres que permanecem em casa e que cuidam dos animais, o grupo mais exposto ao fungo. Um estudo realizado em 2002 mostrou que os pacientes e seus animais vivem predominantemente em casas de alvenaria (91,2%), com abastecimento de água (91,8%) e esgotamento

sanitário (82,8%). A presença de plantas diversas (83,5%), áreas de terra (59,9%) e material de construção e entulho (43,8%) nos quintais demonstram um ambiente favorável ao *S. schenckii* (BARROS *et al.*, 2008). Foi relatada a presença de ratos em 54,8% dos domicílios e, na metade deles, o gato era a principal medida de controle dos roedores. A média da renda familiar dessa população era de 3,3 salários mínimos mensais, com média de 4 pessoas por domicílio. O nível de escolaridade foi inferior a 4 anos em 45% dos pacientes e 37% dos contatos domiciliares, ficando evidente o baixo nível socioeconômico (BARROS *et al.*, 2008).

3.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICO-SOCIAL

A notificação dos casos é obrigatória no estado do Rio de Janeiro, ela pode contribuir para que ações sejam prontamente executadas com o intuito de controlar surtos nas diferentes regiões. Certamente é um problema de saúde pública, pois a epidemia apresenta atualmente proporções alarmantes. Os animais e humanos encaminhados aos centros de zoonoses carecem de tratamento, seja por falta de medicamento nos postos de saúde, seja pelo preço dos medicamentos mais utilizados (iodeto de potássio e o itraconazol), inacessíveis às populações de baixa renda. No Rio de Janeiro, somente no IPEC/Fiocruz, o paciente e seu animal conseguem atendimento clínico, diagnóstico laboratorial e tratamento gratuitos, quando os casos são de interesse científico (BARROS *et al.*, 2010; QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2017).

Essa infecção é considerada uma micose negligenciada e nos seres humanos exibe muitas vezes um quadro clínico dermatológico expressivo, mas que costuma cursar sem gravidade e sem acometer outros órgãos além da pele, mucosa e subcutâneo. O custo indireto é muito maior em nível econômico-social — pelo absenteísmo ao trabalho, pelo sofrimento durante a doença ativa e pelo aspecto desagradável das lesões cicatriciais. Tudo isso incorre em gastos ao governo seja com os gastos com os profissionais no atendimento à saúde, pela perda produtiva da força e trabalho do paciente e pelos custos com medicamentos (BARROS *et al.*, 2010).

O contágio humano a humano é inexistente, sendo os gatos os

principais transmissores da doença aos humanos nos centros urbanos. Portanto, seria de suma importância para o controle epidemiológico o aumento de centros de zoonose que oferecessem a possibilidade de tratamento dos felinos acometidos em estádios precoces da doença, castração dos animais de vida errante de forma gratuita, instalação de centros de cremação de animais eutanasiados por estarem em estádios avançados da doença e educação da população para posse responsável de animais domésticos (BARROS *et al.*, 2010; MACEDO-SALES *et al.*, 2018).

3.5 PATOGENIA

As principais formas de manifestação da doença são cutânea fixa, cutânea disseminada, cutaneolinfática, mucosa e extracutânea disseminada ou sistêmica (ROSSER *et al.*, 1998; SCHUBACH *et al.*, 2004; GALHARDO *et al.*, 2011; RAMOS-E-SILVA, 2007 e RIPPON *et al.*, 1998).

Nos gatos, as lesões geralmente iniciam nas regiões distais dos membros, cabeça ou base da cauda (IHRKE *et al.*, 1994; MARQUES *et al.*, 1993; NOBRE *et al.*, 2001; NOBRE *et al.*, 2002), com maior incidência em animais machos devido ao hábito de disputarem fêmeas no cio em brigas nas quais acabam contraindo o fungo. O quadro inicial pode assemelhar-se a feridas, abscessos, lesões de celulite ou com tratos fistulosos que não são responsivos a antibioticoterapia, podendo evoluir para lesões ulceradas, crostosas e com exsudatos purulentos. Nos casos mais graves, pode ocorrer a disseminação do fungo (pulmões, fígado, trato gastrintestinal, sistema nervoso central, olhos, baço, ossos, articulações, rins, testículos, mama e linfonodos), levando à letargia, prostração, anorexia e hipertermia. Essas observações clínicas indicam que, além dos antecedentes imunológicos do hospedeiro, outros fatores associados ao patógeno podem influenciar as manifestações clínicas dessa doença, tais como fatores de virulência (exemplo: adesinas) e moléculas antigênicas (KIER *et al.*, 1979; ROSSER *et al.*, 1998 e SCHUBACH *et al.*, 2003).

Nos seres humanos, a forma clínica manifesta-se dependente de fatores, como o tamanho do inóculo, a profundidade da inoculação traumática, a tolerância térmica da cepa e o estado imunológico do hospedeiro (BARROS *et al.*, 2010). A apresentação clínica mais frequente da esporotricose é a forma

linfocutânea, seguida da forma cutânea localizada, ambas acometendo principalmente os membros superiores (SCHUBACH *et al.*, 2008), pois são as regiões do corpo mais expostas a arranhaduras ou mordeduras durante o cuidado dos felinos doentes. Usualmente, a lesão surge como uma pápula ou nódulo que aumenta de tamanho e evolui para goma, seguida ou não por linfangite nodular ascendente. As lesões, em sua maioria, ulceram, dando saída a uma secreção seropurulenta (BARROS *et al.*, 2010).

O período de incubação para o desenvolvimento da esporotricose varia de acordo com a forma fúngica inoculada no organismo do hospedeiro. Deve ser maior quando a infecção acontece por meio de ferimentos provocados por vegetais, em que a forma fúngica inoculada são os conídios das hifas do fungo, do que pelo contato com um outro animal com esporotricose ulcerativa, em que a forma inoculada é a leveduriforme que é naturalmente encontrada nas amostras das lesões causadas pelos fungos e que possibilita a sua rápida multiplicação no tecido do hospedeiro, contudo não houve trabalho *in vivo* confirmando essa possibilidade (CRUZ *et al.*, 2010).

3.6 FORMAS DE DIAGNÓSTICO

As formas de diagnóstico mais utilizadas são cultivo do fungo (KAUFFMAN *et al.*, 1999; MORRIS *et al.*, 2002) para demonstração do dimorfismo e o ELISA, como forma de exame complementar, devido à sua confiabilidade (TORIELLO *et al.*, 1992). A diferenciação entre espécies é conseguida através de características macroscópicas, estudo de assimilação de açúcares (rafinose e sacarose) e crescimento a 37 °C (KAUFFMAN, 2006; RODRIGUES, 2015; CHARLES *et al.*, 2017; ARENAS *et al.*, 2018; TIRADO- SÁNCHEZ E BONIFAZ, 2018).

A confirmação molecular é feita por sequenciamento da região do espaçador interno contínuo (STI) ou do gene da calmodulina (LEGARRAGA, 2016), mas podem ser utilizadas também outras técnicas de diagnóstico, como exame direto de aspirados ou biópsias de lesões para observar leveduras dos fungos em felinos, embora não possua boa sensibilidade, por ter baixa especificidade, além de exames histopatológicos, para observação do fenômeno *Splendore-Hoeppli*, que é um exame bastante inespecífico, imunofluorescência e imunohistoquímica

(IRIZARRY-ROVIRA *et al.*, 2000; KAUFFMAN, 2006; RODRIGUES, 2015; CHARLES *et al.*, 2017; ARENAS *et al.*, 2018; TIRADO-SÁNCHEZ E BONIFAZ, 2018).

As validades dessas formas de diagnóstico não são confiáveis devido à variação na especificidade e sensibilidade, mas ainda são utilizados como forma de se avaliar suspeitas sobre a doença. O teste intradérmico tem resultados ambíguos, e por isso é pouco utilizado (GONÇALVES, 1992; MAHAJAN *et al.*, 2005).

Os testes imunohistoquímicos, imunofluorescente, de imunodifusão, imunoeletoforese e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são bastante úteis em detectar a infecção extracutânea (HU *et al.*, 2003; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2013; KAUFFMAN, 2006; RODRIGUES, 2015; CHARLES *et al.*, 2017; ARENAS *et al.*, 2018; TIRADO- SÁNCHEZ E BONIFAZ, 2018).

3.7 FORMAS DE TRATAMENTO

Os azóis são as drogas mais utilizadas para o tratamento da esporotricose. São antimicóticos químicos de largo espectro que atuam sobre leveduras e bolores, apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1 (NOBRE, 2002). Dentre os azóis, o que possui maior eficiência é o itraconazol, pois atua inibindo enzimas produtoras de componentes da parede celular, da família do citocromo P450, que convertem o lanosterol em ergosterol que, por sua vez, é o principal componente esterol da membrana celular fúngica , prejudicando a sua permeabilidade (MAHAJAN, 2014). Este fármaco é metabolizado no fígado, principalmente pela isoenzima CYP3A4 do citocromo P450, por isso interage com outros fármacos metabolizados por esta via (Katz, 1999)

Juntamente com o itraconazol, ainda existem aqueles que inibem moléculas como o terpinen-4-ol e o farnesol (BRILHANTE *et al.*, 2015), a miltefosina (BORBA-SANTOS *et al.*, 2015), TCAN26 (um análogo estrutural da miltefosina) (BORBA-SANTOS *et al.*, 2016a) e 24-SMT inibidor 22-hydrazone-imidazolin-2-yl- chol-5-ene-3b-ol (H3), ainda em desenvolvimento, mas que tem demonstrado maior eficiência que o itraconazol (BORBA-SANTOS *et al.*, 2016b). Os estudos direcionados para tais enzimas demonstram que este seria o foco onde

o fungo teria vulnerabilidade, contudo ainda existe a necessidade de buscar mais informações a serem elucidadas.

A forma de tratamento de menor custo e portanto mais utilizada em países de terceiro mundo se constitui na administração de uma solução saturada de potássio iodado cujo mecanismo de ação é desconhecido, contudo há sugestão que o sal atue na resolução dos granulomas pelo aumento da proteólise ou que ele promova o aumento da fagocitose (BARROS *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2012) e o uso dos azoles: fluconazol e cetoconazol, além do itraconazol. Outras alternativas são a terbinafina, que é um derivado alilamina que atua bloqueando a síntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase, a anfotericina-B, a flucitosina e o ainda pouco estudado posaconazol ou ruconazol para uso quando o itraconazol é irresponsivo ou não tolerado (MAHAJAN, 2014).

3.8 ENZIMAS-ALVO DO *Sporothrix*

A imunogenicidade do *Sporothrix* é mediada por uma variedade de moléculas (ex: polissacarídeos, glicoproteínas, lipídios e pigmentos) presentes muitas vezes na parede celular, que é a principal estrutura dos fungos envolvida na interação com o hospedeiro (PONTÓN *et al.*, 2001). Curiosamente, alguns desses componentes da parede celular também tem o potencial de modificar o destino dos fungos a favor do hospedeiro (NIMRICHTER *et al.*, 2005; RUIZ-BACA *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Vários fatores de patogenicidade, como termotolerância, enzimas extracelulares, composição da parede celular e presença ou ausência de melanina estão envolvidos na virulência deste fungo (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996). As melaninas são pigmentos de cor marrom escuro a preto formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e/ou indólicos e geralmente são insolúveis em água, ácidos e solventes orgânicos (BELL; WHEELER, 1986).

Estudos com o fungo *S. schenckii* demonstraram a presença da melanina 1,8-dihidroxi-naftaleno pentaketida nas fases de micélio e de levedura (MORRIS- JONES *et al.*, 2003; ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000). A presença de melanina, nas paredes celulares de vários fungos, pode aumentar sua sobrevivência no meio ambiente, fornecendo proteção contra radiação ultravioleta, dessecação e temperaturas extremas. Durante a infecção, as melaninas interferem

com a resposta imune, ativação do complemento e atividade de antifúngicos (BUTLER; DAY, 1998; JACOBSON, 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

Esse pigmento não é essencial para o crescimento e desenvolvimento de fungos, mas pode contribuir para a virulência do patógeno (BELL; WHEELER, 1986; BUTLER; DAY, 1998). Foi observado que a espessura da parede celular de fungos desprovidos de melanina é menor que a de fungos em que a melanina está presente. Portanto, a parede celular fúngica mais espessa está diretamente ligada à presença de melanina, e conseqüentemente, a espessura da parede celular interfere na ação de fagócitos e de antimicrobianos (MADRID *et al.*, 2011). A pesquisa de fatores de virulência da fase do micélio é importante porque a infecção ocorre por inoculação traumática de conídios no corpo (SCHUBACH *et al.*, 2001).

A fluidez da membrana do fungo e, portanto, o seu crescimento e viabilidade estão diretamente relacionados à alta quantidade de ergosterol, que é o principal esterol presente na parede celular de todos os fungos, à exceção dos fungos dos gêneros *Pythium* e *Phytophthora*, que aparentemente não produzem nenhum tipo de esterol (CHUNG *et al.*, 2000). Além de garantir a fluidez e permeabilidade de membrana, os esteróis são responsáveis pela formação de microdomínios e atividades de funcionalidade de proteínas e de membrana (LINGWOOD and SIMONS, 2010).

O ergosterol é sintetizado a partir da acetil coenzima "A" (acetil-CoA), através de uma série de reações enzimáticas que se iniciam com a metilação do carbono C-24 e é seguida por uma sequência de demetilações dos carbonos C-14 e C-4 (CHUNG *et al.*, 2000). As principais enzimas envolvidas nesse processo são o cofator enzimático S-adenosil-L-metionina (AdoMet), que é uma forma de metionina ATP-ativada (FAUMAN *et al.*, 1999), 24 Δ -esterol metiltransferase (24-SMT), que é uma das enzimas responsáveis pela biossíntese do ergosterol restrita somente a plantas, protozoários e fungos (DE SOUZA and RODRIGUES, 2009) e componente monoxigenase ligado ao P450 do lanosterol 14 α -demetilase (14DM) (ADAMS *et al.*, 1990), que pertence à família CYP51 do citocromo P450, notável por ser a única família do citocromo P450 que está presente em todos os reinos (WATERMAN e LEPESHEVA, 2005; LEPESHEVA e WATERMAN, 2007).

A parede celular do *S. schenckii* contém glicanos e álcoois insolúveis que se encontram em proporções semelhantes em suas duas fases morfológicas (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; PREVIATO *et al.*, 1979; RUIZ-BACA *et al.*, 2011).

Um desses componentes é o peptídeo rhamnomannan, um polímero cujas cadeias são constituídas por uma a seis unidades ligadas de ácidos manosil e d-glucurônico (GORIN *et al.*, 1977; TRAVASSOS; GORIN; LLOYD, 1974). Esta macromolécula foi isolada da parede celular de células leveduriforme de *S. schenckii* e tem uma composição de polissacarídeo de d-manose (50%), l-ramnose (33%), e galactose (1%), bem como uma fração peptídica de quase 16% (LLOYD; BITTON, 1971).

3.9 ENZIMA 24 Δ -ESTEROL METILTRANSFERASE (24SMT)

Apesar de ser uma família grande e importante, não há dados de difração de raios-X, ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN) disponíveis para a enzima 24SMT, ou qualquer esteroil metiltransferase (SMT) no Protein Data Bank (PDB). De modo interessante, essa é uma enzima dependente de AdoMet, sendo possível encontrar estruturas tridimensionais de enzimas relacionadas que utilizam AdoMet como doador do grupo metil, para gerar uma topologia da 24-SMT na qual as características e a localização de seus sítios de ação possam ser representadas (FAUMAN *et al.*, 1999; NES, 2003).

As semelhanças fundamentais entre as estruturas primárias das SMTs são refletidas nas semelhanças aparentes no seu de estado estacionário, ou em parâmetros gerais, como peso molecular, organização das subunidades e presença de resíduos polares conservados que podem contribuir para uma ordem comum de eventos e de intermediários envolvidos no processo catalítico. Nes e colaboradores com o uso de mutações enzimáticas pontuais, descobriram que a substituição de um resíduo de glutamato altamente conservado na posição 82 (E82) no motif característico do local de ligação ao esteroil da SMT de levedura (Região I, compreendendo os resíduos 81-91) gerou uma enzima desacoplada cujo produto resultante foi um conjunto de produtos análogos aos gerados por SMTs de algumas plantas (NES, 2003).

Além disso, foi observado a importância dos resíduos ácidos em conjunto com resíduos polares altamente conservados para a via catalítica nessa possível mudança conformacional. Foi observado também, que a cinética e o comportamento de ligação de intermediários de alta energia na via de metilação do carbono e na ação da SMT têm implicações para o reconhecimento das

características do substrato para a catálise desse tipo de enzimas (NES, 2003).

Observa-se através da perspectiva tridimensional de várias estruturas cristalinas de metiltransferases dependentes de AdoMet, um padrão de dobragem semelhante de folhas- β paralelas no centro e rodeadas por α -hélices. Este domínio (Região II) é construído em torno de uma dobra de Rossmann (uma cadeia formada por uma faixa de quatro ou cinco folhas- β paralelas e flanqueadas por duas ou três α -hélices em ambos os lados) e é possível perceber a presença desse domínio nas SMTs através do alinhamento de sequências. É importante mencionar que a maior parte dos resíduos conservados das Regiões I e II são principalmente hidrofóbicos e que a Região I contém uma elevada percentagem de aminoácidos aromáticos e próximos da Região II (NES, 2003; NES *et al.*, 2004).

Uma característica fundamental da estrutura terciária das metiltransferases dependentes de AdoMet é o arranjo estrutural de seu sítio ativo, dividido em uma Região I para o site de ligação de esterol e uma Região II, o site de ligação AdoMet. Essas regiões (I e II) são absolutamente conservadas em muitas, senão todas as sequências de SMTs estudadas até o momento. A Região I é única para as SMTs e a Região II está presente em geral nas enzimas metiltransferases dependentes de AdoMet. As regiões I e II são sempre encontradas na mesma ordem na cadeia polipeptídica e são separadas por intervalos comparáveis (NES *et al.*, 2004).

Estudos revelaram os motifs característicos para os sítios de ligação do esterol (Y81EYGW) e AdoMet (L124DXGCGVGGP) da SMT de levedura, e que os resíduos His90, Asp125, Asp152, Glu195 e Asp276 são essenciais para a atividade catalítica da enzima de levedura (NES *et al.*, 2004). Um resíduo altamente conservado entre as SMTs, bem como outras metiltransferases dependentes de AdoMet, a Asp189, posicionada como o resíduo central no segundo motif específico (Região II) da classes de metiltransferases com sete folhas-B não é essencial para a atividade (NES *et al.*, 2004).

Observou-se ainda através de mutações pontuais de determinados aminoácidos por leucinas, que as SMTs possuem os resíduos Asp79, Glu82 e Tyr81 no sítio de ligação dos esteróis, interagindo com a sua cadeia lateral e os nove resíduos ácidos Glu108, Asp125, Asp152, Asp189, Glu195, Glu209, Glu224, Glu246, e Asp276 conservados. Quando mutados, Glu108 e Glu246 exibiram uma diminuição significativa (<90%) na atividade catalítica, e os mutantes nas posições

Asp125, Asp152, Glu195 e Asp276 foram considerados inativos (NES *et al.*, 2004).

Foi teorizado que Asp125 e Asp152 estão envolvidos na ligação do AdoMet, e os resíduos Glu195 e Asp276 na ligação do esterol. Em apoio a esta observação, os mutantes Asp125 e Asp152 ligaram ao esterol de uma maneira semelhante à proteína selvagem, enquanto os mutantes Glu195 e Asp276 ligaram fracamente ao esterol, em comparação com a SMT selvagem, além da presença dos resíduos 125 e 152 conservados nas sete folhas-B dos motifs I e II da família de metiltransferases. Nesse estudo, apenas o mutante H90L ligou-se ao esterol, AdoMet e inibidor em níveis semelhantes aos da enzima selvagem, sugerindo que a His90 pode atuar como um acceptor na reação de metilação-desprotonação (FAUMAN *et al.*, 1999; NES *et al.*, 2004).

3.10 MODELAGEM MOLECULAR: UMA FERRAMENTA DABIOINFORMÁTICA

A modelagem molecular é uma ciência que estuda as estruturas moleculares e suas funções, através da construção de modelos por computação, e apresenta um imenso potencial para aplicação multidisciplinar (ex: biologia, química e medicina), sobretudo com os avanços técnicos na tecnologia da informática e de algoritmos (SCHLICK *et al.*, 2016). Ela é um ramo da bioinformática, classificada como biotecnologia ouo juntamente com a nanotecnologia (DASILVA, 2004).

As origens da modelagem molecular se encontram na década de 1960, com pioneiros do campo trabalhando embasados em técnicas de simulação descritas e aplicadas a esferas rígidas em 1959, até que finalmente no início dos anos 70 pudesse ser realizada a primeira simulação de DM de uma molécula polar: a água líquida. Esses desenvolvimentos levaram rapidamente ao uso dos campos de forças da mecânica molecular com a minimização da energia para o refinamento de estruturas cristalinas no final da década de 1970, e posteriormente outras abordagens, apesar de um longo período para que esse campo ganhasse legitimidade, devido às críticas a noção de transferibilidade dos parâmetros dos campos de forças biomoleculares de primeira geração. Porém, quando foram finalmente estabelecidos e somados ao poder crescente dos computadores, que as possibilidades de aplicação da modelagem molecular foram realmente ampliadas (SCHLICK *et al.*, 2016).

Na modelagem molecular os cálculos abrangem uma série de técnicas e abordagens, como a mecânica molecular, mecânica quântica *ab initio* e semi-empírica, visualização de modelos, modelagem por homologia, docking molecular, dinâmica molecular (DM), método de Monte Carlo, métodos de solvatação e de energia livre, análise de componentes principais (PCA), relação de estrutura/atividade (SAR), informações químicas/bioquímicas, de bancos de dados, além de muitos outros procedimentos e métodos estabelecidos (SCHLICK *et al.*, 2016).

Assim, a modelagem molecular nos oferece uma série de ferramentas para compreensão dos diferentes sistemas biológicos, químicos e físicos, explorando padrões estruturais/dinâmicos/termodinâmicos, testando e desenvolvendo hipóteses para ajudar a entender e ampliar as leis básicas que governam a estrutura molecular, sua flexibilidade e função, e a construção de modelos que é fundamental nesses estudos estruturais (SCHLICK *et al.*, 2016; MANJU *et al.*, 2017).

Durante os últimos anos, o processo de busca por novos compostos bioativos evoluiu da tentativa e erro a um sofisticado processo, incluindo várias abordagens baseadas em computador, usadas de forma sistemática, envolvendo uma equipe multidisciplinar (MANJU *et al.*, 2017). Por exemplo, no desenvolvimento de novos fármacos baseados na estrutura, quando o alvo é conhecido, a elucidação da conformação tridimensional dessas proteínas-alvo é peça fundamental, sendo utilizada essa elucidação como etapa no procedimento para descoberta de novos compostos de relevância terapêutica (LIU *et al.*, 2011; MANJU *et al.*, 2017).

A ação de moléculas bioativas, também chamados de ligantes e os seus efeitos é um dos paradigmas da química medicinal, mediado por interações e/ou reações químicas com estruturas complexas do sistema vivo chamadas biomacromoléculas, também chamadas de alvos, sendo na sua grande maioria proteínas (SANT'ANNA, 2009).

Estabelecer interações intermoleculares é fundamental para o efeito biológico, ou farmacológico, e para que ocorram as interações ou reações de uma molécula bioativa, deve haver complementaridade química e/ou estrutural entre a molécula do ligante e do seu alvo. Esta complementaridade é estabelecida através de interações com maior ou menor especificidade (USHA *et al.*, 2017).

No planejamento de novos compostos ativos existem duas abordagens: os métodos indiretos, ou independentes do alvo; e os métodos diretos, ou dependentes do alvo. No segundo caso em específico, as possíveis interações do ligante com a biomacromolécula são levadas em consideração e explicitamente antecipadas como parte do processo de planejamento. Neste caso, a estrutura do alvo precisa ser conhecida através de dados experimentais (geralmente por cristalografia de raio-X) ou indiretamente, através de um procedimento de modelagem apropriado, geralmente modelagem por homologia ou modelagem comparativa (USHA *et al.*, 2017).

A modelagem comparativa, ou por homologia, que é baseada em moldes (*templates*) e as abordagens baseadas no conhecimento do alvo, fazem uso de potenciais estatísticos obtidos das análises de estruturas de proteínas conhecidas, e produzem modelos estruturais relativamente bons com potenciais de predições notavelmente cada vez mais precisos, embora prever regiões que são substancialmente diferentes e/ou distantes do alvo ainda pareçam ser muito mais difícil, e continuam ganhando mais terreno quando comparados com os métodos *ab initio*, que usam campos de forças baseados na física, mesmo que as abordagens livres de modelos tenham mostrado algum modesto progresso, e emergindo como alternativas competitivas (BOHNUUD *et al.*, 2017).

No entanto, as abordagens baseadas em campo de forças ainda são essenciais no interpretar das interações e energias das proteínas, necessárias no processo de desenho de novos fármacos, e também nos estágios posteriores de refinamento, que se seguem após a construção de um modelo através da modelagem de homologia (LIU *et al.*, 2011).

O mecanismo evolutivo ao longo do tempo leva a certas divergências e, conseqüentemente, à formação de famílias de proteínas correlacionadas, que apresentam algumas diferenças com relação às suas sequências de aminoácidos, mas conservando, por vezes, algum grau de similaridade conformacional. As proteínas chamadas de homólogas são aquelas que evoluem a partir de um ancestral comum (LEELANANDA e LINDERT, 2016).

Duas sequências homólogas podem ser similares em vários aspectos, praticamente idênticas, ou até muito diferentes devido a várias mutações. Porém, um conceito importante na abordagem da modelagem comparativa é o fato de que a similaridade sequencial, normalmente é menos preservada do que a similaridade

estrutural tridimensional. As maiores divergências entre proteínas homólogas ocorrem em regiões próximas da superfície, ou seja, nas alças (ou loops), que são segmentos sem estrutura secundária definida, regiões onde até mesmo as propriedades físico-químicas dos resíduos mutantes são, por vezes, diferentes dos resíduos posteriores (HÖLTJE *et al.*, 2003; MADEJ *et al.*, 2007).

A execução da estratégia de modelagem molecular comparativa, um processo bem documentado na literatura, é baseada na premissa que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada no processo evolutivo, do que sua sequência de aminoácidos, já que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam em, apenas, sutis modificações na estrutura tridimensional (NAYEEM, *et al.*, 2006).

Embora possam ser mais criteriosos, e por isso com um custo computacional maior, ou mais simples, os métodos de modelagem de proteínas por homologia implicam basicamente em quatro passos sucessivos: a) a identificação e seleção de proteínas-molde; b) o alinhamento das sequências de resíduos; c) a construção das coordenadas do modelo e; d) a validação. E para cada um desses passos, existe um grande número de métodos, programas e servidores específicos da rede mundial de computadores (Tabela 1).

A primeira etapa da modelagem comparativa tem como objetivo identificar proteínas com estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente, por métodos de difração de raios-X ou ressonância magnética nuclear (RMN), que apresentem sequência primária similar a proteína desejada (proteína-alvo), que servirão como moldes (*templates*) para construção do modelo 3D (HILLISCH *et al.*, 2004), existindo alguns programas disponíveis que podem ser utilizados para essa busca (Tabela 1).

O *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) é uma das ferramentas de pesquisa de bioinformática mais usadas, que consiste em um programa de busca de similaridade de sequência que pode ser usado através de uma interface online ou como uma ferramenta individual para comparar as consultas de nucleotídeo ou proteína do usuário a bases de dados nucleotídicas ou protéicas de sequências (JOHNSON *et al.*, 2008).

O BLAST realiza uma abordagem com um algoritmo heurístico, que busca encontrar correspondências curtas entre duas sequências e iniciar alinhamentos a partir desses "*hot spots*". Além de executar os alinhamentos, o

BLAST fornece informações estatísticas sobre esses alinhamentos, sendo esse o valor "esperado", também usado como uma taxa de falso positivos (JOHNSON *et al.*, 2008).

Na segunda etapa da modelagem comparativa o alinhamento final entre as sequências dos moldes selecionados durante a busca e a sequência de interesse é realizado por softwares, ou servidores, mais específicos sobre a identificação de similaridade sequencial. O valor mínimo de identidade sequencial para a modelagem molecular comparativa descrito na literatura é de 30% de identidade entre as proteínas molde e alvo (BOHNUUD *et al.*, 2016). Existem diversos programas que permitem alinhamentos em pares (pairwise) ou múltiplos (Tabela 1).

O T-Coffee é um programa utilizado para o alinhamento de múltiplas sequências, diante de um conjunto de sequências, tanto de proteínas como de DNA. Ele calcula um alinhamento de múltiplas sequências dos arquivos de entrada (sequências de interesse) (Poirot *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Alguns programas utilizados na área de construção de modelos por modelagem por homologia .

| Nome e Endereço na <i>Internet</i> | Tipo* | Nome e Endereço na <i>Internet</i> | Tipo | Nome e Endereço na <i>Internet</i> | Tipo |
|--|-------|---|------|---|------|
| Bancos de Dados | | Seleção de estruturas/moldes | | Bioinformática Geral | |
| CATH http://www.cathdb.info/ | s | BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov | s | NCBI https://www.ncbi.nlm.nih.gov | s |
| GenBank https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ | s | FastA https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fast/ | s | UNIPROT https://www.uniprot.org/ | s |
| GeneCensus https://cancer.sanger.ac.uk/census | s | UCLA-DOES FRSV http://www.doe-mbi.ucla.edu/ | s | Expasy https://expasy.org/ | s |
| MODBASE https://modbase.compbio.ucsf.edu | s | PROFIT http://www.bioinf.org.uk/programs/profit/ | P | | |
| PDB https://www.rcsb.org/ | s | PDB https://www.rcsb.org/ | s | | s |

*s: servidor; P: programa

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1 - Alguns programas utilizados na área de construção de modelos por modelagem por homologia (continuação).

| Nome e Endereço na <i>Internet</i> | Nome e Endereço na <i>Internet</i> | Tipo | Endereço na <i>Internet</i> | Tipo |
|---|---|------|---|------|
| Alinhamento de Sequências | Modelagem de Proteínas | s | Validação de Modelo | |
| BLAST https://blast.ncbi.nlm.nih.gov | MODELLER https://salilab.org/modeller | P | PROCHECK https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK | P |
| CLUSTAL https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ | SWISS-MODEL https://swissmodel.expasy.org | s | WHATCHECK http://servicesn.mbi.ucla.edu/WHATCHECK | s |
| FastA https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta | I-TASSER https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu | s | ProSA-Web https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php | s |
| MULTALIN http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/ | UCSF Chimera https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/ | P | Verify-3D http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D | s |
| MEME http://meme-suite.org | PyMol https://pymol.org/2/ | P | | |
| T-Coffe http://tcoffee.crg.cat | Rosetta Commons https://www.rosettacommons.org | P | | |

Fonte: Elaborada pela autora.

Para atingir esse objetivo, o T-Coffee começa computando uma coleção de alinhamentos de pares: para cada possível par de sequências no conjunto de dados, o programa calcula um melhor alinhamento global e os 10 melhores alinhamentos de intervalos próximos fazendo uso do algoritmo Sim, contido no pacote Lalign (HUANG e MILLER, 1991).

Na segunda etapa do procedimento, o T-Coffee monta um alinhamento de múltiplas sequências que possua o nível mais alto possível de consistência com os alinhamentos dentro da coleção de pares de sequências. O T-Coffee é mais uma abordagem heurística, e os resultados geralmente satisfatórios conforme julgados por comparação com métodos alternativos de alinhamentos (POIROT et al, 2003).

O Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) Suite é um kit de ferramentas reunidos em uma interface de servidor unificada, que permite aos usuários executar quatro tipos de análise de argumentos (ou motifs): descoberta de motifs, pesquisa de banco de dados de motifs, pesquisa de banco de dados de sequência de motifs e atribuição de função (Bailey et al., 2009).

O MEME e Gapped Local Alignment of Motifs (GLAM2) são ferramentas para a descoberta de motifs em uma sequência de interesse. O TOMTOM é usado na busca por motifs similares em bancos de dados de motifs conhecidos; o Find Individual Motif Occurrences (FIMO), GLAM2SCAN e Motif Alignment & Search Tool (MAST) procuram por ocorrências de motifs em bancos de dados de sequências; e finalmente o Gene Ontology for MOtifs (GOMO) fornece associações entre motifs e termos de Ontologia de Gene (GO) (BAILEY et al., 2009).

O algoritmo MM, que é utilizado pelo MEME é um modelo do tipo de mistura finita de dois componentes. Seu método de busca consiste em um componente que caracteriza um conjunto de subsequências similares e de largura fixa (os motifs), enquanto o outro componente descreve todas as outras posições nas sequências (o "embasamento"). O algoritmo MM é capaz de descobrir um ou mais motifs em uma coleção de sequências, seja de DNA ou de proteínas, através do uso do recurso da maximização de expectativa que ajusta seu modelo de mistura finita de dois componentes ao conjunto de sequências (banco de dados). Essa combinação de modelo com dados torna possível se identificar múltiplos motifs ao se eliminar, probabilisticamente, as ocorrências de motifs descobertos desse modo e repetindo o processo para encontrar o próximo motif e assim

sucessivamente. O algoritmo requer como arquivo de entrada apenas um conjunto de sequências e um número especificando a largura dos motifs (BAILEY et al ., 1994).

Terceira Etapa da Modelagem Comparativa: Na comparação das estruturas moldes (Templates) selecionadas para determinar as regiões estruturalmente conservadas, essas proteínas devem ser sobrepostas pela utilização de métodos de ajuste dos mínimos quadrados (“least squares fitting methods”), ou o valor da raiz média quadrática (RMS) (FRANÇA, 2015).

Em meados da década de 1980, o estudo de estruturas tentou estabelecer uma relação quantitativa entre a extensão da identidade em duas sequências de proteínas e a extensão da divergência em suas respectivas conformações, sendo observado que, por sequências em que mais de 70% dos seus aminoácidos foram alterados ainda possuem cadeias principais (backbones) capazes de ser sobrepostas, com um valor de desvio quadrático médio de aproximadamente 2 Å. Essa diferença não é muito distante do desvio de 0,7 Å de RMS observado para uma proteína idêntica que assume duas formas cristalinas diferentes, e nem muito maior do que a resolução de muitas estruturas cristalinas no banco de dados PDB (BENNER et al., 1997; HÖLTJE et al., 2003). Vários programas são utilizados para a construção dos modelos por homologia (Tabela 1).

O método do Iterative Threading ASSEmbly Refinement (I-TASSER), pode ser dividido em quatro estágios gerais: o estágio 1 chama-se fragmentação que consiste no threading ou fragmentar/segmentar, refere-se a um procedimento de bioinformática que utiliza bases de dados de estruturas elucidadas que possuem uma estrutura similar ou fragmentos estruturais semelhantes aos da sequência da proteína alvo para identificar moldes (ou templates) de proteínas de estruturas ainda não conhecidas. Neste estágio do I-TASSER, a sequência de interesse é comparada com um banco de dados de sequências não redundantes por repetição específica de posição por meio do BLAST (PSI-BLAST), para identificar parentes evolutivos. Um perfil da sequência é então criado com base no alinhamento múltiplo das sequências homólogas, que também é usado para prever a estrutura secundária usando o PSI-blast based secondary structure PREDiction (PSIPRED). A sequência de interesse é então submetida à uma representativa biblioteca de estruturas PDB, auxiliada pelo perfil de sequência e pelas estruturas secundárias previstas, usando o List Of Protein Structure Prediction Software (LOMETS), um

servidor de meta- segmentação que combina sete programas de fragmentação de última geração (FUGUE, HHSEARCH, MUSTER, PROSPECT, PPA, SP3 e SPARKS) (ROY et al., 2010).

Nos programas individuais de fragmentação, os templates são classificados por uma variedade de pontuações (ou scores) baseadas em sequência e baseadas em estrutura. Os principais resultados de templates de cada programa de fragmentação são selecionados para considerações adicionais. A qualidade dos alinhamentos (e, portanto, a dificuldade de modelagem dos alvos) é julgada com base na significância estatística do melhor alinhamento de fragmentos, também chamado, o Z-score, que é definido como a pontuação de energia em unidades de desvio padrão em relação à média estatística de todos os alinhamentos (ROY et al., 2010).

No estágio 2 há o agrupamento estrutural em que os fragmentos que são contínuos e alinhados são retirados das estruturas dos templates e são usados para montar conformações estruturais das seções que tiveram um bom alinhamento, com as regiões não alinhadas (principalmente regiões de loops e de finais de cadeias) construídas por modelagem ab initio.

Para melhorar a eficiência da análise conformacional, o I-TASSER adota um modelo reduzido para representar a cadeia de proteína, sendo cada resíduo descrito pelo seu átomo de carbono-alfa ($C\alpha$) e centro de massa da cadeia lateral. Como as regiões não alinhadas durante o processo de fragmentação geralmente têm uma precisão de modelagem menor, a modelagem de estrutura nessas regiões é confinada a um sistema confinado de grade, cujo tamanho é de $0,87 \text{ \AA}$, o que ajuda a reduzir a entropia da análise conformacional. Embora esse tamanho de grade possa introduzir uma incerteza de representações conformacionais na modelagem comparativa (que geralmente tem um intervalo de erro de 1 a 2 \AA), ele não gera efeito observável na modelagem ab initio, já que muitas vezes tem um intervalo de erro de 4 a 6 \AA (ROY et al., 2010).

As regiões alinhadas por fragmentos geralmente têm uma precisão maior e, portanto, a modelagem nessas regiões é realizada fora do sistema de grade e os fragmentos desses moldes são mantidos rígidos durante simulações de dinâmica molecular, o que ajuda a manter a fidelidade das estruturas de alta resolução nessas regiões (ROY et al., 2010).

O agrupamento dos fragmentos é realizado usando uma técnica

modificada da troca de réplica de simulação de Monte Carlo, que implementa várias réplicas de simulações em paralelo a diferentes temperaturas, em que essas temperaturas são trocadas periodicamente entre essas réplicas; as barreiras de energia são achatadas por uma função hiperbólica para acelerar as transições entre os diferentes poços de menor energia das simulações. A simulação global é guiada por um campo de forças composto baseado em conhecimento, que inclui:

(1) termos estatísticos gerais derivados do PDB (C α /correlações de cadeia lateral, ligações de hidrogênio e hidrofobicidade); (2) restrições espaciais de fragmentos dos templates; e (3) previsões de contato baseadas em sequência do SVMSEQ (ROY et al., 2010).

Em parte, devido à consideração das interações hidrofóbicas e do viés em do raio de giro no campo de forças, o procedimento atual de I-TASSER é melhor projetado para o enovelamento das proteínas globulares de domínio único, enquanto o procedimento para modelar proteínas de múltiplos domínios no I-TASSER é especificado na etapa seguinte. As conformações geradas nas réplicas de baixa temperatura durante a simulação de refinamento são agrupadas pelo SPICKER, um programa de clustering para identificar o modelo de proteína quase nativa a partir de chamarizes de estrutura, com o objetivo de identificar estruturas com estados de baixa energia livre. Os centróides desses agrupamentos são então obtidos pela média das coordenadas 3D de todos as estruturais agrupados (ROY et al., 2010).

No estágio 3 ocorre a seleção do modelo e refinamento através da simulação da montagem dos fragmentos que é executada novamente a partir dos centróides de grupamentos selecionados. Embora o potencial inerente do I-TASSER permaneça inalterado na segunda execução, as restrições externas são agrupadas a partir dos alinhamentos de fragmentos do LOMETS e das estruturas do PDB que são estruturalmente mais próximas dos centróides, conforme identificado pelo TM-align.

O objetivo da segunda repetição de simulações é remover conflitos estéricos e refinar a topologia global dos centróides dos agrupamentos. Os resultados gerados durante a segunda rodada de simulações são agrupados novamente, e as estruturas de energia mais baixas são selecionadas como arquivos de entrada para o REMO, um algoritmo que gera os modelos estruturais finais construindo modelos de todos os átomos a partir dos traços do C α através da

otimização das redes de ligações de hidrogênio (ROY et al., 2010).

E por fim, no estágio 4 é feita a interpretação funcional baseada em estrutura: No último estágio, a função da proteína de interesse é inferida pela correspondência estrutural dos modelos 3D previstos com as proteínas de estrutura e função conhecidas no PDB. Para este propósito, três bibliotecas de estrutura/função de proteína foram construídas independentemente pelos autores e atualizadas quinzenalmente. Estão inclusas uma biblioteca de 5798 entradas não redundantes com números conhecidos da Comissão de Enzimas (EC), uma biblioteca de 26045 entradas não redundantes com termos de Ontologia de Gene (GO) conhecidos e uma biblioteca de 19658 entradas não redundantes com sítios de ligação de ligantes conhecidos (ROY et al., 2010).

Embora a pesquisa de similaridade estrutural global seja usada para reconhecer proteínas com enovelamentos globais semelhantes, a busca por similaridade local fornece um método complementar, identificando análogos que possuem um enovelar diferente, mas desempenham funções semelhante por causa da conservação de sítios ativos/de ligação. Os análogos funcionais dos resultados de pesquisa globais são classificados com base nos padrões estruturais conservados presentes no modelo, medidos usando um esquema de pontuação que combina pontuação de modelagem por template (TM-score), RMSD, identidade de sequência e cobertura do alinhamento na estrutura (ROY et al., 2010).

Nessa etapa, o TM-score é definido para avaliar a semelhança topológica dos pares de estruturas de proteínas, com um valor na faixa de 0,1, e uma pontuação maior indicando melhor correspondência estrutural. Estatisticamente, um TM-score maior que 0,17 significa um par de proteínas selecionado aleatoriamente com o alinhamento sem intervalos retirado do PDB; um TM-score maior que 0,5 corresponde aos pares de proteínas de enovelamento semelhantes. O significado estatístico do TM-score é independente do tamanho da proteína.

A busca de similaridade local procura motifs espaciais conservados no modelo previsto do I-TASSER, com os candidatos classificados com base em sua estrutura e semelhança de sequência com cavidades funcionais (bolsos ou cavidades de ligação) em estruturas conhecidas. E enfim, os resultados da pesquisa global e local são combinados para apresentar uma lista abrangente de

análogos funcionais (ROY et al., 2010).

No Swiss Model, todos os métodos de modelagem por homologia consistem nas seguintes quatro etapas: (I) seleção de template; (II) alinhamento do alvo/template; (III) construção de modelos; e (IV) avaliação. Essas etapas podem ser sequencialmente repetidas até que uma estrutura de modelo satisfatória seja alcançada. Diversas técnicas diferentes de construção de modelos foram desenvolvidas ao longo dos anos. A abordagem do servidor SWISS-MODEL pode ser descrita como montagem de fragmentos rígidos, que será descrita resumidamente (BIASINI et al., 2014).

Seleção de Templates: A biblioteca de modelos ExPDB do servidor SWISS-MODEL, é extraída do PDB. De modo a permitir um fluxo de trabalho estável e automatizado do servidor, os arquivos de coordenadas do PDB são divididos em cadeias de proteínas individuais e em registros não confiáveis (por ex. modelos teóricos, e de estruturas de baixa qualidade, fornecendo apenas coordenadas de C α), que são removidos. Informações adicionais úteis para a seleção de templates são reunidas e adicionadas ao cabeçalho do arquivo, como por exemplo a provável estrutura quaternária, os indicadores de qualidade como energia de campo de força empírico, pontuação do potencial de força médio pelo ANOLEA, que é um programa de modelagem para cálculos da energia de uma proteína.

Para selecionar templates para uma determinada proteína, as sequências da biblioteca de estrutura de moldes são pesquisadas. Se esses templates cobrirem regiões distintas da sequência de interesse, o processo de modelagem será dividido em lotes independentes separados (GUEX & PEITCH, 1997; SCHWEDE et al., 2003).

Alinhamento: Até cinco estruturas de templates por grupo são sobrepostas usando um algoritmo sequencial de mínimos quadrados. Um alinhamento estrutural é gerado após a remoção de modelos incompatíveis, isto é, a omissão de estruturas com elevado RMSD ao C α do primeiro template. Um alinhamento da sequência alvo com a estrutura do principal template é calculado, seguido por uma etapa heurística para melhorar o alinhamento. O posicionamento de inserções e exclusões é otimizado considerando o contexto da estrutura do modelo. Em particular, os resíduos isolados no alinhamento ("ilhas") são deslocados para os flancos para facilitar o processo de construção dos loops

(GUEX & PEITCH, 1997; SCHWEDE et al., 2003).

Construção de Modelo: Para gerar o núcleo do modelo, calcula-se a média das posições dos átomos de backbone da estrutura do template. Assim os templates são medidos pela sua similaridade de sequência com a sequência alvo, enquanto as posições dos átomos que são significativamente divergentes são excluídos. As coordenadas do template não podem ser usadas para modelar regiões de inserções ou exclusões no alinhamento do template/alvo.

Para gerar essas partes, um conjunto de fragmentos compatíveis com as hastes vizinhas é construído usando a programação de restrição de espaço (CSP). O melhor loop é selecionado usando um esquema de pontuação, que considera tanto a energia do campo de força, como impedimentos estéricos e interações favoráveis como a formação de ligações de hidrogênio. Se nenhuma alça adequada puder ser identificada, os resíduos flanqueadores serão incluídos no fragmento reconstruído para permitir maior flexibilidade. Nos casos em que o CSP não fornece uma solução satisfatória e para loops acima de 10 resíduos, uma biblioteca de loop derivada de estruturas experimentais é pesquisada para encontrar fragmentos de loop compatíveis (GUEX & PEITCH, 1997; SCHWEDE et al., 2003).

Modelagem de cadeias laterais: A reconstrução das cadeias laterais do modelo baseia-se nas posições ponderadas dos resíduos correspondentes nas estruturas dos moldes. Começando com resíduos conservados, as cadeias laterais do modelo são construídas por cadeias laterais da estrutura do template iso-esticamente substituídas. As possíveis conformações da cadeia lateral são selecionadas a partir de uma biblioteca de rotâmeros dependentes do backbone, que foi construída cuidadosamente levando em conta a qualidade das estruturas de origem. Uma função de pontuação avaliando interações favoráveis (pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto) e contatos próximos desfavoráveis é aplicada para selecionar a conformação mais provável (GUEX e PEITCH, 1997; SCHWEDE et al., 2003).

Minimização de energia: Os desvios na geometria da estrutura da proteína, que foram introduzidos pelo algoritmo de modelagem ao unir fragmentos rígidos, são regularizados na última etapa de modelagem pela minimização de energia utilizando o método steepest descent e usando o campo de força GROMOS96, uma vez que os campos de força empíricos são úteis para detectar

partes do modelo com erros conformacionais (GUEX e PEITCH, 1997; SCHWEDE et al., 2003).

Quarta Etapa da Modelagem Comparativa: A validação do modelo é feita de forma a utilizar programas específicos, que consideram as necessidades e parâmetros específicos de análise (Tabela 1). O desenvolvimento dos métodos tanto experimentais como computacionais para a resolução de estruturas tridimensionais de proteínas aumenta mais e mais, porém um problema contínuo que se apresenta é verificar a precisão do modelo final da proteína. A compatibilidade do modelo 3D de uma proteína com a sua própria sequência de aminoácidos medida por um perfil 3D, é um eficiente método de teste da exatidão desse modelo.

De fato, na validação do modelo, em que se visa avaliar a qualidade e confiabilidade das estruturas geradas, são investigadas o grande número de propriedades presentes em diferentes graus de organização estrutural, como exatidão estereoquímica, qualidade do empacotamento de resíduos e confiabilidade do enovelamento de acordo com os ambientes químicos dos resíduos e existem diferentes softwares para realizar essas análises. Entre os mais utilizados, se encontram o Prochek, e o Verify3D (HÖLTJE et al., 2003).

O PROCHECK é possivelmente, o mais informativo e útil dos indicadores de "qualidade" para um modelo de proteína é o gráfico de Ramachandran dos ângulos de torção ϕ - ψ dos resíduos. Essa análise detecta tanto erros grosseiros nas estruturas, assim como os mais sutis. No mapa de Ramachandran original (RAMACHANDRAN et al., 1963; RAMAKRISHNAN e RAMACHANDRAN, 1965), as regiões denominadas como "permitidas" foram definidas com base em simulações de dipeptídeos.

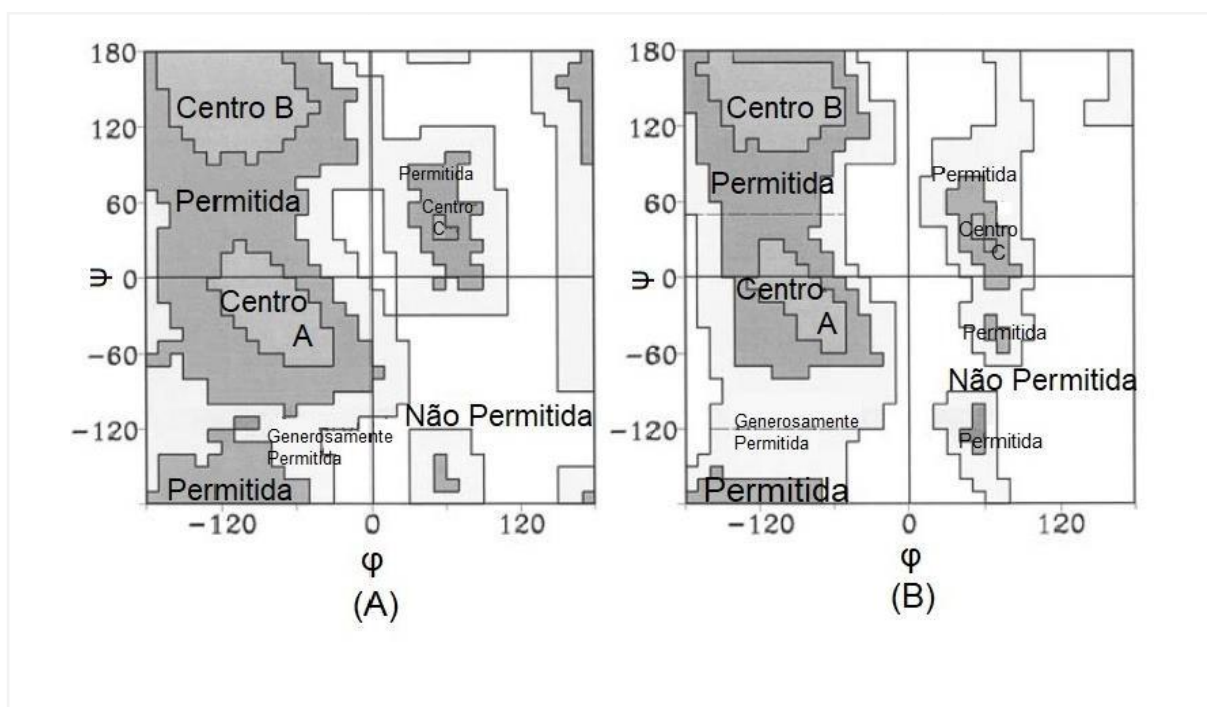
Na versão do PROCHECK, as diferentes regiões desse gráfico são definidas com base em quão densamente elas são preenchidas com pontos de dados retirados de um banco de dados de estruturas de proteínas bem refinadas. As regiões são: central, permitidas, generosamente permitidas e não permitidas (Figura 4) (LASKOWSKI et al., 1993).

Com o auxílio do Verify 3D, o perfil 3D de uma estrutura de proteína pode ser visto e tratado como uma tabela, que é calculada a partir das coordenadas atômicas da estrutura, e assim podendo ser usada para classificar da compatibilidade do modelo de estrutura tridimensional com qualquer sequência de

aminoácidos. Perfis 3D computados a partir de estruturas proteicas corretas obtêm pontuações elevadas quando combinam com suas próprias sequências, e vice-versa. Sendo assim, a avaliação da exatidão de um modelo de proteína através de seu perfil 3D pode ser efetuada independentemente da origem do modelo ser derivada de raios-X, RMN, ou procedimentos computacionais (EISENBERG et al ., 1997).

Nesse método de avaliação, usando um perfil 3D para mensurar a compatibilidade de um modelo de proteína com sua sequência, é necessário entender que a posição de cada resíduo no modelo 3D é caracterizada por seu ambiente, e pode ser representada por uma linha de 20 números no seu perfil. Esses números pode ser interpretados como as preferências estatísticas (chamada de pontuações 3D-1D) de cada um dos 20 aminoácidos por esses ditos ambientes (EISENBERG et al ., 1997).

Figura 4 - Programa de validação Ramachandran. Gráficos gerados e utilizados para a validação de modelos mostrando as diferentes regiões sombreadas de acordo com o quanto as combinações de ângulos phi-psi são favoráveis. Em (A) a versão original do programa (1992) e (B) uma versão posterior atualizada baseada em um conjunto de dados mais nova (1998), incluindo mais estruturas de alta resolução.



Fonte: Adaptada de Laskowski *et al.*, 2012.

Os ambientes de resíduos são definidos por três parâmetros: a área do resíduo que é se encontra enterrada na estrutura da proteína, a fração da área da cadeia lateral que é coberta por átomos polares (oxigênio e nitrogênio), e das estruturas secundárias adjacentes. A pontuação "S" da compatibilidade perfil/sequência de um modelo é a soma de todas as pontuações 3D-1D, em todas as posições de todos os resíduos, para toda sequência de aminoácidos da proteína. E assim, a compatibilidade dos segmentos da sequência com a suas estruturas 3D pode ser avaliada traçando, contra o número de sequência, a pontuação média do 3D-1D (EISENBERG *et al.*, 1997).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos ainda é muito caro, demorado e desafiador. Entretanto as ferramentas de descoberta de fármacos *in silico* podem auxiliar potencialmente reduzindo o custo de pesquisa e o tempo de desenvolvimento. Hoje, a modelagem molecular, inclusive a modelagem por homologia tornou-se uma ferramenta eficaz e indispensável no desenvolvimento terapêutico (FRANÇA, 2014).

Os projetos envolvendo a identificação do genoma de diferentes organismos vivos disponibilizou uma quantidade substancial de dados de sequência que podem ser usados em vários projetos de descoberta de fármacos. Além disso, o crescente conhecimento das estruturas biológicas, bem como o aumento do poder de cálculo computacional, tornaram possível o uso eficaz de diferentes métodos em várias fases do processo de descoberta, acelerando o avanço nas pesquisas farmacêuticas de interesse econômico (USHA, 2017). Utilizar essas ferramentas, que fazem parte da Biotecnologia ouro, para a análise de doenças negligenciadas como a esporotricose, pode auxiliar na descoberta e caracterização de novos alvos biotecnológicos como a enzima 24 Δ -esterol metiltransferase do *Sporothrix*, permitindo a melhora dos tratamentos atuais que ainda possuem alta toxicidade e baixa usabilidade (duração e número de doses).

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Caracterizar *in silico* a enzima 24 Δ -esterol metiltransferase do *Sporothrix* (24SMT) como um alvo Biotecnológico para o tratamento da Esporotricose através da modelagem molecular.

4.2 ESPECÍFICOS

Identificar enzimas com alto grau de identidade e similaridade estrutural à enzima 24SMT.

Construir um modelo por homologia para a enzima 24SMT utilizando templates/moldes com alto grau de identidade e similaridade.

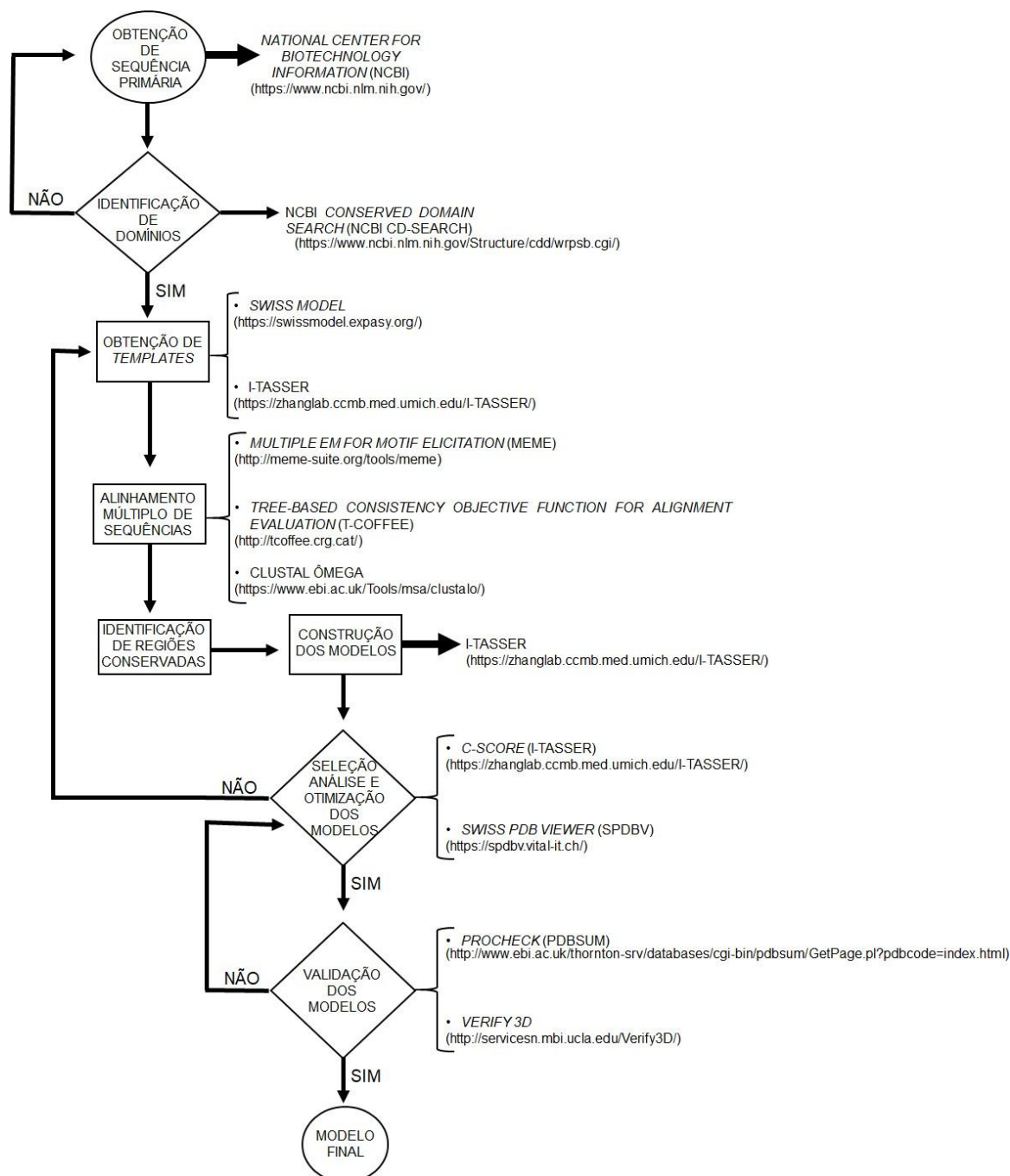
Validar o modelo final da 24SMT.

Realizar uma análise comparativa com o modelo 24SMT e as enzimas da mesma família nos níveis estruturais 1^a, 2^a e 3^a.

5 METODOLOGIA

Para a execução do projeto, seguiu-se o fluxograma representado na figura 5, cujas fases são explicadas nos tópicos :

Figura 5 – Etapas da execução do projeto



Fonte: Elaborada pela autora.

5.1 MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA 24 Δ -ESTEROL METILTRANSFERASE DO *Sporothrix schenckii* (24SMT)

A modelagem molecular foi realizada na Universidade Estadual do Ceará, utilizando um *notebook* com processador *Intel Core i5*. A sequência primária da proteína 24 Δ -esterol metiltransferase foi obtida no Banco de Proteínas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information, Resource Coordinators, 2017; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>*). A sequência primária selecionada da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do *Sporothrix schenckii* (cepa: 1099-18 da coleção: ATCC:MYA-4821, hospedeiro: Homem) que foi relatada em 2014 por Teixeira e colaboradores sob o código de acesso *XP_016592023* no site *NCBI Blast*, contendo o domínio conservado da família das AdoMet-MTases (Figura 6).

Figura 6 - Sequência da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do *Sporothrix schenckii* utilizada para a construção do modelo por homologia.

sterol 24-C-methyltransferase [*Sporothrix schenckii* 1099-18]

NCBI Reference Sequence: XP_016592023.1

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)

```
>XP_016592023.1 sterol 24-C-methyltransferase [Sporothrix schenckii 1099-18]
MSAAVISQAPGAAPPRAEGLVANDRSSTSSAQSTETLYDAAEAKHLEPAAHKLKQFFHLHHHTPSSGS
KESIVVEERSASTKRSTTFIRSPKYLNNLTPKQVDDFMASYVIYNLDWEDEPAMVAALGPDYKQKVGDSL
RAYYGVMNHLICALGSVEKMYIPPLMDRHVSVDLNQLLYEESIARDLGLKPGDRVLDIGCGRGRVAAHMAK
YSGAHITGLNIDPNQLAQARAFNAEQGLSNTFVERDQNDLPLPFADASFDAFYQIQAFSLCKDLPAMFRE
IYRVLPGARFMSMLDWVSLPAYDPANEQHAELMRRVKPLIGAVGTPTPAGLEQALADAGFTVTRSDNASV
GGLQAPLIDKVDVYFRAVRQMI LGLVVRVHVLPHKFKTLINRLCLDGGQAFVKMDEMRLISTSYRIIAQKPL
DTPSEA
```

Fonte: Elaborada pela autora.

Esta sequência foi submetida aos servidores *Swiss Model* e I-Tasser obtendo-se os *templates* aos quais modelos foram alinhados para obtenção do escore de Desvio Quadrático Médio (RMSD), indicando o nível de desvio de aminoácidos entre *templates* e modelos.

A sequência em formato FASTA (derivado do pacote e *software* FASTA e sequenciamento de DNA) foi submetida aos servidores I-Tasser (ZHANG, 2008) e *Swiss Model* (BIASINI *et al.*, 2014) para obtenção dos moldes de proteínas homólogas. O molde ideal para realizar a modelagem foi escolhido com base no valor de *scores* de identidade, similaridade e TM-score e através do score de identidade e similaridade, no I-Tasser e Swiss Model, respectivamente (Figura 7).

Figura 7 - Ambiente do programa I-Tasser (acima) e Swiss Model (abaixo) gratuito para instituições acadêmicas.

The figure consists of two screenshots of web-based software interfaces. The top screenshot shows the I-TASSER website, which is a hierarchical approach for protein structure and function prediction. It features a navigation menu on the left with options like 'I-TASSER', 'QUERY', 'COMETS', 'COACH', 'COMPACTOR', 'MUSTER', 'SEGMENT', 'FG-MID', 'ModRefiner', 'REMO', 'SPRING', 'COTH', 'BSPred', 'SVMSEQ', 'ANGLOR', 'BSP-SLIM', 'SAKSTER', 'Threadom', 'TreadomEx', 'EvoDesign', 'GPCRA-TASSER', 'BindProf', and 'BindProX'. The main content area includes a header for 'I-TASSER Protein Structure & Function Predictions' and a section for 'I-TASSER On-line Server' with a text input field for a sequence and a 'Build Model' button. The bottom screenshot shows the SWISS-MODEL website, which is a platform for protein structure prediction. It features a 'Start a New Modelling Project' section with a 'Target Sequence' input field, a 'Project Title' field, and an 'Email' field. There are also 'Search For Templates' and 'Build Model' buttons. The website is part of the BIOZENTRUM at the University of Basel.

Fonte: Elaborada pela autora.

O alinhamento estrutural entre a proteína-alvo e o molde para avaliação do menor desvio médio quadrático (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*) foi realizado no programa *Swiss PDB Viewer* (SPDBV) (GUEx; PEITSCH; SCHWEDE, 2009). Os modelos foram escolhidos com base no RMSD, cujo valor ideal é de, no máximo, 2.0 Å. Após a construção, o modelo foi submetido a otimização da geometria por minimização de energia no SPDBV.

5.2 VALIDAÇÃO DO MODELO POR HOMOLOGIA

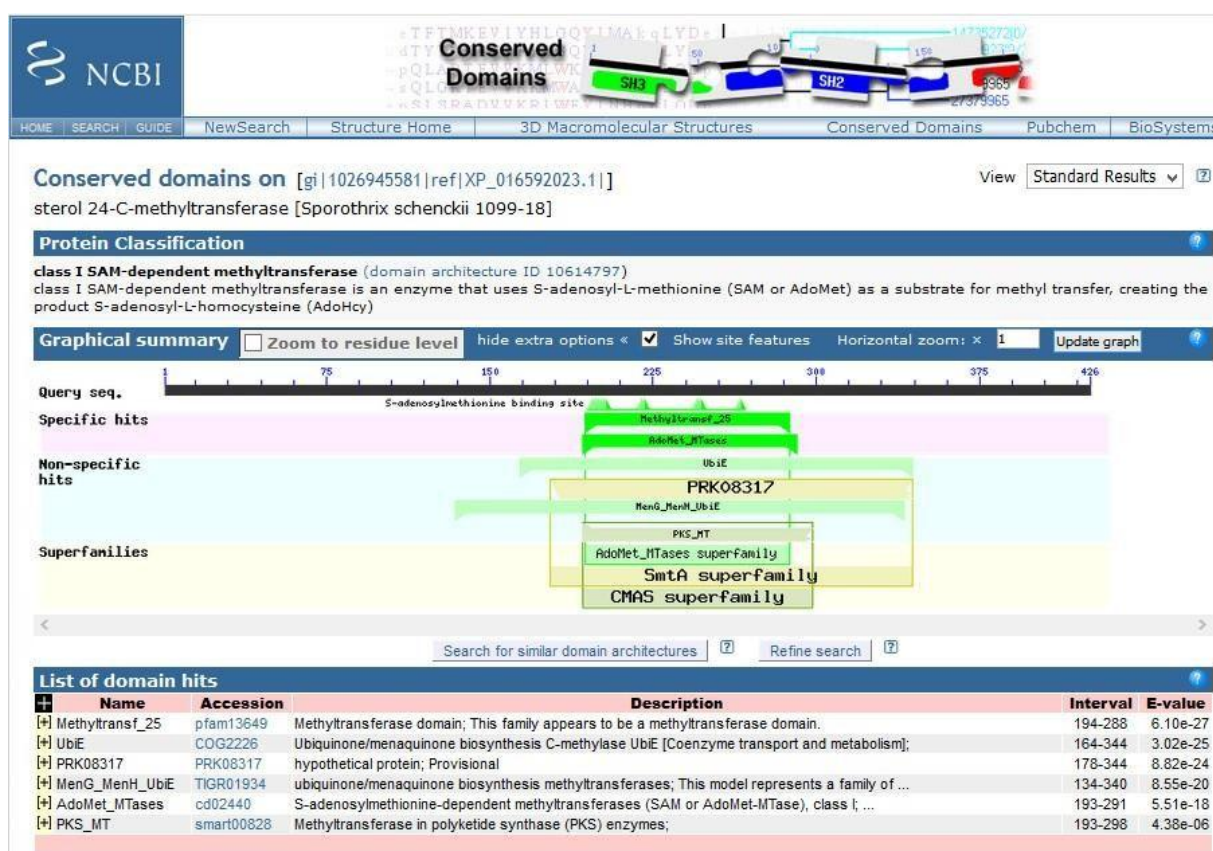
A validação do modelo foi realizada no servidor *Verify 3D*, onde foi determinada a compatibilidade entre a estrutura primária e o modelo 3D submetidos, através da atribuição de uma classe estrutural, com base nas posições e suas características (alfa-hélices, folhas-beta, *loops*, polar, não-polar, etc.) e comparando os resultados com estruturas quaternárias já conhecidas e de boa qualidade (BOWIE; LÜTHY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992) e no programa *Procheck*, através do servidor *PDBSum*, analisando-se os ângulos *Phi* e *Psi* através do mapa de Ramachandran (LASKOWSKI *et al.*, 1993; 1996).

A exibição do modelo final foi realizada com o programa SPDBV e os sítios de ligação proteína-fármaco tem a perspectiva de serem testados pelo laboratório.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência primária selecionada da enzima 24 Δ esterol metiltransferase (24SMT) do *Sporothrix schenckii* foi avaliada previamente no programa CDsearch do NCBI de busca de domínios conservados, confirmando a presença do domínio da superfamília metiltransferase AdoMet dependente ou seja que usam S-adenosil-L-metionina como substrato para a metilação (Figura 8).

Figura 8 - Domínios conservados da superfamília SMT ADOMET-dependente detectados na sequência da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do *Sporothrix schenckii* utilizada para a construção do modelo por homologia utilizando o programa *CD search* do site NCBI.



Fonte: Elaborada pela autora.

A sequência FASTA foi submetida aos programas Swiss-Model e I-Tasser obtendo-se 4 templates do Swiss-Model (2FK7, 2VN8, 3CCF e 4FS8) e 10 templates do I-Tasser (1KPH, 1KPI, 1TPY, 2FK8, 3UJ6, 4INE, 4IV0, 4KRG, 4KRHe 5WP4) .Os *templates* foram alinhados entre si e com a sequência primária da 24SMT no servidor *T-Coffee* para identificar quais apresentam maior

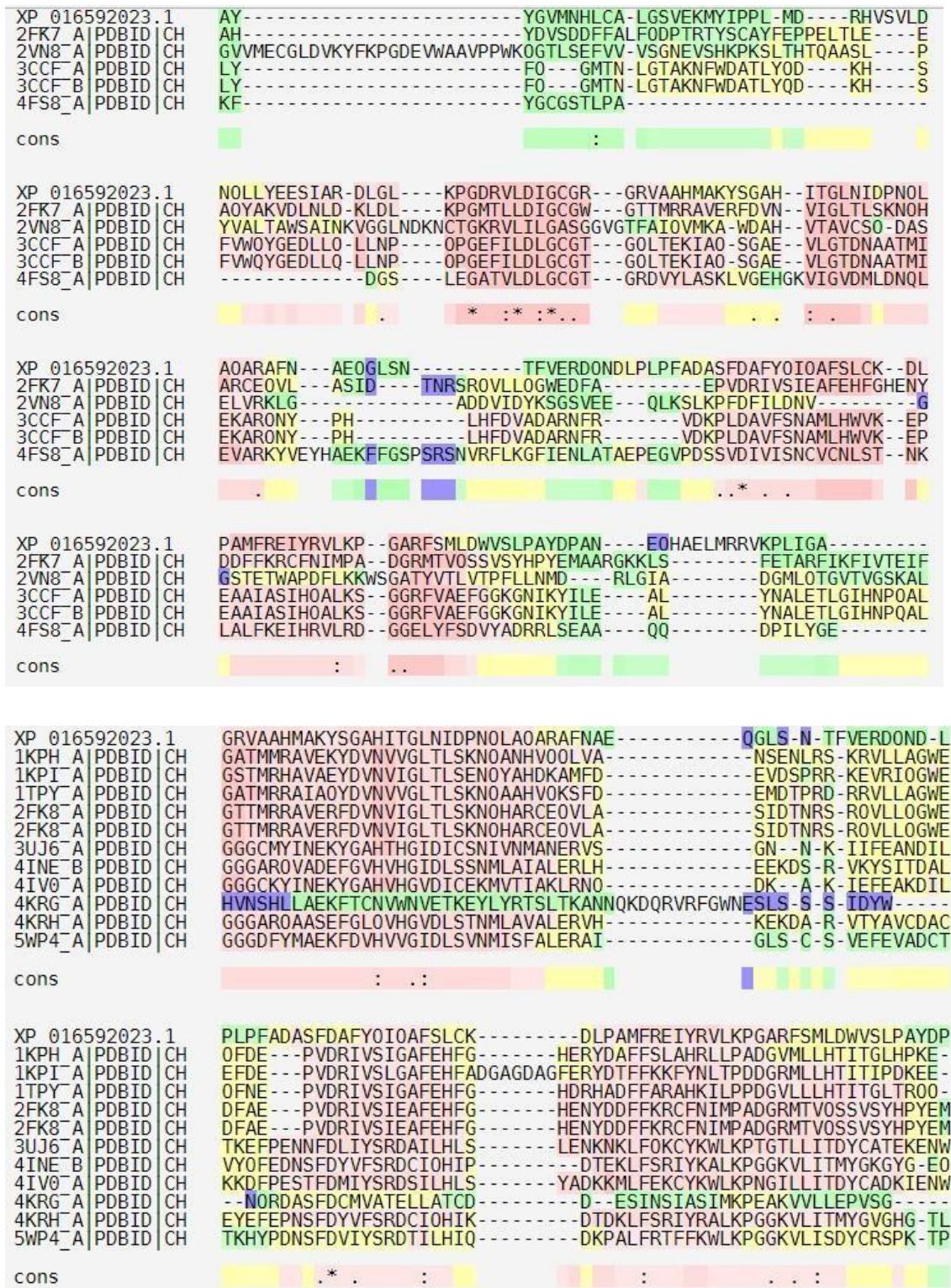
similaridade com a 24SMT, observando-se os aminoácidos idênticos, conservados e semiconservados. Todos os *templates* sugeridos pelo *Swiss Model* apresentaram escore mediano no *T-Coffee*, variando entre 44 e 64 (Figura 9), enquanto nos apontados pelo *I-Tasser*, a maioria dos *templates* apresentaram escores variando de medianos a bons, com valores entre 42 e 73, indicando que uma maior quantidade de trechos idênticos ou semelhantes na sequência de aminoácidos a 24SMT. A única exceção foi o 4KRG que apresentou escore muito baixo (E=17), confirmando sua inadequação para utilização no desenvolvimento do modelo 3D (Figura 10).

Figura 9 - Escore *T-coffee* resultante da comparação das sequências dos templates sugeridos pelo Swiss Model (esquerda) e pelo I-Tasser (Direita) com a sequência da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do *Sporothrix schenckii* a ser utilizada para a construção do modelo por homologia.

| BAD AVG GOOD | | BAD AVG GOOD | |
|------------------|------|------------------|------|
| * XP 016592023.1 | : 44 | * XP 016592023.1 | : 42 |
| 2FK7 AIPDBIDICH | : 54 | 1KPH AIPDBIDICH | : 70 |
| 2VN8 AIPDBIDICH | : 46 | 1KPI AIPDBIDICH | : 69 |
| 3CCF AIPDBIDICH | : 64 | 1TPY AIPDBIDICH | : 72 |
| 3CCF BIPDBIDICH | : 64 | 2FK8 AIPDBIDICH | : 70 |
| 4FS8 AIPDBIDICH | : 51 | 2FK8 AIPDBIDICH | : 70 |
| cons | : 5 | 3UJ6 AIPDBIDICH | : 73 |
| | | 4INE BIPDBIDICH | : 63 |
| | | 4IV0 AIPDBIDICH | : 72 |
| | | 4KRG AIPDBIDICH | : 17 |
| | | 4KRH AIPDBIDICH | : 61 |
| | | 5WP4 AIPDBIDICH | : 52 |
| | | cons | : 6 |

Fonte: Elaborada pela autora. Legenda: Escore Bom = cor rosa; Escore Mediano = cor "salmão"; e Escore Ruim = cores azul e verde.

Figura 10 - Alinhamento múltiplo das seqüências dos templates do Swiss Model (acima) e do I Tasser (abaixo) com a 24SMT do *S. schenckii*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para comparar os motifs dos *templates* e da 24SMT, utilizou-se o programa *Multiple Em for Motif Elicitation* (MEME), ferramenta que analisa os motivos, ou seja, os padrões de sequência que ocorrem repetidamente em um grupo de proteínas relacionadas ou sequência de DNA.

Em nossa análise observamos que os *templates* apontados pelo *Swiss Model* apresentaram pouca conservação quanto posição dos motifs onde somente um estava conservado nos *templates* 3CCF, 4FS8 e 2FK7 (Figura 11).

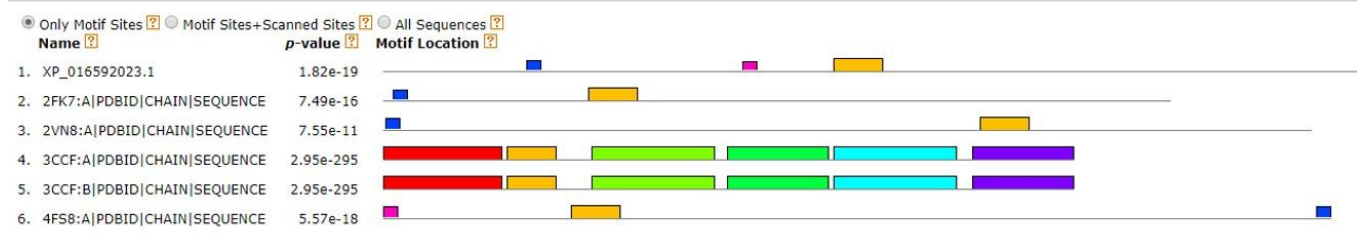
Diferentemente, nas sequências fornecidas pelo *I-Tasser* houve bastante similaridade, onde observou-se dois grupos formado pelos *templates* 3UJ6, 4INE, 4IV0, 4KRH e 5WP4 e pelos *templates* 1KPH, 1KPI, 1TPY e 2FK8 (Figura 11 continuação). Com os baixos resultados nos escores oriundos do *T-coffee* e do MEME, os *templates* sugeridos pelo *Swiss Model* mostram-se de menor prioridade para o desenvolvimento do modelo 3D da 24SMT.

A sequência da 24SMT foi submetida aos servidores *Swiss Model* e *I-Tasser* utilizando-se todos os *templates* sugeridos pelos respectivos programas, procedendo-se como é instruído pelos autores, gerando-se vários modelos. Posteriormente, os *templates* utilizados foram então alinhados com os modelos para obtenção do escore de Desvio Quadrático Médio (RMSD), analisando-se o nível de desvio da estrutura original dos *templates* e da estrutura teórica construída para os modelos (Tabela 2).

A maioria dos escores RMSD ficou abaixo do valor máximo de 2 Å, a exceção das combinações *template/modelo*: 4FS8/4 (RMSD = 2,27 Å), 4KRG/1 (RMSD= 2,23Å), 4KRG/2 (RMSD = 2,40 Å), 4KRG/3 (RMSD = 2,23 Å), *template* 4KRH/1 (RMSD= 2,23 Å), 4KRH/2 (RMSD = 2,40 Å) e 4KRH/3 (RMSD = 2,23 Å). Tais resultados negativos excluíram automaticamente esses *templates* como moldes para construção final do modelo 3D. Os *templates* com os respectivos melhores resultados de RMSD estão apresentados na tabela 2.

Figura 11 – Motifs resultante do alinhamento entre a proteína homóloga e os templates do Swiss Model (acima) e do I-Tasser (abaixo)

MOTIF LOCATIONS



Stopped because requested number of motifs (8) found.

Modelos MEME das sequências primárias de proteína molde, *templates* 2FK7, 2VN8, 3CCF e 4FS8, do Swiss Model. Um modelo de sequência primária gerada por MEME composta por até 8 motivos nas 5 proteínas. A localização desses motivos, representados como caixas codificadas por cores, é mostrada em uma ilustração gráfica da sequência primária das proteínas. Os números acima destas caixas indicam o primeiro e último aminoácidos de cada motivo MEME. O valor p de cada proteína modelada por MEME é indicado. B - Representação do logotipo da composição da sequência dos motivos MEME em aminoácidos.

Fonte: Elaborada pela autora.

MOTIF LOCATIONS

 Only Motif Sites [?](#)
 Motif Sites+Scanned Sites [?](#)
 All Sequences [?](#)

| Name ? | p-value ? | Motif Location ? |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1. XP_016592023.1 | 1.04e-23 | |
| 2. 1KPH:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 4.96e-229 | |
| 3. 1KPI:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 4.48e-188 | |
| 4. 1TPY:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 4.12e-233 | |
| 5. 2FK8:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 2.72e-197 | |
| 6. 3UJ6:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 2.76e-96 | |
| 7. 4INE:B PDBID CHAIN SEQUENCE | 1.07e-104 | |
| 8. 4IV0:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 2.48e-96 | |
| 10. 4KRH:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 1.66e-109 | |
| 11. 5WP4:A PDBID CHAIN SEQUENCE | 3.81e-91 | |

| Logo | E-value ? | Sites ? | Width ? | More ? | Submit/Download ? |
|------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| | 1.1e-070 | 10 | 23 | ↓ | → |
| | 4.3e-062 | 4 | 50 | ↓ | → |
| | 1.4e-052 | 4 | 50 | ↓ | → |
| | 4.6e-047 | 4 | 50 | ↓ | → |
| | 5.1e-048 | 10 | 28 | ↓ | → |
| | 7.2e-037 | 4 | 41 | ↓ | → |
| | 1.4e-036 | 5 | 38 | ↓ | → |
| | 9.7e-033 | 5 | 50 | ↓ | → |

Stopped because requested number of motifs (8) found.

Modelos MEME das sequências primárias de proteína molde, *templates* 1KPH, 1KPI, 1TPY, 2FK8, 3UJ6, 4INE, 4IV0, 4KRH e 5WP4, do I-Tasser. Um modelo de sequência primária gerada por MEME composta por até 8 motivos nas 10 proteínas. A localização desses motivos, representados como caixas codificadas por cores, é mostrada em uma ilustração gráfica da sequência primária das proteínas. Os números acima destas caixas indicam o primeiro e último aminoácidos de cada motivo MEME. O valor p de cada proteína modelada por MEME é indicado. B - Representação do logotipo da composição da sequência dos motivos MEME em aminoácidos.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Tabela 2 - Comparação do alinhamento dos *templates* com os respectivos modelos da enzima 24 Δ esterol metiltransferase do *S.schenckii* para a obtenção do RMSD (RMSD = Raiz do Desvio Médio Quadrático = Å)

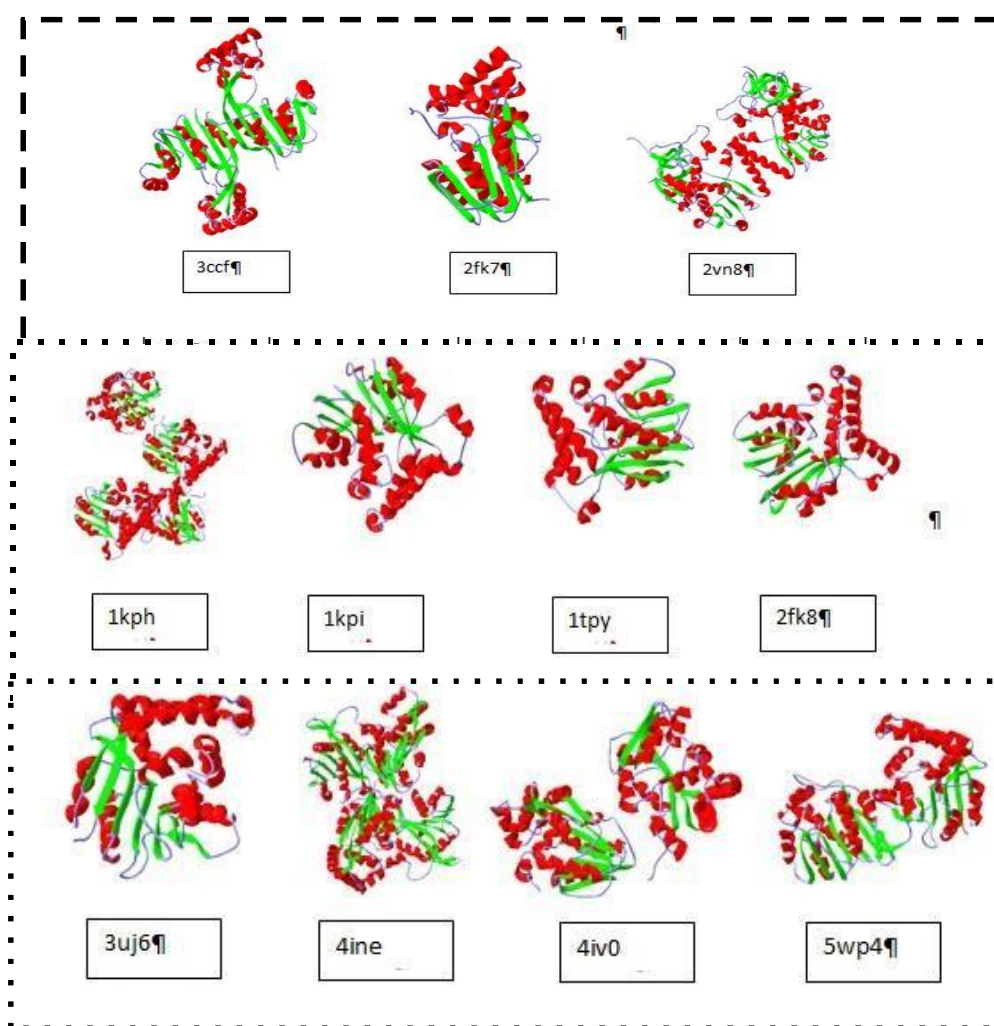
| Servidor | Alinhamento (<i>Template/Modelo</i>) | RMSD |
|--------------------|---|-------------|
| <i>I-Tasser</i> | 1KPH/ Modelo 1 | 1,44 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 1KPI/ Modelo 5 | 1,41 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 1TPY/ Modelo 1 | 1,35 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 2FK8/ Modelo 1 | 1,40 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 3UJ6/ Modelo 1 | 1,00 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 4INE/ Modelo 2 | 0,77 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 4IV0/ Modelo 1 | 1,07 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 4IV0/ Modelo 2 | 1,07 Å |
| <i>I-Tasser</i> | 5WP4/ Modelo 1 | 0,75 Å |
| <i>Swiss Model</i> | 3CCF/ Modelo 1 | 0,89 Å |
| <i>Swiss Model</i> | 2FK7 / Modelo 2 | 0,52 Å |
| <i>Swiss Model</i> | 2VN8 / Modelo 2 | 1,59 Å |

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a análise dos escores RMSD, *T-coffee* e MEME, construiu-se os modelos 3D da 24 SMT. De acordo com Nes (2003), as SMT ADOMET dependentes são tetrâmeros em que cada cadeia possui sete folhas- β no mesmo sentido (a exceção de uma) intercaladas com α -hélices e seus sítios catalíticos são compostos por Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico ou Tirosina (Figura 12). Elas são

enzimas predominantemente eletronegativas, pois interagem com um carbocátion durante a metilação da S-adenosil-L-metionina. Para verificar o perfil de eletronegatividade dos templates 3CCF, 2FK7, 2VN8, 1KPH, 1KPI, 2TPY, 2FK8, 3UJ6, 4INE, 4IV0 e 5WP4 calculamos os mapas de potencial eletrônico utilizando o programa *Swiss PDB Viewer* (Figura 13). Os modelos 3D também foram avaliados segundo esses critérios estruturais.

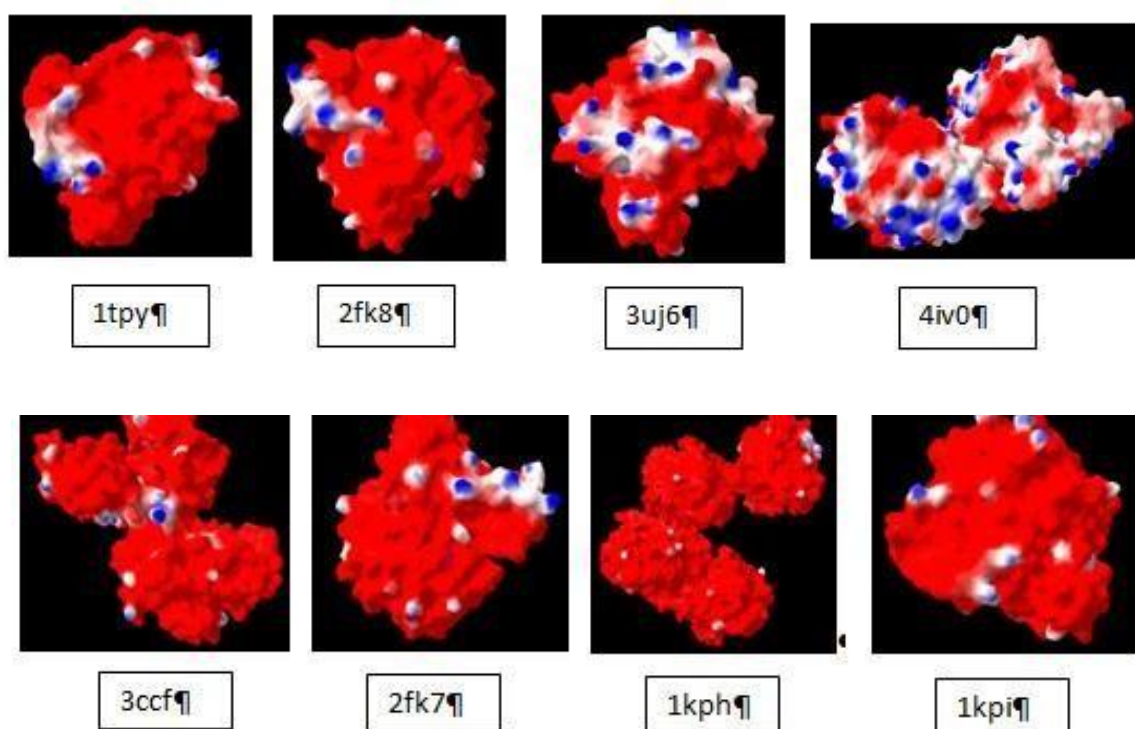
Figura 12 - Estrutura 3D dos templates selecionados pelo *Swiss Model* em 3D (-) e pelo I-Tasser (.) para a construção do modelo do 24 SMT.



Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a figura 12, pôde-se observar que os *templates* 2VN8, 4INE e 5WP4 não apresentam as sete folhas- β como descritas por Nes (2003), sendo, portanto, eliminadas para o desenvolvimento do modelo proteico. Observa-se a presença de sete folhas- β nos templates 3CCF E 2FK E NOS 1KPH, 1KPI, 1TPY, 2FK8, 3UJ6 e 4IV0. O template 1KPH se mostrou como uma das estruturas mais similares às características de uma SMT.

Figura 13 - Comparação do mapa de potencial eletrostático da superfície dos templates selecionados pelo Swiss Model e pelo I Tasser.



Fonte: Elaborada pela autora. Observa-se a prevalência de superfícies eletronegativas.

Na avaliação do mapa de potencial eletrônico, observou-se a prevalência de superfícies moleculares eletronegativas, confirmando a característica das metiltransferases como eletronegativas. Contudo, seguindo o princípio de que na natureza, quanto menor a energia, mais estável é a molécula, o modelo 4IV0, tanto por apresentar-se uma molécula mais estável como por ter apresentado um alto escore *T-coffee* foi eleito com um dos modelos prováveis da SMT.

As enzimas SMT ADOMET dependentes estão presentes na maioria dos fungos, a exceção dos oomicetos *Pythium* e *Phytophthora*, pois não possuem

ergosterol na sua membrana celular (CHUNG *et al.*, 2000). Cada modelo não eliminado foi classificado segundo sua estequiometria, tipo de proteína e microrganismo ao qual pertence (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação dos *templates* por estequiometria, proteína e microrganismo.

| PDB | Estequiometria | Proteína | Microrganismo |
|------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 3CCF | Dímero | Metil transferase | <i>Anabaena variabilis</i> |
| 2FK7 | Monômero | HMA transferase | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| 1KPH | Tetrâmero | CMA transferase | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| 1KPI | Monômero | CMA transferase | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| 1TPY | Monômero | Ciclopropano sintase transferase | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| 2FK8 | Monômero | HMA transferase | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| 3UJ6 | Monômero | Fosfoetanolamina metiltransferase | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| 4IV0 | Dímero | N-metiltransferase | <i>Plasmodium vivax</i> |

Fonte: Elaborada pela própria autora.

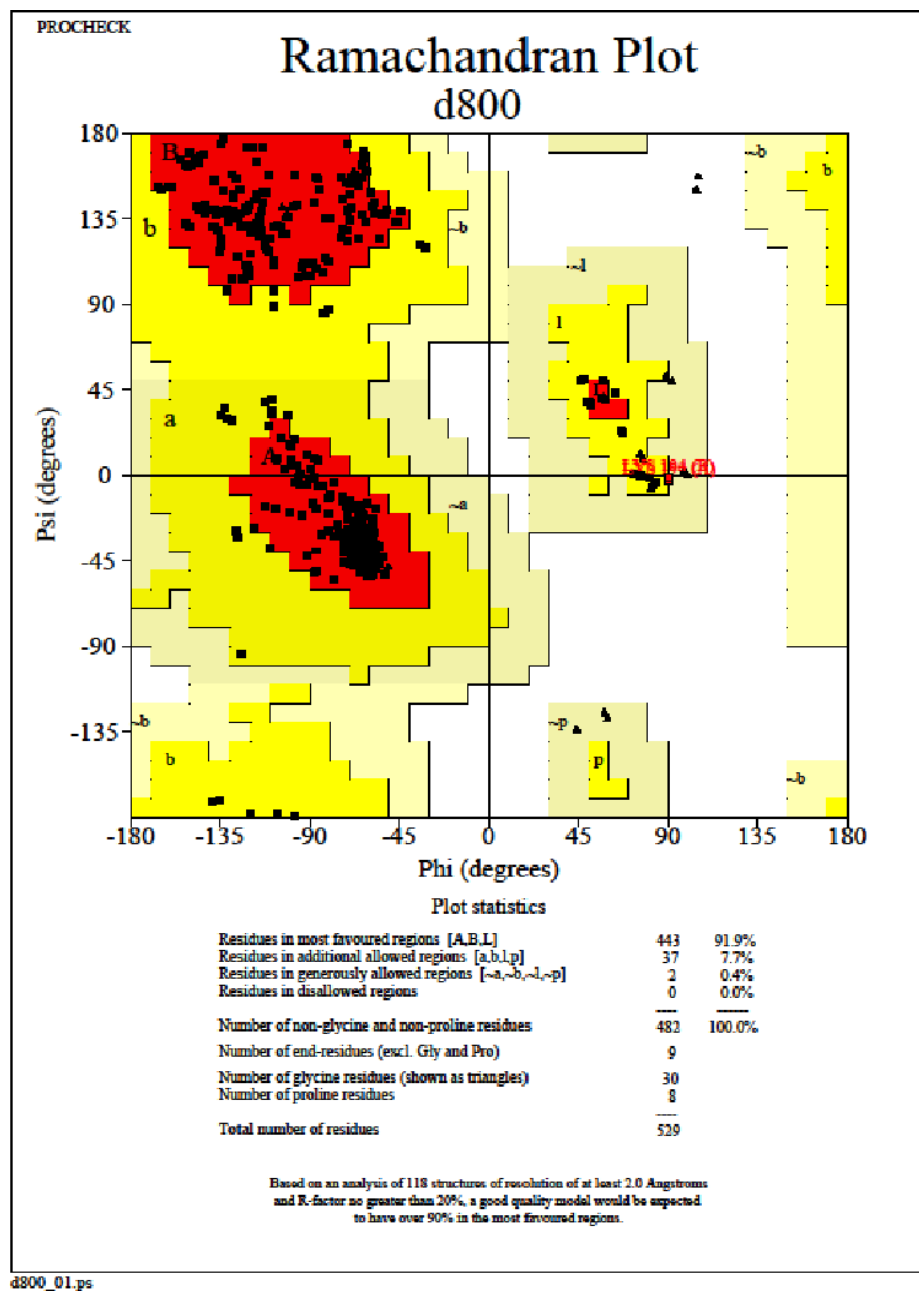
Os *templates* 3CCF e 4IV0 são metiltransferases, confirmando o *template* 4IV0 como viável para o desenvolvimento do modelo 3D, sem descartar o *template* 3CCF. O *template* 1KPH, apesar de ter todas as características de uma metiltransferase, é uma *Ácido Ciclopropano Sintase*, isto é, uma proteína ácida, o que justifica sua superfície intensamente eletronegativa.

Os *templates* escolhidos foram submetidos ao programa *Procheck* hospedado no servidor *PDBSum Generate* para cálculo da energia individual de cada aminoácido (Figuras 14 e 15). Ambos os *templates* escolhidos apresentaram escore de similaridade acima de 95% com todos ou a grande maioria dos aminoácidos dentro das regiões permitidas. Somente dois aminoácidos do modelo 1KPH estavam na região não permitida por serem aminoácidos próximos às extremidades da cadeia.

Por fim, fez-se a avaliação dos sítios catalíticos de cada *template* escolhido, confirmando o *template* 4IV0 como o mais viável para a construção do modelo final da proteína 24 Δ -esterol metiltransferase devido ao sítio catalítico formado por um *Ácido Aspártico* como previsto para a interação com o sítio de

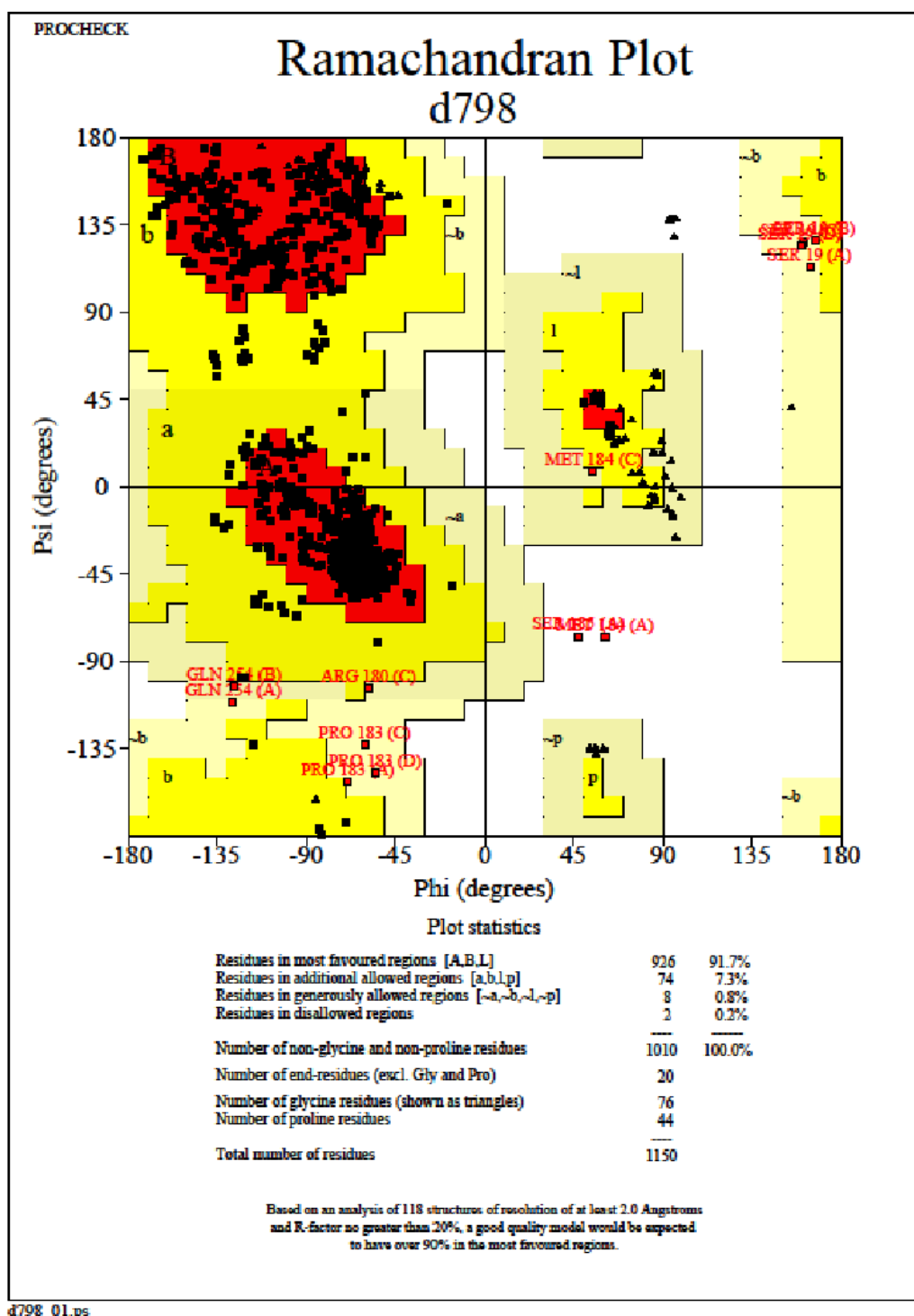
ligação com a metionina (Figuras 16 e 17).

Figura 14 - Análise da qualidade da estrutura do template 4iv0 através do Gráfico de Ramachandran.



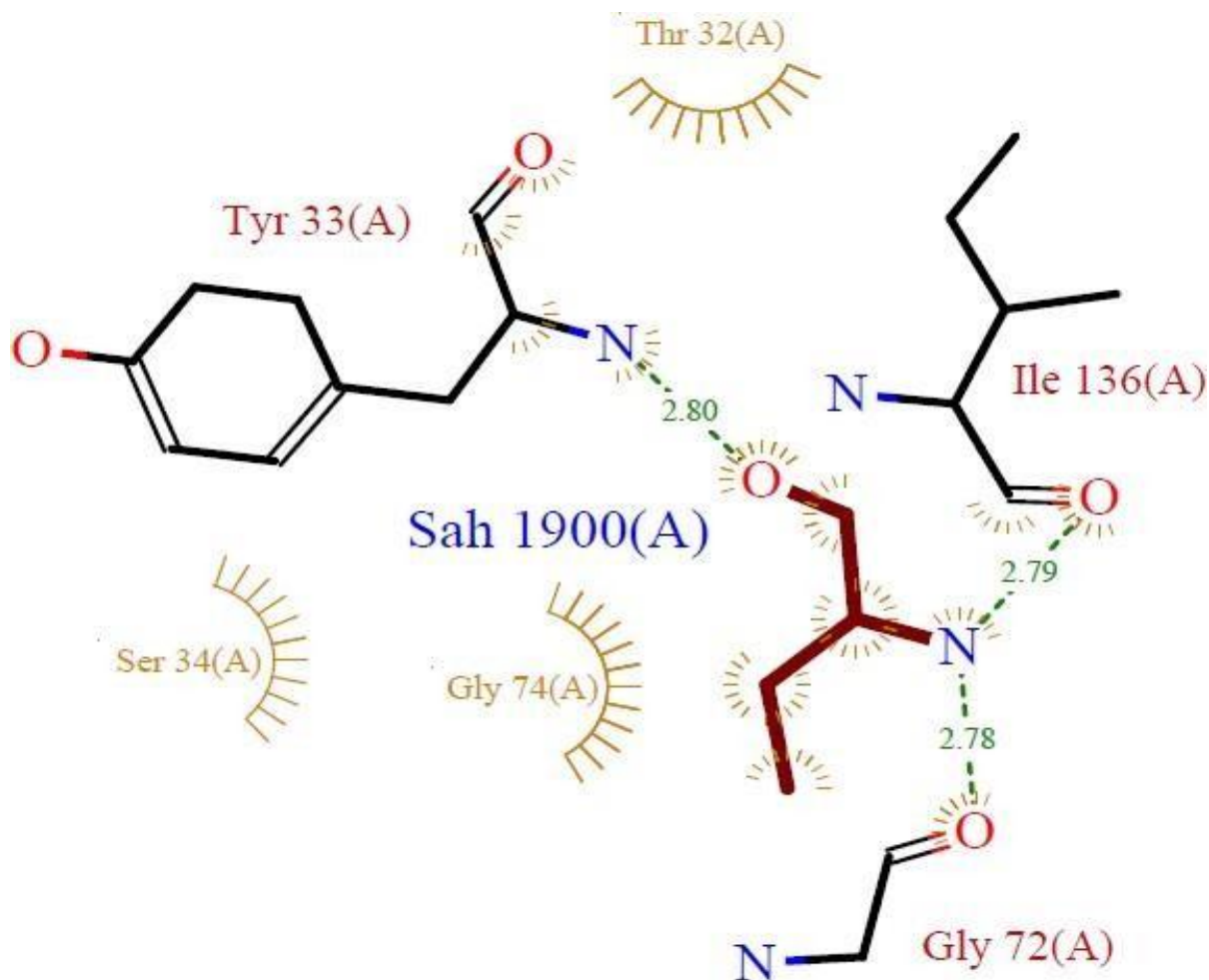
Fonte: Elaborada pela própria autora. Soma dos resíduos na região favorável e dos resíduos nas regiões permitidas igual a 99,6%, mostrando a estabilidade da molécula.

Figura 15 - Análise da qualidade da estrutura do template 1kph através do Gráfico de Ramachandran.



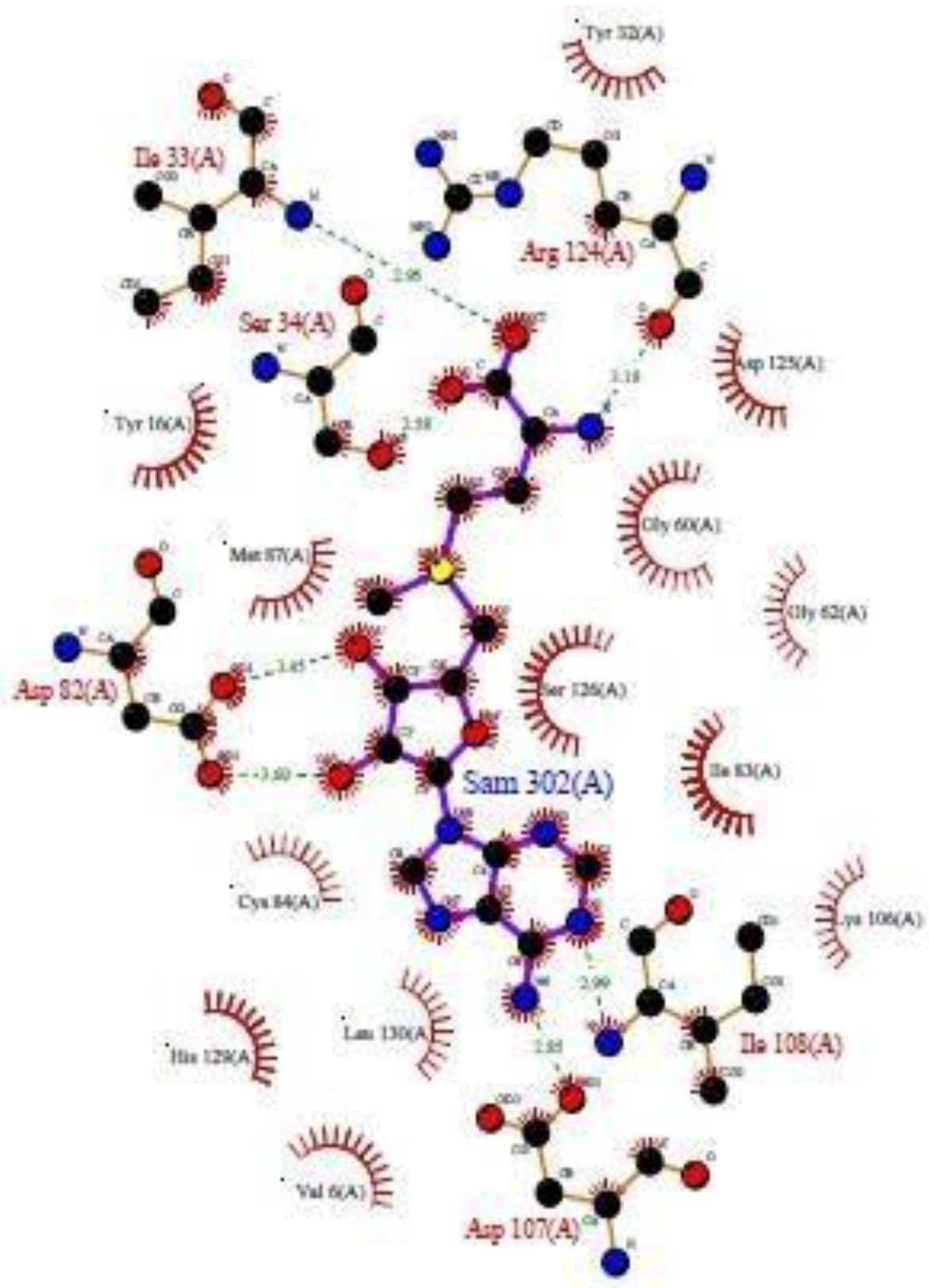
Fonte: Elaborada pela própria autora. Soma dos resíduos na região favorável e dos resíduos nas regiões permitidas igual a 99%, mostrando a estabilidade da molécula.

Figura 16 – Zoom do Sítio de ligação do template 1KPH, mostrando os aminoácidos envolvidos na rede de interações necessárias para a reatividade enzimática.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 17 – Zoom do Sítio de ligação do template 4IV0, mostrando os aminoácidos envolvidos na rede de interações necessárias para a reatividade enzimática.

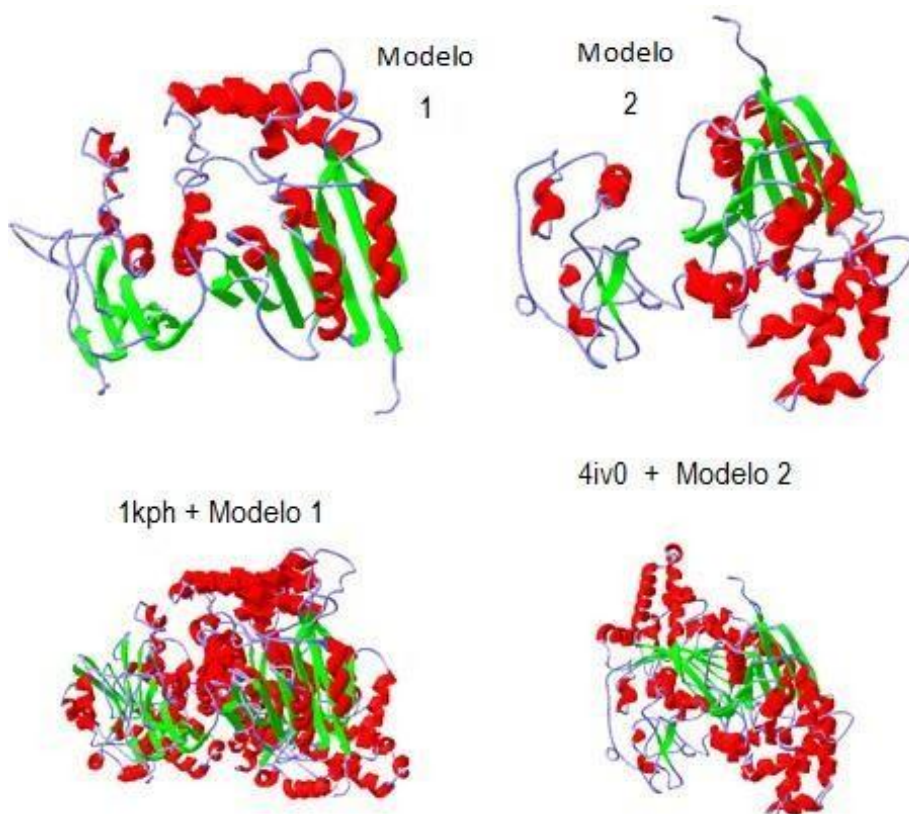


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Com base nos *templates* escolhidos, foram criados os modelos 1 e 2, minimizados no programa SPDBV e seus escores de confiança e RMSD com ambos os *templates* foram avaliados. Ambos apresentaram níveis satisfatórios de escore de confiança, o modelo 1 apresentando C-escore= -1,49 e o modelo 2 apresentando C- escores= -1,40. As taxa de desvio médio quadrático também apresentaram valores satisfatórios, apresentando o alinhamento do modelo 1 com molde 1KPH RMSD= 1,35 Å, modelo 1 com molde 4IV0 RMSD= 1,02 Å, modelo 2 com molde 1KPH RMSD= 1,53 Å e modelo 2 com molde 4IV0 RMSD= 1,02 Å.

Os modelos foram alinhados com seus respectivos templates para a observação da superposição das estruturas secundárias onde constatou-se que o modelo 1 com molde 1KPH e modelo com molde 4IV0 estavam satisfatoriamente alinhados (Figura 18).

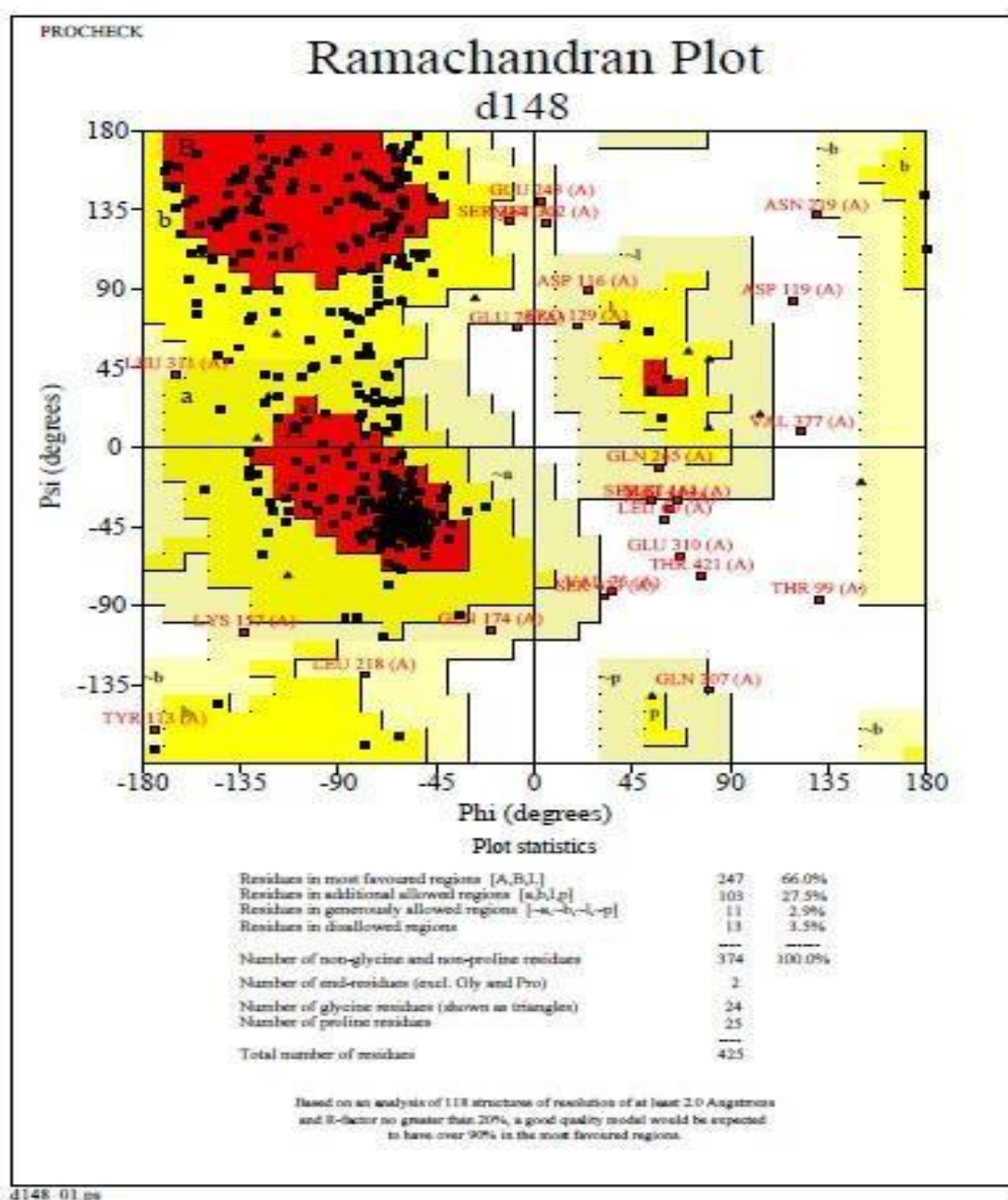
Figura 18 - Alinhamentos entre modelos 1 e 2 os seus templates 1KPH e 4IV0.



Fonte: Elaborada pela autora.

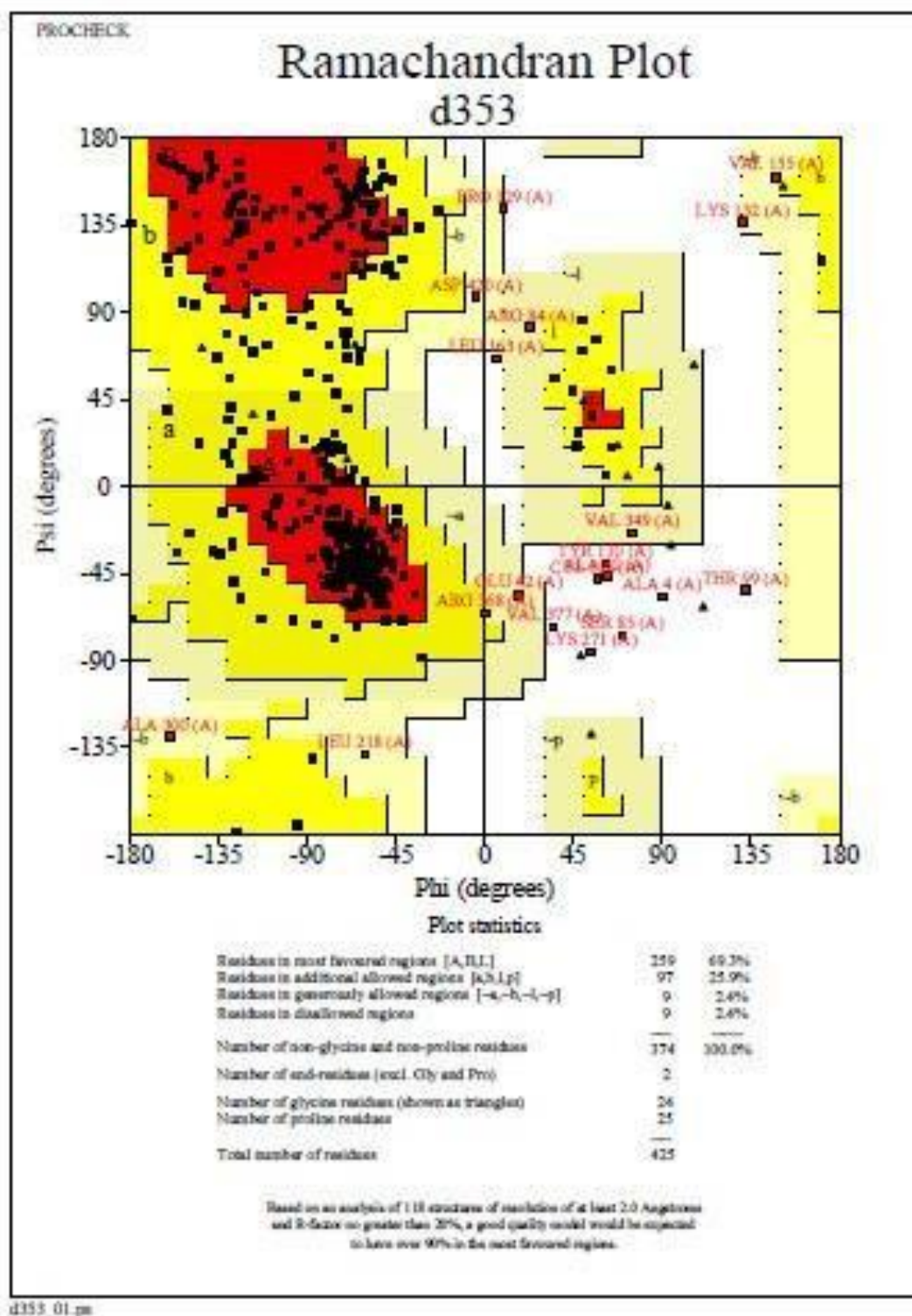
Os modelos foram submetidos ao Procheck para avaliação energética de seus aminoácidos através do mapa de Ramachandran. O modelo 1 apresentou a soma dos aminoácidos nas regiões favoráveis e nas regiões permitidas igual a 93,5% (Figura 19), isto é, um valor mediano que indica que este modelo pode ser otimizado com a minimização de energia. O modelo 2 apresentou a soma dos aminoácidos nas regiões favoráveis e nas regiões permitidas igual a 95,2% (Figura 20), um valor satisfatório validando este modelo como estável.

Figura 19 - Análise da qualidade da estrutura do modelo 1 através do Gráfico de Ramachandran.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20 - Análise da qualidade da estrutura do modelo 2 através do Gráfico de Ramachandran.



Fonte: Elaborada pela autora.

O modelo 2 da 24SMT do *Sporothrix schenckii* que apresentou melhor resultado na validação ainda foi comparado com o grupo de metil transferases de outros organismos de importância médica e/ou econômica, dentre eles fungos,

bactérias e plantas, apresentando certo grau de similaridade, incluindo: *Sporothrix brasiliensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neosartorya fumigata*, *Neurospora crassa*, *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans* e *Arabidopsis thaliana* (Figura 21).

Os aminoácidos que possuem mesma coloração, estão em mesmas características químicas, podendo elas serem ácidas, básicas, neutras ou apolares. Houve poucos aminoácidos idênticos, contudo muitos aminoácidos sofreram troca conservativa (Figura 21, continuação 1), isto é, apresentaram similaridade de aminoácidos (Figura 21, continuação 2) e portanto, as mesmas características químicas da enzima, confirmando que podem ter evoluído a partir de um ancestral comum.

Figura 21 - Alinhamento múltiplo da sequência do modelo 2 do 24SMT com a de outros microorganismos de importância médica e/ou econômica, incluindo: *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neosartorya fumigata*, *Neurospora crassa*, *Sporothrix brasiliensis*, *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida albicans*.

Coloração dos resíduos por característica química

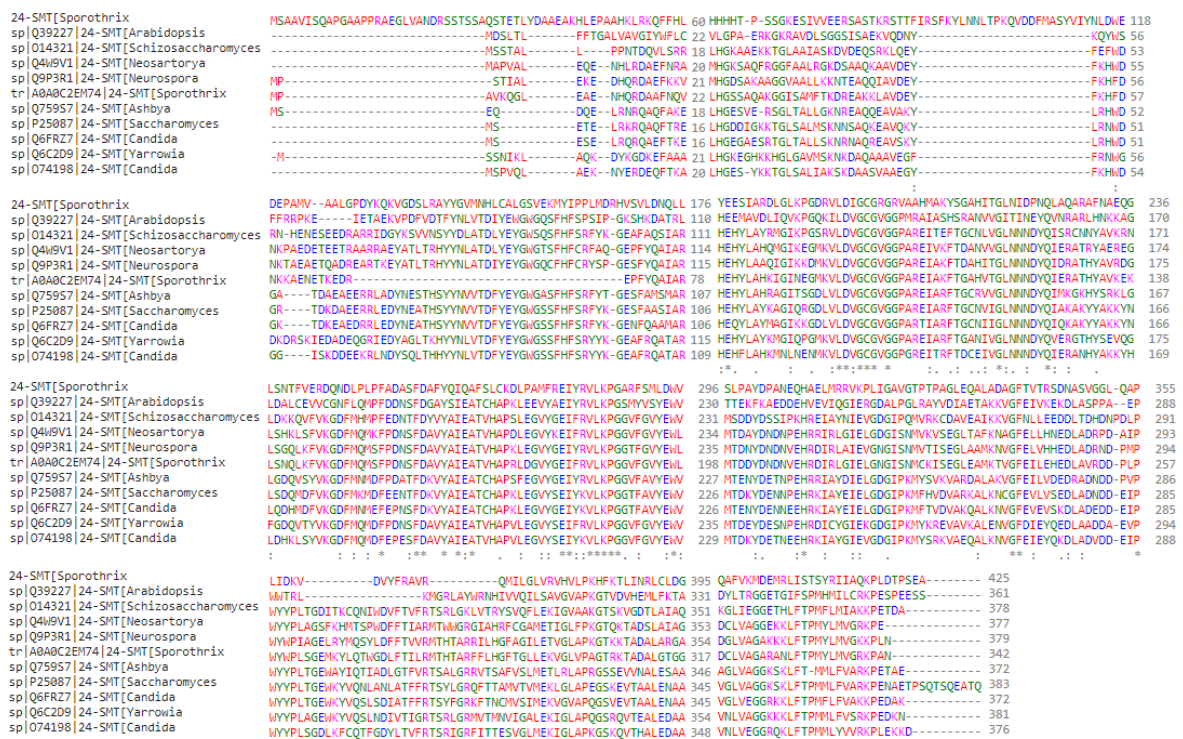
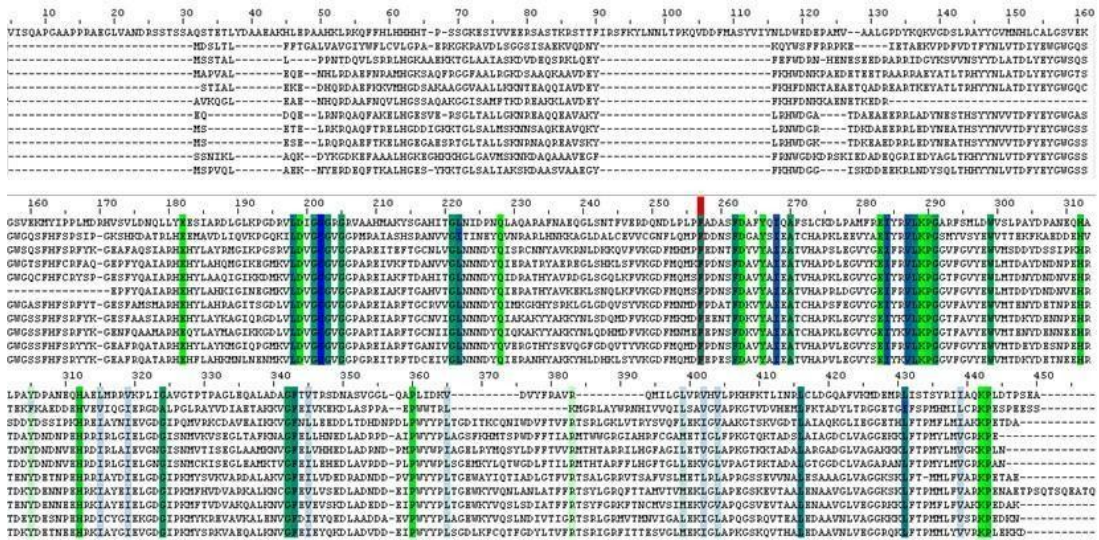


Figura 21 - Alinhamento múltiplo da sequência do modelo 2 do 24SMT com a de outros microorganismos de importância médica e/ou econômica, incluindo: *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neosartorya fumigata*, *Neurospora crassa*, *Sporothrix brasiliensis*, *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida albicans* (Continuação 1).

Coloração dos resíduos por identidade e presença em todos analisados



Coloração dos resíduos por grau de identidade com troca conservativa

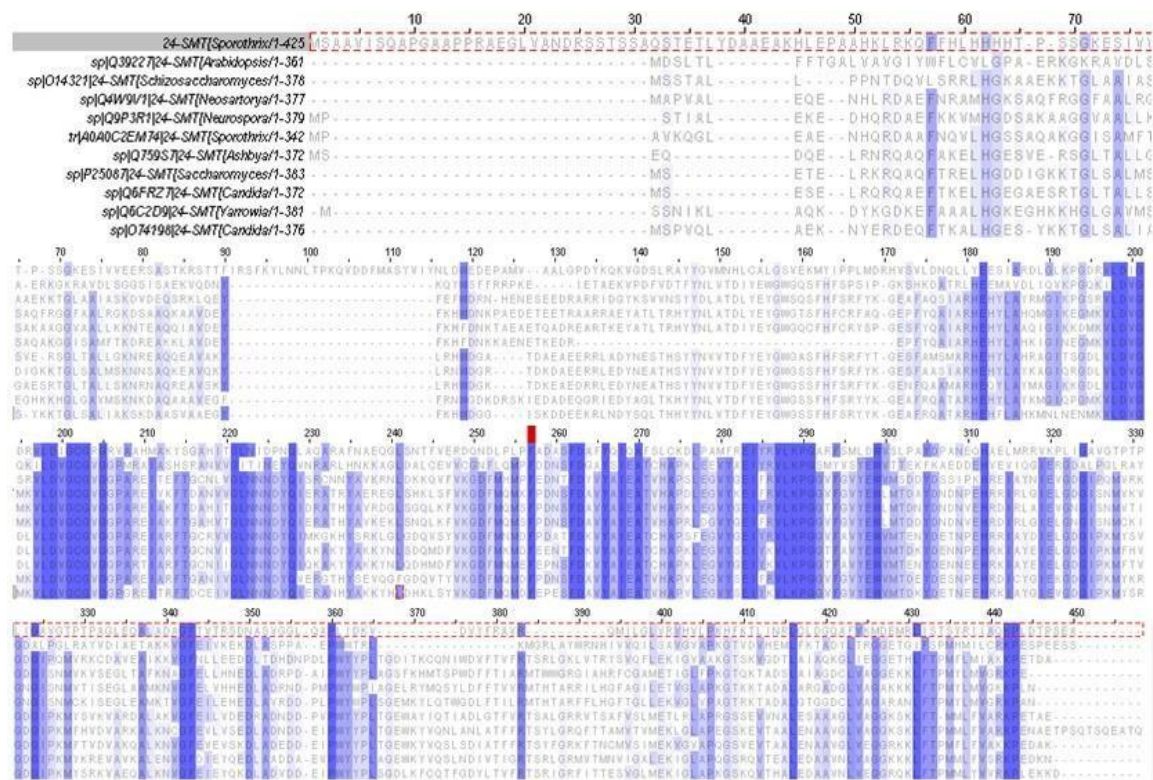
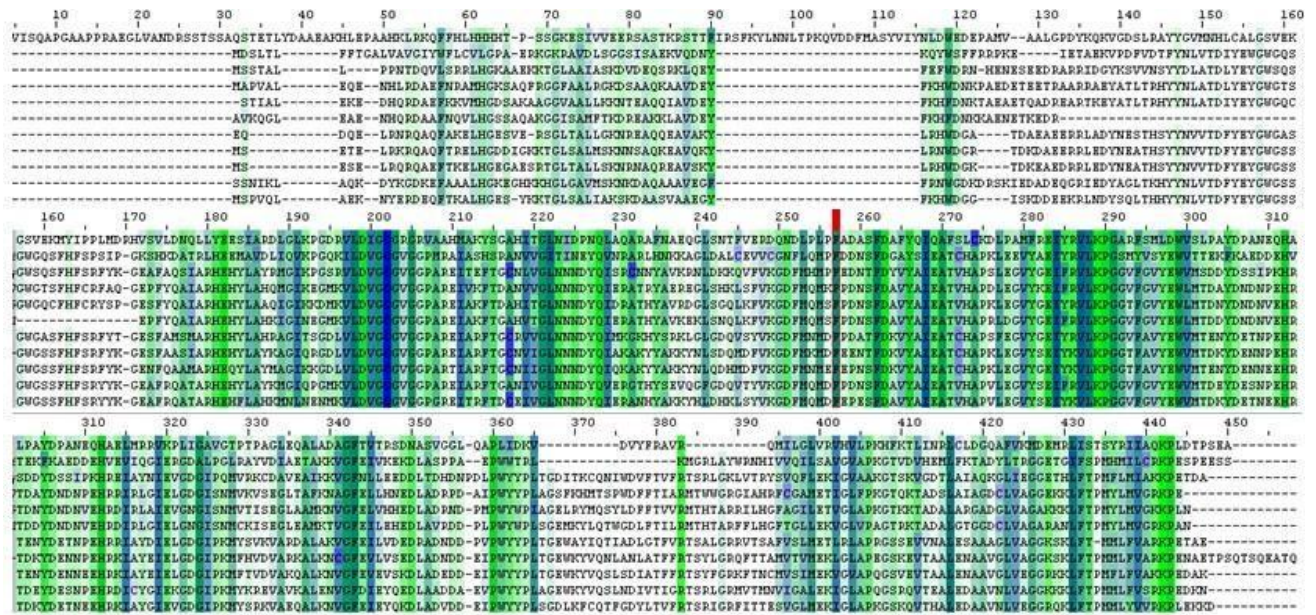


Figura 21 - Alinhamento múltiplo da sequência do modelo 2 do 24SMT com a de outros microorganismos de importância médica e/ou econômica, incluindo: *Sporothrix brasiliensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neosartorya fumigata*, *Neurospora crassa*, *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans* e *Arabidopsis thaliana* (Continuação 2).

Coloração dos resíduos por similaridade



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da sequência revelou um loop entre os aminoácidos 90 a 115 que não está presente em nenhuma das 11 sequências avaliadas, além de outras substituições que não são compartilhadas com outras enzimas da mesma família. Isso infere uma diferença estrutural que poderá ser explorada para o desenho de novos fármacos mais específicos, que poderão não comprometer o tratamento de outras infecções fúngicas devido ao processo de multiresistência.

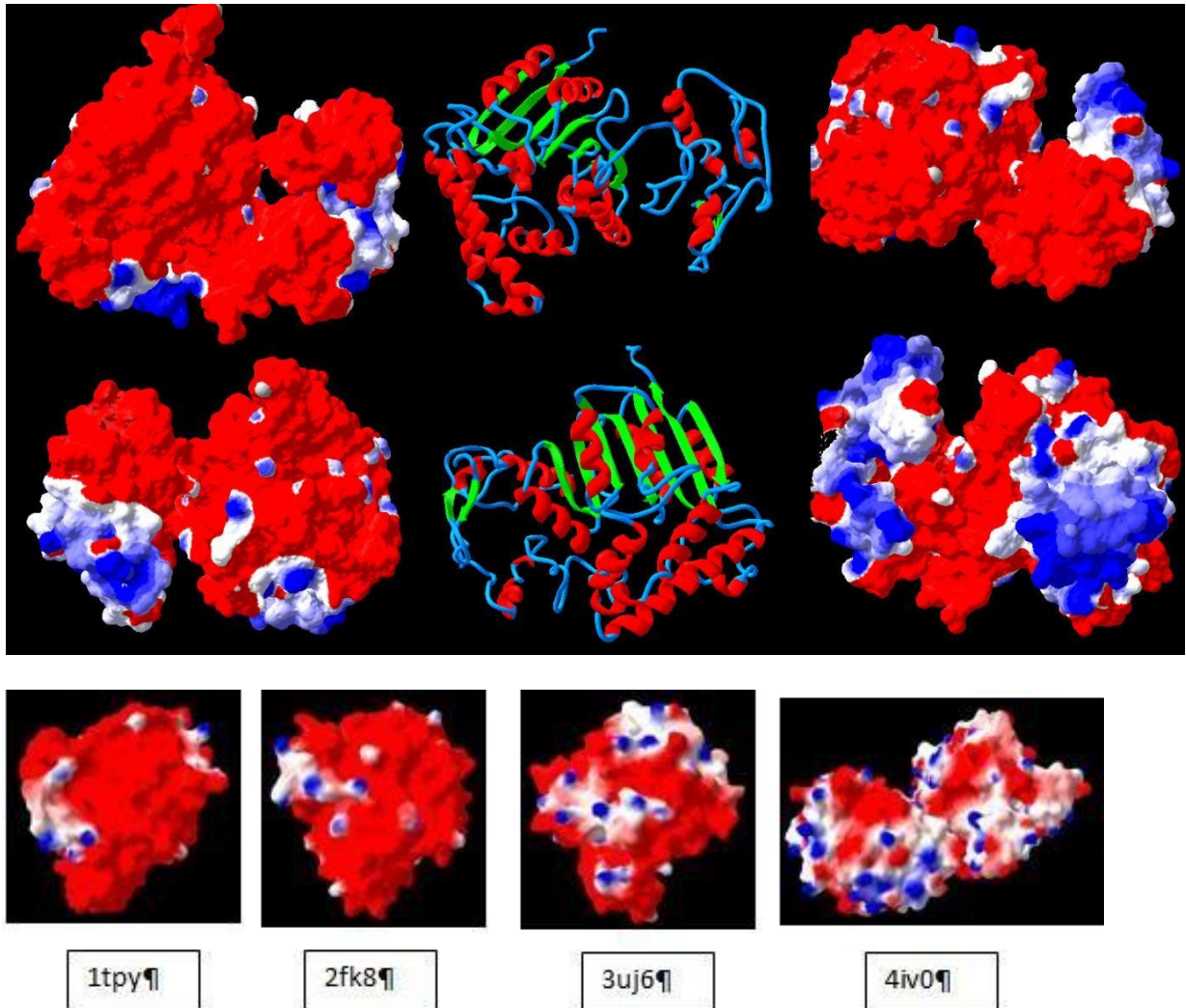
As metiltransferases são uma classe grande e diversa de enzimas que catalisam a transferência de grupos metila de S-adenosil L-metionina (AdoMet) a uma ampla gama de substratos, incluindo pequenas moléculas, ácidos nucleicos e proteínas. Apesar do uso de um cofator comum, o AdoMet, o mecanismo de transferência de metila não é conservado entre metiltransferases. Isso pode ser refletido na falta de sequências de *motifs* bem distintas que definem os locais ativos de metiltransferases, diferentemente das sequências de *motifs* dos sítios de ligação de nucleotídeos das quinases e desidrogenases. E embora AdoMet seja o segundo

cofator mais comumente usado após o ATP, há relativamente poucas descrições estruturais dos locais de ligação com o AdoMet (DJORDJEVIC and STOCK, 1997).

Apesar de faltarem informações estruturais sobre as enzimas metiltransferases, a análise estrutural da enzima indica que o sítio de ligação com o AdoMet é caracterizado pela conformação específica de um loop de folhas β e α hélices dentro do domínio do sítio de ligação com o cofactor (DJORDJEVIC and STOCK, 1997).

Com relação ao modelo criado, a análise do mapa de potencial eletrostático evidencia uma molécula com mais regiões ácidas do que regiões básicas, confirmando a descrição da literatura sobre o seu padrão ácido (Figura 22).

Figura 22 - Comparação dos mapas de potencial eletrostático do modelo 2 da 24 SMT (maior acima) e dos *templates* (menor abaixo) apontados pelos programas de modelagem por homologia pela similaridade estrutural. Carga positiva em azul, carga negativa em vermelho, alfa-hélice em vermelho e beta -pregueada em verde.



Fonte: Elaborada pela autora.

A literatura recente mostra o uso de ferramentas de bioinformática na identificação genômica, anotação, análise filogenética e análise comparativa envolvendo proteínas da família P450 de *S. schenckii*. Baseada na resistência do *S. schenckii* ao cetoconazol e na análise estrutural *in silico* do CYP51, observa-se nos dados do genoma de *S. schenckii* 40 P450s agrupados em 32 famílias e 39 subfamílias (YASUDA *et al.*, 2018).

Análises comparativas abrangentes revelaram que *S. schenckii* compartilha 11 famílias de P450 com fungos patogênicos para plantas, mas possui três famílias únicas de P450: CYP5077, CYP5386 e CYP5696 (nova família)

(YASUDA *et al.*, 2018).

A modelagem 3D da CYP51 de *S. schenckii* revelou a presença de motivos característicos de P450 com um local de interação redutase . A análise revelou um número de mutações que podem ser associadas à resistência ao cetoconazol, especialmente na entrada do canal no sítio ativo. Uma das possíveis razões para uma melhor estabilização do itraconazol, em comparação com o cetoconazol, é que a molécula pode formar uma ligação de hidrogênio com o ASN-230 (YASUDA *et al.*, 2018).

De modo similar, encontramos dados para a 24SMT que apontam para a necessidade de uma investigação mais detalhada sobre a composição de aminoácidos e sua distribuição eletrônica próxima a região de ligação e do sítio ativo, para que se possa avaliar a possibilidade de realizar estudos de docking e dinâmica no sentido. de desenhar novos fármacos para o tratamento da esporotricose.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho utilizamos técnicas de modelagem molecular para caracterizar a enzima 24 Δ -esterol metiltransferase do *Sporothrix* como um alvo biotecnológico para o tratamento da esporotricose obtendo as seguintes conclusões:

Quanto às enzimas com mais alto grau de identidade e similaridade estrutural à enzima 24 Δ -esterol metiltransferase, foram identificadas as enzimas N-metiltransferase de *Plasmodium vivax* (PDB=4IV0) e a Sintase de ciclopropano de ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB=1KPH) em acordo com a literatura que indica similaridade dessas enzimas com outras metiltransferases.

Um modelo por homologia da enzima 24 Δ -esterol metiltransferase foi construído, utilizando os templates/moldes com maior similaridade (PDB = 1KPH e 4IV0), e apresentou uma conservação estrutural com dez alfa-hélices e sete folhas beta-pregueadas.

O processo de validação do modelo final da 24 Δ -esterol metiltransferase com o gráfico de Ramachandran confirmou a confiabilidade da estrutura mostrando valores acima de 95%.

A análise comparativa com o modelo e as enzimas da mesma família nos níveis estruturais 1^a, 2^a e 3^a revelaram que 24SMT, apesar de conservar sua estrutura 3D, apresenta diferenças como um loop adicional entre os aminoácidos 90 a 115, além de diversas substituições não conservativas, que podem ser alvos de ligação específica para novos agentes antifúngicos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS J. L. *et al.* In *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Eds. **Pergamon**: Oxford, v. 2, p. 333-364. 1990.
- ALDER B.J.; WAINWRIGHT T.E. Studies in molecular dynamics: General method. **Journal of Chemical Physics**, v. 31, p. 459-466, 1959.
- ALMEIDA-PAES R. *et al.* Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations neglected tropical diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.9, p. e3094, 2014. Disponível em: <www.plosntds.org>. Acesso em: 01 set. 2014.
- ARENAS R. *et al.* Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. **J Fungi (Basel)**. May 23, v.4, n. 2, p. 62. 2018.
- ARMSTRONG-JAMES D.; MEINTJES G.; BROWN G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p.120-127. 2014.
- BAILEY T.L.; ELKAN C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers. **UCSD Technical Report**, .p. 28-36, 1994.
- BAILEY T.L. *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic acids research**. May 20, v.37, p.202, 2009.
- BARROS M.B. *et al.* Cat transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clin Infect Dis**, p. 529, 2004.
- BARROS M.B. *et al.* An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol Infect**, p.1192. 2008.
- BARROS M.B.L. *et al.* Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Rev Panam Salud Publica**, p.455, 2010.
- BARROS M.B.L.; ALMEIDA-PAES R.; SCHUBACH A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.24, p.633, 2011.
- BELL A.A.; WHEELER M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.411, 1986.
- BENNER S.A. *et al.* Bona fide predictions of protein secondary structure using transparent analyses of multiple sequence alignments. **Chemical Reviews**. Dec 18, v.2725, p. 844. 1997.
- BIASINI M. *et al.* Swiss-Model: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v.42, n.1, p.252, 2014.

BONNEAU R. *et al.*: Rosetta in CASP4: Progress in ab initio protein structure prediction. **Proteins**, v. 45,n. 5, p.119-126, 2001.

BORBA-SANTOS L.P. *et al.* Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, n.4, p.415-422, 2015.

BORBA-SANTOS L.P. *et al.* Adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26 is more active against *Sporothrix schenckii* than miltefosine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.111, n.8, p.523-527, 2016a.

BORBA-SANTOS L.P. *et al.* 241-sterol methyltransferase plays an important role in the growth and development of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Front Microbiol**. Fundação Oswaldo Cruz, v.7, n. 311, Brasil, Marc 11, 2016 b.

BOURGEOIS C. *et al.* Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and testing. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.401-408, 2010.

BOWIE J.U.; LÜTHY R.; EISENBERG D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v.253, n.5016, p.164-70, 1991.

BRILHANTE R.S. *et al.* In vitro inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v.53, n.2, p.93-98, 2015.

BROWN G.D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Sci Transl Med**. v.4, n.165, p. 165, Dec 19, 2012.

BUTLER M.J.; DAY A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.1115-1136, 1998.

CARLOS I.Z. *et al.* Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**. v.168, p. 1-10, 2009.

CASSILLY C.D.; REYNOLDS T.B. PS, It's Complicated: The Roles of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in the Pathogenesis of *Candida albicans* and Other Microbial Pathogens. **J Fungi (Basel)**. v.4, n.1, p. 28, Feb 20, 2018.

CHAKRABARTI A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Med Mycol**, v.53, p. 3-14, 2015.

CHARLES K. *et al.* Painful linear ulcers: A case of cutaneous sporotrichosis mimicking pyoderma gangrenosum. **JAAD Case Rep**, v.3, n. 6, p. 519-521 Nov 6, 2017.

CHUNG S.K. *et al.* Design and synthesis of potential inhibitors of the ergosterol biosynthesis as antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, p.2475-2486, 2000.

CRUZ L.C.H. Micologia veterinária. **Revinter**, Rio de Janeiro, 2010.

CRUZ L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*: Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Vet. e Zootec.** v. 20, Ed. Comemorativa, p. 08-28. 2013.

DASILVA E.J. The Colour of Biotechnology: science, development and humankind. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 01-02. 2004.

De SOUZA W.; RODRIGUES J.C.F.. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosoma drugs. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.** 642502. doi: 10.1155/2009/642502. 2009.

DIAZ I.A.C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v.108, p.113, 1989.

DJORDJEVIC S.; STOCK A.M. Crystal structure of the chemotaxis receptor methyltransferase CheR suggests a conserved structural motif for binding S-adenosylmethionine. **Structure**, v. 5, n. 4, 1997.

DUNSTAN R.W.; Reimann K.A.; Langham R.F. Feline sporotrichosis. **J Am Vet Med Assoc**, v.189,p.880. 1986.

EISENBERG D.; LÜTHY R.; BOWIE J.U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. In **Methods in enzymology**, v. 277, p. 396-404, Academic Press, Jan 1, 1997.

ESPINEL-INGROFF A. *et al.* Multicenter and international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for species of *Sporothrix* identified by molecular methods. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 61, n. 10, 2017.

EYER-SILVA W.A.; SILVA G.A.R.; MARTINS C.J. A Challenging Case of Disseminated Subcutaneous Mycosis from Inner Rio de Janeiro State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.97, n. 5, p. 1280-1281, Nov 8, 2017.

FAROOQUI S.M.; YOUNESS H. The Infection Returns: A Case of Pulmonary Sporotrichosis Relapse after Chemotherapy. **Case Rep Med.** doi: 10.1155/2018/1384029. 2018.

FAUMAN E.B., BLUMENTHAL R.M. ; CHENG X. Structure And Evolution Of Adomet-Dependent Methyltransferases. **S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions** . Blumenthal (eds.), pp. 1-38. World Scientific Publishing. 1999.

FERNANDES C.M.; Goldman G.H.; Poeta M.D. Biological Roles Played by Sphingolipids in Dimorphic and Filamentous Fungi. **M Bio**. May-Jun; 9(3): e00642-18. DOI: 10.1128/mBio.00642-18. 2018.

FRANÇA T.C. Homology modeling: an important tool for the drug discovery. **J Biomol Struct Dyn**, v. 33, n. 8, p. 1780-1793. doi:10.1080/07391102.2014.971429. Epub 2014, Nov 6, 2015.

FREITAS D. F. S., GALHARDO M. C. G. , OLIVEIRA R. M. Z. Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose. **Tese**. Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Fev 2014.

GALHARDO M.C.G. Esporotricose zoonótica no Rio de Janeiro ainda sem controle. **Bol Inf Soc Infectol**, v. 34, p.3-5, 2011.

GARCÍA-LOZANO A. *et al.* Sporothrix schenckii Immunization, but Not Infection, Induces Protective Th17 Responses Mediated by Circulating Memory CD4+ T Cells. **Front Microbiol**, v. 9, p.1275, eCollection 2018, Jun 2018 .

GONÇALVES A.P.; CANIZARE O.; HARMAN R. Sporotrichosis. In: Clinical Tropical Dermatology. **Blackwell Scientific Publications**, Cambridge, Massachusetts, EUA, p.88-93, 1992.

GORIN P.A. *et al.* Further studies on the rhamnomannans and acidic rhamnomannans of Sporothrix schenckii and Ceratocystis stenoceras. **Carbohydrate Research**, v.55, p.21-33, 1977.

GOYAL S. *et al.* The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors. **Front Immunol**, v.9, p.1261, Jun 4, 2018.

GREMIÃO I.D. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 1, Jan 19, 2017.

GUEx N.; PEITSCH M.C. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, n.15, p. 2714-2723, Jan 1,1997.

GUEx, N.; PEITSCH M.C.; SCHWEDE T. Automated comparative protein structure modeling with Swiss-Model and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v.30, n.1, p.162-73, 2009.

HAMED-AZZAM S. *et al.* Rare Orbital Infections ~ State of the Art ~ Part II. **J Ophthalmic Vis Res**, v. 13, n. 2, p. 183-190, Apr-Jun 2018.

HAYDEN E.C. Life is complicated. **Nature**. [PubMed] ,v. 464, p. 664-667, 2010.

HEKTOEN L.; PEERKINS C.F. Refractory sub-cutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, v.5, p.77-90, 1900.

HOGAN L.H.; KLEIN B.S.; LEVITZ S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Review**, v.9, n.4, p.469-88, 1996.

HÖLTJE H.D. *et al.* Introduction to comparative protein modeling. In Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. **Weinheim**, Wiley-VCH, 2003.

HU S.W-H. *et al.* Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1414-1418, 2003.

HUANG X.; MILLER W. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. **Advances in Applied Mathematics**, v. 12, n. 3, p. 337-357. Sep 1, 1991.

IHRKE P.J.; WHITE S.D. Difficult dermatologic diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, p. 51-52, 1994.

IRIZARRY-ROVIRA A.R. *et al.* Diagnosis of sporotrichosis in a donkey using direct fluorescence in labeled antibody testing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, n.2, p.180-183, 2000.

ISENBERG D.; LÜTHY R.; BOWIE J.U. Verify3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. In *Methods in enzymology* . **Academic Press**, v. 277, p. 396-404, Jan 1, 1997.

JACK A.; LEVITT M. Refinement of large structures by simultaneous minimization of energy and R factor. **Acta Crystallographica A**, v. 34, p. 931-935, 1978.

JACOBSON E.S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Review**, v.13, p.708-17, 2000.

JAMPILEK J. How can we bolster the antifungal drug discovery pipeline? **Future Medicinal Chemistry**, v.8, n.12, p.1393-1397, 2016.

JOHNSON M. *et al.* NCBI blast: a better web interface. **Nucleic acids research**, v.36, p.5-9, Apr 24, 2008.

KAPLAN W.; IVENS M.S. Fluorescent antibody staining of *Sporotrichum schenckii* in cultures and clinical materials. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.35, p.151-159, 1960.

KAUFFMAN C. A. *et al.* Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, n.2, p.231-237, 1999.

- KAUFFMAN C.A. Endemic mycoses: blastomycosis, histoplasmosis, and sporotrichosis. **Infect Dis Clin North Am**, v.20, p. 645-662, 2006.
- KHOTIMCHENKO Y. Pharmacological Potential of Sea Cucumbers. **Int J Mol Sci**. v.19, n. 5, p. 1342. May, 2018.
- KIER A.B.; MANN P.C.; WAGNER J.E. Disseminated sporotrichosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.175, p. 202-204, 1979.
- KONNERT J.H.; HENDRICKSON W.A. A restrained parameter thermal factor refinement procedure. **Acta Crystallographica A**, v.36, p.344-350, 1980.
- KWON-CHUNG K.J.; BENNET J.E. **Medical mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.
- LASKOWSKI R.A. *et al.* Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283-291, 1993.
- LASKOWSKI R.A. *et al.* Aqua and Procheck-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v.8, p.477-486, 1996.
- LATGÉ J.P. Tasting the fungal cell wall. **Cellular Microbiology**, v.12, p.863- 872, 2010.
- LEE P. P.; YU-LUNG L. Cellular and molecular defects underlying invasive fungal infections - revelations from endemic mycoses. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 735, 2017.
- LEELANANDA S.P.; LINDERT S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein J Org Chem**, v.12, p.2694-2718, Dec 12, 2016.
- LEGARRAGA P. *Sporothrix schenckii*. **Revista Chilena de Infectología**, v.33, n.5, p.563-564, 2016.
- LEPESHEVA G.I.; WATERMAN M.R. Sterol 14-Demethylase Cytochrome P450 (Cyp51), A P450 In All Biological Kingdoms. **Biochim Biophys Acta**, v.3, p.467-477, 2007.
- LINGWOOD, D.; K. SIMONS. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, p.46-50, 2010.
- LIU T.; TANG G.W.; CAPRIOTTI E. Comparative modeling: the state of the art and protein drug target structure prediction. **Comb chem high throughput screen**, v.14, n.6, p.532-547, Jul , 2011.

- LLOYD K.O.; BITTON M.A. Isolation and purification of a peptide-rahmonomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **The journal of immunology**, v.107, p.663-671, 1971.
- LOPES-BEZERRA L.; SCHUBACH A.; COSTA R. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, p.293-308, 2006.
- LOPES-BEZERRA L.M. *et al.* Functional characterization of *Sporothrix schenckii* glycosidases involved in the N-linked glycosylation pathway. **Med Mycol**, v.53, n.1, p.60-68, Jan, 2015.
- LÓPEZ-ROMERO E. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, v.6, p.85-102, 2011.
- LÜTHY R.; BOWIE J.U.; EISENBERG D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 56, n.6364, p.83-85, 1992.
- LUTZ A.; SPLENDORE A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. **Revista Medicina**, v.21, p.433-450, 1907.
- MACÊDO-SALES P.A. *et al.* Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. **BMC Vet Res**, v.14, n.1, p. 19, Jan 18, 2018.
- MACKINNON J.E. **The effect of temperature on the deep mycoses**. In: Wolstenholme GEW, Porter R, editors. A Ciba Foundation Symposium - systemic mycoses. London: J & A Churchill, p.164-178, 1968.
- MADRID H. *et al.* *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.26, p.218-222, 2009.
- MADRID I.M. *et al.* Esporotricose canina: relato de três casos. **Acta Scientiae Veterinaria**, v.35, n.1, p.105-108, 2007.
- MADRID I.M. *et al.* Ultrastructural study of the mycelial phase of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from feline, canine and human cases of sporotrichosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.1147-1150, 2011.
- MAHAJAN V.K. *et al.* Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. **Mycoses**, v.48, n.1, p.25-31, 2005.
- MAHAJAN V.K. **Sporotrichosis**: An overview and therapeutic options. Department of Dermatology, Venereology & Leprosy, Dr. R. P. Govt. Medical College, 2014.
- MARIMON R. *et al.* *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v.46, p.621-625, 2008.

- MARQUES S. *et al.* Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission. **Rev Inst Med Trop**, v.35, p.327-330, São Paulo, 1993.
- MARTINS E.B. **Perfil epidemiológico, clínico e terapêutico da esporotricose no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz**, Rio de Janeiro, no período de 2002 a 2004 [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2006. Disponível em: www.bdttd.cict.fiocruz.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=40. Acessado em: 17 maio 2010.
- McCAMMON J.A.; GELIN B.R.; KARPLUS M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v.267, p. 585-590, 1977.
- MORRIS-JONES R. *et al.* Sporotrichosis. **Clinical and experimental dermatology**, v.27, n.6, p.427-431, 2002.
- MORRIS-JONES R. *et al.* Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and immunity**, v.71, p.4026-4033, 2003.
- NAS. **A new biology for the 21st century**: Ensuring the United States leads the coming biology revolution. <http://www.nap.edu/catalog/12764.html>. 2009.
- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v.45, n.1, p.12-17, 2017.
- NES W.D. Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. **Phytochemistry**, v.64, p.75-95, 2003.
- NES W.D. *et al.* Sterol methyltransferase: functional analysis of highly conserved residues by site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, v.43, p.569-576, 2004.
- NIMRICHTER L. *et al.* The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, v.7, p.789-798, 2005.
- NOBRE M.O. *et al.* Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista iberoamericana de micologia**, v.18, p. 137-140, 2001.
- NOBRE M.O. *et al.* Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, p. 36-41, 2002.
- NOBRE, M. O. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n.1, p. 175-184, Santa Maria, 2002.
- NORIEGA C.T. *et al.* *Sporothrix schenckii*: culturas en diferentes suelos. **Rev latinoam micol** , v.35, p.191-194, 1993.
- NOSANCHUK J.D.; CASADEVALL A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v.5, p.203-223, 2003.

- OLIVEIRA M.M.E. *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia**, v.169, p.359-363, 2010.
- OLIVEIRA M.M. *et al.* Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v.172, p.257-267, 2011.
- OLIVEIRA M.M. *et al.* Development and optimization of a new MALDI- TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Res Microbiol**, v.166, n. 2, p.102-110, Jan, 2015.
- ORTEGA I. *et al.* Peroxide sensing and signaling in the *Sporothrix schenckii* complex: an in silico analysis to uncover putative mechanisms regulating the Hog1 and AP-1 like signaling pathways. **Med Mycol**, v. 53, n.1, p.51-59, Dec 30, 2015.
- PARENTE-ROCHA J.A. *et al.* Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi Mediators Inflamm. **Epub**, Jun 13, 2017.
- PÉREZ-SÁNCHEZ L. *et al.* Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. **BMC Microbiol**, v.1, p.317, Dec 9, 2010.
- PETERSEN T.N. *et al.* Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, p. 785- 786, 2011.
- PETSKO G.A.; RINGE D. Protein structure and function. **New Science Press Ltd:** British library, 2004.
- POIROT O.; O'TOOLE E.; NOTREDAME C. Tcoffee@ igs: a web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. **Nucleic acids research**, v.31, n.13, p.3503-3506, Jul 1, 2003.
- PONTÓN J. *et al.* Immunoreactivity of the fungal cell wall. **Medical Mycology**, v.39, p.101-110, 2001.
- PREVIATO J.O. *et al.* Soluble and insoluble glucans from different cell types of the human pathogen *Sporothrix schenckii*. **Experimental Mycology**, v.3, p.92-105, 1979.
- QUEIROZ-TELLES F. *et al.* Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v.49, p.225-236, 2011.
- QUEIROZ-TELLES F. *et al.* Neglected endemic mycoses. **Lancet Infect Dis**, v.17, n.11, p:367- 377, Jul 31, 2017.

QUINN P.J. *et al.* Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. **Artmed**, ed. 1, p. 244. 2007.

RADHAKRISHNAN R.; SCHLICK T. Correct and incorrect nucleotide incorporation pathways in DNA polymerase β 's. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, v.350, p.521-529, 2006.

RAHMAN A.; STILLINGER F.H. Molecular dynamics study of liquid water. **Journal of chemical physics** , v.55, p.3336-3359, 1971.

RAHMAN A.; STILLINGER F.H. Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. **Journal of Chemical Physics** , v.60, p.1545-1557, 1974.

RAMOS-E-SILVA M. *et al.* Sporotrichosis. **Clin Dermatol** , v.25, n.2, p.181-187, 2007.

RANGEL-GAMBOA L. *et al.* Update of Phylogenetic and Genetic Diversity of *Sporothrix schenckii* sensu lato. **Med Mycol**, v. 54, n.3, p. 248-255, Nov 21, 2016.

READ S.I.; SPERLING L.C. Feline sporotrichosis. Transmission to man. **Arch Dermatol**, v. 118, p.429-431, 1982.

REIS R.S. *et al.* Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.769-774, 2009.

REIS E.G. *et al.* Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **J Feline Med Surg**, v.14, n.6, p. 399-404, 2012.

RIPPON J.W. **Sporotrichosis**. Rippon JW, editor. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, Filadélfia: WB Saunders, p. 325-52, 1998.

RODRIGUES A.M. Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii*. [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2010.

RODRIGUES A.M.; DE HOOG S.; CAMARGO Z.P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCRRFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.78, n.4, p.383-387, 2014.

RODRIGUES A.M. *et al.* Proteomics-Based Characterization of the Humoral Immune Response in Sporotrichosis: Toward Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine Antigens. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, n.8, Aug 25 2015.

RODRIGUES A.M. *et al.* Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **J Proteomics**, v.115, p. 8-22, Nov 27, 2015.

RODRIGUES M.T.; RESENDE M.A. Epidemiologic skin test survey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin among gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil. **Mycopathologia**, v.135, p. 89-98, 1996.

ROEMER T.; KRYSAN D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.4, n.5, 2014.

ROMERO-MARTINEZ R. *et al.* Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v.68, p.3696-3703, 2000.

ROSA A.C. *et al.* Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **J Am Acad Dermatol**, v. 52, n.3, p.451-459, 2005.

ROSSATO L. *et al.* Proteins potentially involved in immune evasion strategies in *Sporothrix brasiliensis* elucidated by ultra-high-resolution mass spectrometry. **MSphere**, v.3, n.3, Jun 27, 2018.

ROSSER E.J. ; DUNSTAN R.W. Sporotrichosis. **Infectious diseases of the dog and cat**. St Louis: Saunders Company, ed. 2, p.399-401, 1998.

ROY A.; KUCUKURAL A.; ZHANG Y. I-tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v.5, n.4, p.725, Apr, 2010.

RUIZ-BACA E. *et al.* Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Medical Mycology**, v.47, p.185-196, 2009.

RUIZ-BACA E. *et al.* 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p.248-50, 2011.

RUIZ-BACA E. *et al.* Fungal cell wall antigens for diagnosis of invasive fungal infections. **Fungal cell wall**. New York: Nova Science Publishers Inc., 2013.

SANCHONETE K.O. *et al.* *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v.58, n. 11, p. 652-658, Sep 25, 2015.

SCHLICK T. *et al.* Biomolecular modeling and simulation: a field coming of age. **Quarterly reviews of biophysics**, v.44, n.2, p.191-224, 2016.

SCHUBACH T.M. *et al.* *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v.153, p.83-86, 2001.

SCHUBACH T.M.P. *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Med Mycol** , v.39, p.147-149, 2001.

- SCHUBACH T.M.P. *et al.* Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. **Journal of Small Animal Practice** , v. 44, p. 395-398, 2003.
- SCHUBACH T.M.P. *et al.* Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **J Am Vet Med Assoc** , v.224, p.1623-1629, 2004.
- SCHUBACH A.; BARROS M.B.; WANKE B. Epidemic sporotrichosis. **Curr Opin Infect Dis** , v.21, n. 2, p.129-33, 2008.
- SCHWEDE T. *et al.* Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic acids research** ,v.31, n.13, p.3381-3385, Jul 1 2003.
- SCOTT E.N.; MUCHMORE H.G. Immunoblot analysis of antibody responses to *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p.300-304, 1989.
- SGARBI D.B. *et al.* Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia** , v.139, p. 9-14, 1997.
- SOUZA L. *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.372-374, 2006.
- STOPIGLIA C.D.O. *et al.* Antifungal M.L. Susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Med Mycol** , v.52, p. 56-64, 2014.
- TALHARI S. *et al.* Deep Mycoses in Amazon Region. **Int J Dermatol**, v. 27, n.7, p.481- 484, 1988.
- TEIXEIRA P.A. *et al.* Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology**, v.155, p.3730-3738, 2009.
- TEIXEIRA M.M. *et al.* Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC Genomics** , v.15, p.943, 2014.
- TÉLLEZ M.D. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex biology: Environment and fungal pathogenicity. **Microbiology** , v.160, p.2352–2365, 2014.
- THOMPSON D.W.; KAPLAN A.W. **Laboratory-acquired sporotrichosis.** *Sabouraudia*, v.15, p.167-70, 1977.
- TIRADO-SÁNCHEZ A.; BONIFAZ A. Nodular Lymphangitis (Sporotrichoid Lymphocutaneous Infections). Clues to Differential Diagnosis. **J Fungi (Basel)**, v. 4, n.2, p. 56, May 9, 2018.

- TORIELLO C. *et al.* Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses*, v.34, n.3-4, p.133-40, 1991.
- TRAVASSOS L.R.; GORIN P.A.; LLOYD K.O. Discrimination between *Sporothrix schenckii* and *Ceratocystis stenoceras* rhamnmannans by proton and carbón-13 magnetic resonance spectroscopy. **Infection and Immunity**, v.9, p.674- 680, 1974.
- TRONCHIN G. *et al.* Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v.46, p.749-772, 2008.
- USHA T. *et al.* Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. **Curr Top Med Chem** ,v.17, n.30, p. 3296-3307, 2017.
- VALLE-AVILES L. *et al.* Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. **BMC Microbiol** , v. 29, n.7, p.107, Nov, 2007.
- VEIGA F.F. *et al.* Propolis Extract for Onychomycosis Topical Treatment: From Bench to Clinic. **Front Microbiol** , v. 9, p. 779, 2018.
- VETTORATO R. *et al.* Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* senso stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed in vitro and in vivo: Case report. **Med Mycol Case Rep** , v. 19, p.18-20, 2018.
- WADA G.; VINCENT M. ; LEE M. Inner leaf gel of *Aloe striata* induces adhesion-reducing morphological hyphal aberrations. **J Fungi (Basel)** , v. 4, n.1, p. 23, Mar, 2018.
- WANG Z.; WANG X. ; WANG J. Recent advances in antibacterial and antiendotoxic peptides or proteins from marine resources. **Mar Drugs**, v.16, n.2, p. 57, Feb 2018.
- WARSHEL A.; LEVITT M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium ion in the reaction of lysozyme. **Journal of Molecular Biology**, v.103, p.227-249, 1976.
- WATERMAN M.R.; LEPESHEVA G.I. Sterol 14 α -demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, p.418-422, 2005.
- YASUDA, K ; *et al.* **Protein engineering of CYP105s for their industrial uses Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - Proteins and Proteomics. v .1866,p. 23-31, 2018.
- ZHANG Z.; HENZEL W.J. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. **Protein Sci** , v.13, n.10, p.2819-2824, Aug 31, 2004.

ZHANG Y. I-Tasser server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v.9, p.40, 2008.

ZHONGMING L.; NIELSEN K. Morphology changes in human fungal pathogens upon interaction with the host. **J Fungi (Basel)** , ed. 3, v.4, n. 66, p. 1-14, 2017.

APÉNDICE



Recebido em _____,

Aceito em _____,

24 Δ -Esterol Metiltransferase de *Sporothrix schenckii*: Caracterização *insilico* de um Alvo Biotecnológico para o Tratamento da Esporotricose

Eveliny Abreu de Andrade Vieira,^a Leonardo Alves Miceli,^b Helena Carla Castro^{c*}

O termo *Sporothrix* se refere a um complexo de fungos saprófitas, cosmopolitas, com preferência por países tropicais. Os componentes desse complexo fúngico são causadores da doença chamada esporotricose, que consiste em uma micose subcutânea, podendo envolver outros sítios como vasos linfáticos, músculos, fáscias, cartilagens e ossos. No Brasil, em especial no Rio de Janeiro, as espécies causadoras da esporotricose são *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis*. As formas de diagnóstico mais utilizadas, devido à sua confiabilidade, são ELISA e cultura de fungos. A forma de tratamento mais utilizada, se constitui na aplicação de uma solução saturada de potássio iodado, bastante comum em países de terceiro mundo, devido ao baixo custo, e o uso dos azoles: itraconazol, fluconazol e cetoconazol, sendo o primeiro o azole mais utilizado devido à sua alta taxa de sucesso no tratamento. Os principais fármacos para tratamento da esporotricose atuam inibindo enzimas produtoras de componentes da parede celular, como o fluconazol que inibe as enzimas da família do citocromo P450, além do 24-SMT inibidor 22-hidrazona-imidazolin-2-yl-cholesterol-5-ene-3 β -ol (H3), ainda em desenvolvimento, mas que tem demonstrado maior eficiência que o itraconazol. Visando o desenvolvimento de drogas mais eficazes para o tratamento da esporotricose, é necessário um melhor entendimento do funcionamento de suas enzimas, principalmente as que estão envolvidas com a produção de componentes da parede celular, sendo a sua forma espacial extremamente importante na formação dos sítios de ligação molécula-proteína e na fluidez da membrana celular fúngica. Portanto, o objetivo deste projeto foi construir o modelo estrutural da enzima 24 Δ -esterol metiltransferase do complexo *Sporothrix*, através da modelagem por homologia, além de outras enzimas importantes do metabolismo dos fungos deste complexo, utilizando as ferramentas de modelagem molecular.

1. Introdução

O complexo *Sporothrix* é o agente etiológico da esporotricose em humanos e vários animais domésticos, que consiste em uma micose subcutânea podendo envolver outros sítios como vasos linfáticos, músculos, fáscias, cartilagens e ossos (Schubach et al., 2001; Souza et al., 2006; Madrid et al. 2007; Queiroz-Telles et al., 2011). Esse complexo é composto pelas espécies *Sporothrix schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. albicans*, *S. mexicana* e *S. luriei*, (formalmente *S. schenckii* var. *luriei*) (Marimonetal., 2008; Madri et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Cruz et al., 2012). A distinção entre estas espécies foi baseada em aspectos de sequenciamento do gene da calmodulina, no perfil de assimilação de fontes de carbono (sacarose, rafinose e ribitol), e diâmetro médio das colônias e da morfologia dos conídios em cultivos após incubação (Cruz et al., 2013).

O complexo *Sporothrix* é constituído de fungos dimórficos, crescendo em forma de micélio a 25°C e progredindo para um estágio de levedura a 37°C, saprófitas, isto é, encontrados no solo,

plantas e vegetais em decomposição, e cosmopolitas com preferência por países tropicais, contudo tendo sido encontrado em países da Ásia, Europa e América do Norte (Diaz et al., 1989; Lopes-Bezerra et al., 2006; Barros et al., 2011; Queiroz-Telles et al., 2011). Apesar de saprófita, esse fungo já foi observado em superfícies de madeira tais como portões e armários, já que gatos tem como característica natural coçar as unhas em madeira, que é um ambiente favorável para o fungo. A contaminação de residências e hospitais veterinários pode ocorrer como consequência da presença de gatos afetados pela micose e com alta quantidade de células de levedura em suas lesões e unhas (Lopes-Bezerra et al., 2006).

A fase micelial do complexo *Sporothrix* é caracterizada por hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas contendo conidióforos finos apresentando pequenas vesículas no ápice com arranjos dispostos em grupos semelhantes a flores e a fase de levedura pleomórfica, com células em forma de fuso e/ou ovais que são semelhantes a um "charuto" (Lopes-Bezerra et al., 2006). Macroscopicamente, o complexo *Sporothrix* aparece como uma colônia branca cremosa que ao longo do tempo se torna mais escura. No Brasil, as primeiras informações sobre a esporotricose datam de 1907 quando Lutz e Splendore (Lutz et al., 1907) relataram as primeiras ocorrências do fungo em pacientes brasileiros.

As espécies causadoras da esporotricose no Brasil, em especial no Rio de Janeiro, são *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, sendo a última a espécie mais patogênica. A contaminação pelo fungo dá-se por inoculação, através de injúrias ao manipular terra e plantas

^a Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, Brazil.

^b Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, ModMolQSAR, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^c Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, LABIEMol, Outeiro de São João Batista, 24020-141, Niterói, RJ, Brazil. E-mail: hcastrorangel@yahoo.com.br; Tel: +55 21 26299954

(Schubach et al., 2001), e o grupo de risco se constitui de pessoas que tem bastante contato com gatos de vida errante, além de pessoas que lidam com agricultura, jardinagem e mineração (Almeida-Paes et al., 2014).

As formas de diagnóstico mais utilizadas são ELISA, devido à sua confiabilidade, e o cultivo do fungo para demonstração do dimorfismo (Toriello et al., 1992; Kauffman et al., 1999; Morris et al., 2002). Como forma de tratamento é muito utilizada a aplicação de uma solução saturada de potássio iodado, bastante comum em países de terceiro mundo devido ao baixo custo, e o uso dos azoles: itraconazol, fluconazol e cetoconazol, sendo o primeiro o mais utilizado devido à sua alta taxa de sucesso no tratamento. Outras alternativas, utilizadas quando o itraconazol é irresponsivo ou não tolerado, são a terbinafina, anfotericina-B, e a flucitosina (Borba-Santos et al., 2014; Mahajan et al., 2014). As principais drogas para tratamento da esporotricose atuam inibindo enzimas produtoras de componentes da parede celular (Mahajan et al., 2014).

A parede celular é a principal estrutura dos fungos envolvida na interação com o hospedeiro (Pontón et al., 2001), sendo o ergosterol um dos constituintes e de grande importância para arquitetura e fluidez da membrana fúngica (Borba-Santos et al., 2016). O ergosterol é o principal esterol em fungos, cuja biossíntese requer a metilação na posição 24 da cadeia lateral, utilizando o (S)-Adenosil-L-metionina (AdoMet) como doador de metila, e catalisado pela enzima 24 Δ -esterol metiltransferase (24-SMT, EC 2.1.1.41) (Renard et al., 2009).

O ergosterol é convertido a partir do lanosterol através de um processo de muitas etapas, cuja ordem sequencial varia de espécie para espécie, porém na maioria dos fungos em geral, o primeiro passo é a metilação do carbono 24 (C-24), seguido da demetilação dos carbonos 14 e 4, e em seguida de várias conversões de duplas ligações subsequentes, em ordens que também variam de acordo com a espécie (Chung et al., 2000).

Como esta etapa não é encontrada na biossíntese do colesterol no homem, a 24-SMT é um alvo ideal para o desenvolvimento racional de fármacos antifúngicos específicos (Borba-Santos et al., 2016).

O planejamento racional de fármacos, ou novos compostos ativos em geral, possui um sofisticado processo que inclui métodos baseados em computador, devido ao fato de serem mais rápidos, baratos e eficientes, dos quais se destacam duas abordagens: os métodos indiretos, ou independentes do alvo; e os métodos diretos, ou dependentes do alvo (Manju et al., 2017). No segundo caso em específico, as possíveis interações de moléculas bioativas com biomacromoléculas, geralmente sendo proteínas, são levadas em consideração e antecipadas como parte desse processo de planejamento. Neste caso, a estrutura do alvo precisa ser conhecida através de dados experimentais (geralmente por cristalografia de raios-X) ou indiretamente, através de um procedimento de construção adequado, geralmente a modelagem por homologia (Sant'Anna, 2009). Atualmente as estruturas 3D de proteínas determinadas experimentalmente disponíveis somam cerca de menos de uma em cada mil cuja sequência de aminoácidos é conhecida. Essa limitação enriquece ainda mais o papel das técnicas de modelagem por homologia, que determinam a estrutura 3D de uma proteína a partir de sua sequência primária de aminoácidos, e usando como um molde (ou template) estruturas conhecidas de uma proteína relacionada (Bohnuud et al., 2017).

Esta abordagem segue alguns padrões gerais no processo de evolução biológica observados: (a) a homologia entre as sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas, principalmente os elementos de estruturas secundárias, (as α -hélices e folhas- β); e (c) as principais diferenças estruturais ocorrem

nas regiões externas, constituídas por alças (loops), que ligam os elementos de estruturas secundárias (Figura 1) (Santos Filho & Alencastro, 2003).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é obter o modelo teórico da enzima 24-SMT utilizando técnicas de modelagem por homologia.

2. Experimental

2.1 Obtenção e alinhamento de sequência primária

A sequência primária de *S. schenckii* foi extraída do banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein), em formato FASTA e submetida aos programas I-TASSER (IT) (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015) e Swiss Model (SM) (Biasini et al., 2014) para obtenção dos moldes (templates) de proteínas homólogas. As sequências obtidas foram alinhadas com o programa T-Coffee, usando o método clustalw_msa (Abid et al., 2017).

2.2 Geração das estruturas 3D

Os templates foram escolhidos com base no valor de TM-score, além de porcentual de similaridade e identidade de sequência primária e estruturas secundárias previstas.

A modelagem da estrutura 3D da proteína do fungo foi realizada através do IT. Cinco modelos foram gerados para a sequência proteica, e classificados de acordo com os valores de C-score obtidos, como uma estimativa de sua qualidade. O modelo com o melhor (maior) C-score foi mantido.

Após a construção, o modelo foi submetido a otimização da geometria por minimização de energia no Swiss PDB Viewer (Spdbv).

O alinhamento estrutural entre a estrutura selecionada da proteína alvo e os moldes para avaliação do menor desvio médio quadrático (RMSD), cujo valor ideal é de no máximo 2.0 Å, e a observação das características estruturais foram realizadas no programa Swiss PDB Viewer (Spdbv) (Guex et al., 2009).

Validação das estruturas

A validação do modelo construído pelo IT foi realizada primeiramente através do valor do score de confiança (C-score) calculado para cada modelo, e em seguida avaliado pelo programa 3D Verify, onde é determinada a compatibilidade entre a estrutura primária e os modelos 3D submetidos, através da atribuição de uma classe estrutural, com base nas posições e suas características (α -hélices, folhas- β , loops, polares, não-polares, e outros) e comparando os resultados com estruturas quaternárias já conhecidas e de boa qualidade (Bowie et al., 1991) (Lüthy et al., 1992), e por fim no programa Procheck, através do servidor PDBSum, analisando-se os ângulos Phi e Psi através do mapa de Ramachandran (Laskowski et al., 1993) (Laskowski et al., 1996).

3. Resultados e Discussão

3.1 Obtenção de templates e alinhamento

A sequência primária da 24-SMT obtida no banco de dados NCBI Blast foi submetida aos programas SM e IT para identificação e obtenção de templates, que foram utilizados na construção do modelo. Os templates obtidos pelo SM, foram selecionados através dos scores de similaridade e de identidade com a sequência alvo (Tabela 1).

Os templates obtidos no programa IT foram classificados também pelo valor de similaridade estrutural da escala TM-score (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação do grau de identidade, similaridade e TM-score (quando possível) dos templates identificados para a 24-SMT.

| Código PDB | Estequiometria | Identidade (%) | Similaridade (%) | TM-Score |
|-------------------|----------------|----------------|------------------|----------|
| 1KPH ^a | Tetrâmero | 17,7 | 29 | 54,3 |
| 1KP ^a | Monômero | 14,3 | 28 | 53,8 |
| 1TPY ^a | Monômero | 16,8 | 28 | 54,2 |
| 2FK8 ^a | Monômero | 16,5 | 28 | 52,8 |
| 3UJ6 ^a | Monômero | 23,1 | 33 | 56,8 |
| 4INE ^a | Dímero | 23,1 | 33 | 71,9 |
| 4IV0 ^a | Dímero | 21,2 | 33 | 57,7 |
| 5WP4 ^a | Monômero | 28,4 | 34 | 83,8 |
| 3CCF ^b | Dímero | 21,8 | 29 | .* |
| 2FK7 ^b | Monômero | 21,6 | 31 | .* |
| 2VN8 ^b | Dímero | 23 | 30 | .* |

a templates sugeridos pelo I-TASSER

b templates sugeridos pelo Swiss Model

*templates sugeridos pelo Swiss Model, não possuem o cálculo de TM-score

O estudo comparativo da estrutura primária e das estruturas secundárias previstas por estes programas confirmou a existência de similaridade desta enzima com outras enzimas metil transferases, evidenciada pela conservação dos aminoácidos variando entre 28 e 34% de identidade, sendo os melhores valores obtidos, tanto de identidade, como de similaridade e de TM-score com a enzima Fosfoetanolamina N-Metiltransferase de Arabidopsis thaliana (Código PDB=5WP4), e portanto, sendo escolhida como molde para o modelo teórico da 24-SMT do S. schenki.

Os templates obtidos através dos bancos de dados de dois programas tiveram suas sequências obtidas no Protein Data Bank (PDB) e devidamente alinhadas com a proteína alvo através do servidor T-Coffe para identificação de regiões mais conservadas entre elas (Figura 2).

O alinhamento das sequências revelou áreas muito conservadas no centro das estruturas (em rosa na Figura 2), se comparadas com as regiões das extremidades (em verde e azul, na Figura 2) o que é observado como característico na família de metil transferases, na qual a região de interação com o doador do grupamento metila (como o AdoMet, por exemplo) é mais conservada, enquanto as regiões mais distantes da enzima são mais distintas, e sujeitas à mudanças, afim de interagir com os diferentes substratos a ser convertidos pelo processo de metilação dessa enzima (como por exemplo, um esteroide) (Nes, 2003; Nes et al., 2004).

Nessa formação é possível se observar um padrão semelhante em várias estruturas cristalinas de metiltransferases dependentes de AdoMet, com cerca de sete folhas-β paralelas no centro e rodeada por α-hélices. Este domínio é construído em torno de uma chamada dobra de Rossmann (uma cadeia formada por uma faixa de quatro ou cinco folhas-β paralelas e flanqueadas por duas ou três α-hélices em ambos os lados) e esse domínio aparece em alinhamentos de sequências com SMTs (Figura 3) (Nes et al., 2004).

3.2 Comparação dos modelos estruturais 3D

As estruturas dos cinco melhores modelos gerado pelo IT obtiveram um C-score variando de -1,49 até -3,75. O C-score é previsto pelo IT e pode ser usado para estimar a qualidade dos modelos, sendo calculado com base na significância dos alinhamentos de fragmentos e nos parâmetros de convergência das simulações de montagem de estrutura. O C-score ideal se encontra na faixa de -5,2, onde um valor maior significa um modelo com maior confiança e vice-versa (Yang et al., 2015). O modelo de maior valor de C-score (-1,49) foi selecionado para continuar os estudos.

As estruturas 3D do modelo construído pelo IT e dos templates identificados retirados do PDB foram alinhadas no programa Spdbv para mensurar o RMSD, calculando-se assim o desvio entre os modelos (Tabela 2).

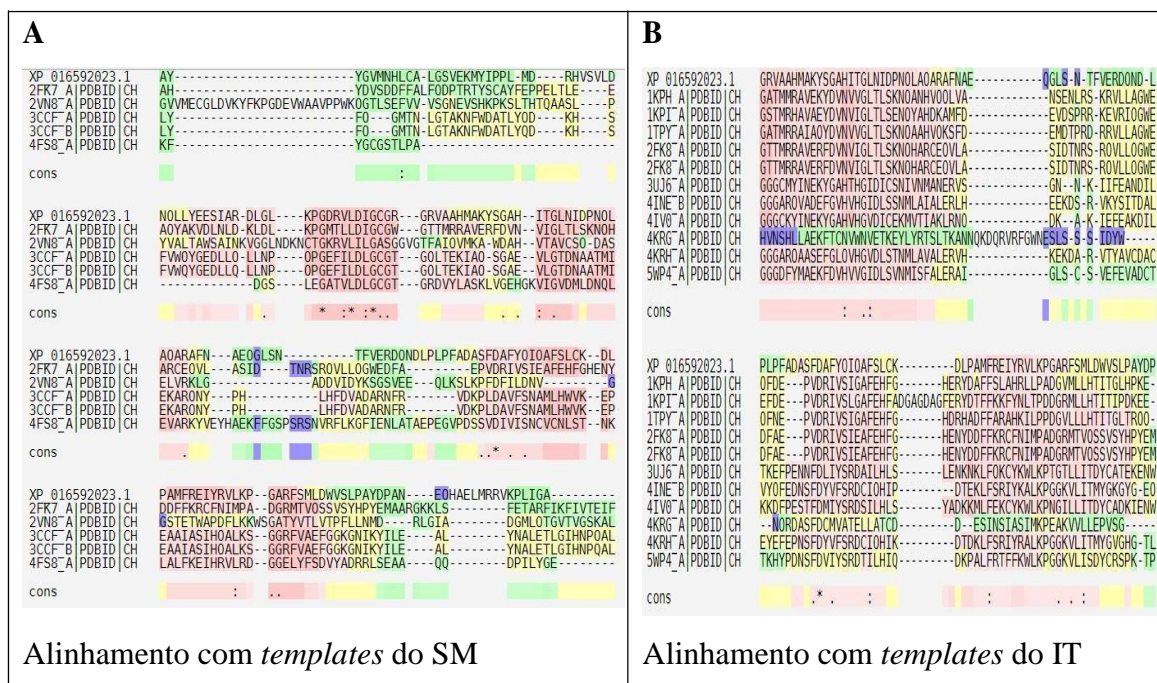


Figura 2. Alinhamento da sequência primária da 24-SMT realizado no T-Coffe com os templates obtidos nos programas SM (A) e IT (B). O score de similaridade e conservação estrutural aumenta em direção a cor vermelha, e diminui em direção a cor azul.

Tabela 2. RMSD calculado entre o modelo do IT e os templates identificados por similaridade, identidade e TM-score.

| Template | RMSD |
|----------|--------|
| 1KPI | 1,41 Å |
| 1TPY | 1,35 Å |
| 2FK8 | 1,40 Å |
| 3UJ6 | 1,00 Å |
| 4INE | 0,77 Å |
| 4IVO | 1,07 Å |
| 5WP4 | 0,75 Å |
| 3CCF | 0,89 Å |
| 2FK7 | 0,52 Å |
| 2VN8 | 1,59 Å |

Os alinhamentos revelaram valores de RMSD menores do que 2,0 Å entre a estrutura do modelo e de todos os templates encontrados, desse modo confirmando o grau de conservação estrutural do modelo em relação às proteínas similares, já que o alinhamento estrutural teve como resultado baixos valores de RMSD, confirmando a conservação do enovelamento dessas estruturas (Tabela 2).

3.3 Mapas de Potenciais

É importante ressaltar que foram calculados e avaliados os mapas de potencial eletrostático (MPE) para as estruturas 3D dos templates e do modelo gerado, uma vez que a distribuição de cargas parciais que determinam o perfil eletrônico das superfícies das proteínas é importante para sua atividade. No caso das enzimas metil transferases, a interação com um carbocátion intermediário é fundamental para sua atividade, portanto possuem uma vasta região eletronegativa (Gros et al., 2006), sendo corroborado pelo observado nas estruturas dos templates que são de metil transferases e presente no modelo construído (Figura 4).

3.4 Validação

A validação do modelo construído no IT e selecionado foi realizada utilizando o Procheck disponível no servidor PDBsum para calcular o gráfico de Ramachandran, cuja análise nos mostra que a

estrutura teórica construída possui 247 aminoácidos em regiões favoráveis (66%), 103 aminoácidos em áreas permitidas (27,5%) e 24 aminoácidos em áreas desfavoráveis (6,4%). Esses valores se encontram dentro da faixa aceita para a validação (entre 90 e 95%), assim como dentro do limite de resíduos que possam estar nas regiões desfavoráveis (Figura 5).

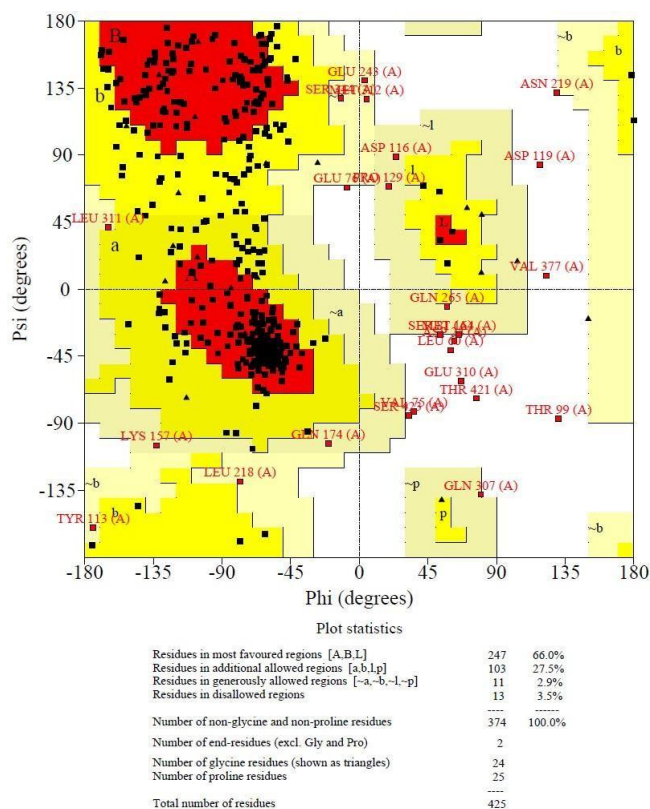


Figura 5. Validação através do gráfico de Ramachandran, mostrando a distribuição de aminoácidos nas áreas favorável (vermelho), permitida (amarelo) e desfavorável (branco) do modelo gerado pelo IT.

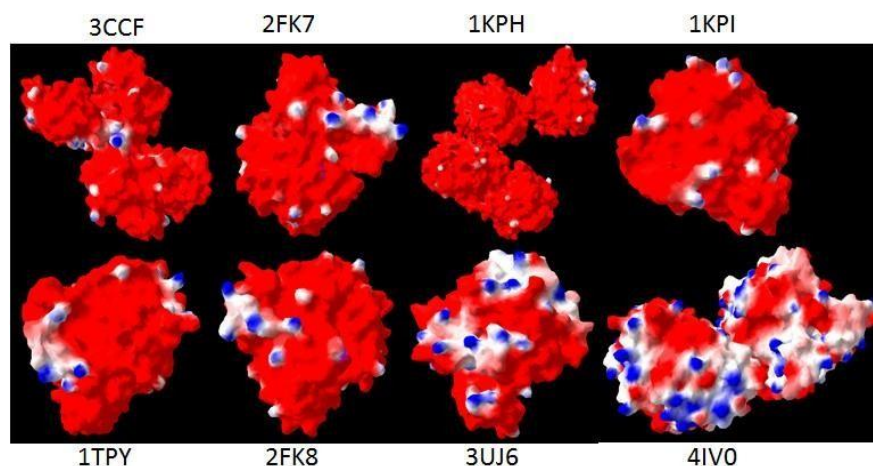


Figura 4. Mapa de potencial eletrostático dos templates obtidos para a sequência primária da 24-SMT. Cargas eletronegativa distribuídas em grande área da superfície das enzimas transferases.

4. Conclusões

A sequência primária da 24-SMT, um alvo promissor para um antifúngico, obtida no NCBI apresentou valores razoável de similaridade (14,3 a 28,4%) e elevado de identidade (29 a 34%) e de TM-score (52,8 a 83,8%) com proteínas da família das enzimas metil transferases.

O alinhamento da sequência primária e de estruturas secundárias previstas da 24-SMT e seus templates demonstrou uma região de conservação correspondente a região onde se localizam os domínios de interação com o doador de metil (AdoMet) e substrato.

Os cinco modelos construídos pelo programa IT apresentaram bons valores de C-score (-1,49 a -3,75), e o modelo com maior escore escolhido para os estudos estruturais.

Os alinhamentos estruturais realizados no Spdbv entre o modelo gerado pelo IT escolhido e os templates forneceram valores de RMSD todos menores do que o valor de referência de 2,0 Å, revelando a conservação dessas estruturas, inclusive a região de folhas B.

Os mapas de potenciais eletrostáticos dos templates corroboram com a literatura apresentando um perfil predominantemente eletronegativo para as enzimas metil transferases, e que foi observado no modelo gerado e selecionado.

O mapa de Ramachandran gerado para o modelo obtido, apresentou um percentual de resíduos de aminoácido dentro das regiões favoráveis, e dessa forma representando um modelo válido.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agency FAPERJ. Fellowships granted to UFF, by CAPES, CNPq, and FAPERJ are gratefully acknowledged.

References

1. World Health Organization: Resistance Global Report on Surveillance. Geneva. 2014. (<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>) Accessed on April 10, 2018.
2. Abid, H., Harigua-Souiai, E., Mejri, T., Barhoumi, M., & Guizani, I. (2017). Leishmania infantum 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase presents relevant structural divergence to constitute a potential drug target. BMC structural biology, 17(1), 9.
3. Almeida-Paes R., Manoel Marques Evangelista de Oliveira, Dayvison Francis Saraiva Freitas, Antônio Carlos Francesconi do Valle, Rosely Maria Zancope-Oliveira, Maria Clara Gutierrez-Galhardo. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Sporothrix brasiliensis Is Associated with Atypical Clinical Presentations Neglected tropical diseases, pag PLOS Neglected Tropical Diseases [www.plosntds.org 1 September 2014] Volume 8|Issue 9|e3094.
4. Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocols, 5: 725-738 (2010).
5. Barros MBL, Almeida-Paes R, Schubach AO (2011) Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. Clin Microbiol Rev 24: 633–654. Conti Diaz IA (1989) Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia 108 : 113–116.
6. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information Nucleic Acids Research 2014 (1 July 2014) 42 (W1): W252-W258
7. Bohnuud, T., Luo, L., Wodak, S. J., Bonvin, A. M., Weng, Z., Vajda, S., ... & Kozakov, D. (2017). A benchmark testing ground for integrating homology modeling and protein docking. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 85(1), 10-16.
8. Borba-Santos, Gonzalo Visbal, Thalita Gagini, Anderson M. Rodrigues, Zoilo P. de Camargo, Leila M. Lopes-Bezerra, Kelly Ishida, Wanderley de Souza and Sonia Rozental. 241- Sterol Methyltransferase Plays an Important Role in the Growth and Development of Sporothrix schenckii and Sporothrix brasiliensis: 11 March 2016. Oswaldo Cruz Foundation, Brazil.
9. Borba-Santos, L. P., Rodrigues, A. M., Gagini, T. B., Fernandes, G. F., Castro, R., de Camargo, Z. P., ... & Rozental, S. (2014). Susceptibility of Sporothrix brasiliensis isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. Sabouraudia, 53(2), 178-188.
10. Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. Science. 1991 Jul 12;253(5016):164-70.
11. Chung, S. K., Lee, K. W., Kang, H. I., Yamashita, C., Kudo, M., & Yoshida, Y. (2000). Design and synthesis of potential inhibitors of the ergosterol biosynthesis as antifungal agents. Bioorganic & medicinal chemistry, 8(10), 2475-2486.
12. Cruz R, Vieille P, Oschilewski D (2012) Aislamiento ambiental de Sporothrix globosa en relación a un caso de esporotricosis linfocutánea. Rev Chilena Infectol 29: 401–405.
13. Cruz LCH, Complexo Sporothrix schenckii. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. Vet. e Zootec. 2013; 20 (Edição Comemorativa): 08-28.
14. Díaz, I. A. C. (1989). Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. Mycopathologia, 108(2), 113-116.
15. Gros, L., Castillo-Acosta, V. M., Jiménez, C. J., Sealey-Cardona, M., Vargas, S., Estévez, A. M., ... & Urbina, J. A. (2006). New azasterols against Trypanosoma brucei: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(8), 2595-2601.
16. Guex, N., Peitsch, M. C., Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. Electrophoresis, 30(S1), S162-S173.
17. Kauffman C. A., "Sporotrichosis," Clinical Infectious Diseases, vol. 29, no. 2, pp. 231–237, 1999.
18. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993). PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. App. Cryst., 26, 283-291.
19. Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM (1996). AQUA and PROCHECK-NMR:

- programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, 8, 477-486.
20. Lopes-Bezerra L., Schubach A. and Costa R. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc* 78 : 293–308 .
 21. Lutz A, Splendore A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. *Rev Med.* 1907;21:433-50.
 22. Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* 1992 Mar 5;356(6364):83-5.
 23. Madrid Im, Júnior Rs, Sampaio Jr Dp, Mueller Em, Dutra D, Nobre Mo And Meireles Mca. 2007. Esporotricose canina: relato de três casos. *Acta Scientiae Veterinária* 35(1): 105–108 .
 24. Madrid H, Cano J, Gene J, Bonifaz A, Toriello C, et al. (2009) *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev Iberoam Micol* 26: 218–222.
 25. Mahajan V. K., Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. Department of Dermatology, Venereology & Leprosy, Dr. R. P. Govt. Medical College, 2014.
 26. Manju, K., Gunjan, P., & Anju, G. (2017). Review on Introduction to Molecular Docking Software technique in medicinal chemistry. *International Journal of Drug Research and Technology*, 2(2), 8.
 27. Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J (2008) *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* 46: 621–625.
 28. Morris-Jones R., “Sporotrichosis,” *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 27, no. 6, pp. 427–431, 2002.
 29. NCBI Resource Coordinators. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D12-D17. Epub 2016 Nov 28.
 30. Nes, W. D. (2003). Enzyme mechanisms for sterol C-methylations. *Phytochemistry*, 64(1), 75-95.
 31. Nes, W. D., Jayasimha, P., Zhou, W., Kanagasabai, R., Jin, C., Jaradat, T. T., ... & Bujnicki, J. M. (2004). Sterol methyltransferase: functional analysis of highly conserved residues by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 43(2), 569-576. Oliveira MME, Almeida-Paes R, Muniz MM, Barros MBL, Gutierrez-Galhardo MC, et al. (2010) Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia* 169: 359–363.
 32. Pontón J, Omaetxebarria MJ, Elguezabal N, Alvarez M, Moragues MD. Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Med Mycol.* 2001;39:101–10.
 33. Queiroz-Telles F, Nucci M, Colombo AL, Tobon A, Restrepo A (2011) Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Med Mycol* 49: 225–236.
 34. Renard, D., Perruchon, J., Giera, M., Müller, J., & Bracher, F. (2009). Side chain azasteroids and thiasteroids as sterol methyltransferase inhibitors in ergosterol biosynthesis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(23), 8123-8137.
 35. Sant’Anna, C. M. R. (2009). Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Revista Virtual de Química*, 1(1), 49-57.
 36. Santos Filho, O. A., & Alencastro, R. D. (2003). Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, 26(2), 253-259.
 37. Schubach, T.M.; Schubach, A.; Reis, R.S.; Cuzzi-Maya, T.; Blanco, T.C.M.; Monteiro, D.F.; Barros, B.M.; Brustein, R.; Zancoppe-Oliveira, R.M.; Fialho-Monteiro, P.C.F.; Wanke, B. (2001). *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 153, 83–86.
 38. Souza L, Nascente P, Nobre M, Meinerz A And Meireles M. 2006. Isolation Of *Sporothrix Schenckii* From The Nails Of Healthy Cats. *Braz J Microbiol* 37: 372–374.
 39. Toriello C., L. C. Arjona-Rosado, M. L. Diaz-Gomez, and M. L. Taylor, “Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases,” *Mycoses*, vol. 34, no. 3-4, pp. 133–140, 1991.
 40. Jianyi Yang, Renxiang Yan, Ambrish Roy, Dong Xu, Jonathan Poisson, Yang Zhang. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-8 (2015).
 41. Y Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40 (2008).
 42. Palopoli, L., Rombo, S., Terracina, G., Tradigo, G., & Veltri, P. (2009). Improving protein secondary structure predictions by prediction fusion. *Information Fusion*, 10 (3), 217-232 DOI: 10.1016/j.inffus.2008.11.004
 43. Zhongming Li and Kirsten Nielsen. Morphology Changes in Human Fungal Pathogens upon Interaction with the Host. *J Fungi (Basel)*. 2017 Dec; 3(4): 66. 1-14 doi:10.3390/jof3040066
 44. Téllez M.D., Batista-Duharte A., Portuondo D., Quinello C., Bonne-Hernández R., Carlos I.Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: Environment and fungal pathogenicity. *Microbiology*. 2014;160:2352–2365. doi: 10.1099/mic.0.081794-0.