

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CICLOFILINA DO
***MONILIOPHTHORA RORERI* E O ESTUDO DE POSSÍVEIS INIBIDORES**

FERNANDA DE SOUZA RANGEL

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

FERNANDA DE SOUZA RANGEL

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CICLOFILINA DO
MONILIOPHTHORA RORERI E O ESTUDO DE POSSÍVEIS INIBIDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

FERNANDA DE SOUZA RANGEL

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA CICLOFILINA DO *MONILIOPHTHORA*
RORERI E O ESTUDO DE POSSÍVEIS INIBIDORES

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2019

Dra Fabienne Micheli

(UESC/CIRAD)

Dra Milena do Amaral Santos

(UESC)

Dr Aristóteles Góes Neto

(UFMG)

Dr Bruno Silva Andrade

(UESC/UESC – Orientador)

“Não foi eu que ordenei a você?”

Seja forte e corajoso. Não te apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você.”
Josué 1:9

“Olho nenhum viu, ouvido nenhum ouviu, mente alguma imaginou o Deus preparou para aqueles que os amam”.

I Coríntios 2:9

“Ele não sabia o que era impossível. Foi lá e fez!”

Jean Cocteau

Dedico:

*A minha mãe, Enie de Souza Rangel, meu esposo Nilo César Sobrinho e aos meus
filhos Samuel e Sarah Seibert Rangel.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida que me foi concedido, por me mostrar todos os dias o seu amor incondicional e me proporcionar realizar esse sonho na área profissional.

A minha mãe, Enie de Souza Rangel, uma pessoa que sempre me ensinou que a conquista é precedida que luta, garra e perseverança. Agradeço a sua total dedicação dada a minha família durante os longos períodos de ausência nesse dois anos de mestrado. Você é a melhor mãe e avó do mundo!

Ao meu esposo, Nilo César Sobrinho, pela compreensão, amor, incentivo e principalmente por me mostrar que tenho uma pessoa na qual posso compartilhar os meus sonhos. Te amo muito mais hoje, do que a 19 anos atrás!

Aos meus filhos maravilhosos, Samuel e Sarah, que mesmo tão pequenos me enchem de amor e força. Vocês são a razão do meu existir.

Aos meus irmãos Renata, Dayse e Davis, a quem tenho um amor enorme. Em especial as ONÇAS DA MINHA VIDA! AMO TODOS!

A todos os membros da “Grande família”, agradeço pelos maravilhosos momentos de alegria, descontração e conselhos.

Aos meus amigos, em especial Tatianne Sales e Liliane Lopes, tesouros em minha vida.

Aos amigos da turma de mestrado – doutorado /2017, agradeço por tantos momentos de conhecimento compartilhados.

Em especial agradeço a Malu, Nayara, Natasha, Carine, Thaynara, Bruna pelas conversas, risadas, companheirismo e colo nos momentos difíceis de saudades. Vocês são ótimas!

Ao grupo Proteômicos por contribuir de forma imensurável para o meu crescimento na área da pesquisa.

À UESC, CBG, NBCGib por dispor toda a estrutura necessária para realizar os experimentos deste trabalho.

Ao PPGGBM Ao PPGGBM e todos os professores, tenho muito orgulho em pertencer a este grupo.

À FAPESB, pela concessão da bolsa,

Aos meus amigos do LBQC-Jequié, pelas hospedagens em Jequié, parceria e discussões maravilhosas sobre interações moleculares, docking, entre outros. Com uma garrafa de café, vamos longe!!rsrs

À Isis /UEFS pelo auxílio da Dinâmica molecular de estabilidade,

Ao professor Dr. Aristóteles Góes Neto, por fornecer a Ciclosporina A. Ainda iremos utilizá-la. Com fé em Deus!.rsr

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Dr. Bruno Silva Andrade, por toda orientação dada durante esses dois anos de mestrado, dedicação, ensinamentos e por acreditar no potencial do nosso trabalho. De uma forma especial, gostaria de agradecer por me convidar a participar do ISMB em Chicago, uma vez que “uma mente que se abre a uma nova janela, jamais volta ao seu tamanho original. - A. Einsten”. Obrigada por me ajudar a abrir essa janela.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Priminho Pirovani, por toda orientação e dedicação. Agradeço por me acolher em seu grupo de pesquisa e acreditar em meu potencial, se fazendo presente e contribuindo de maneira ímpar para a concretização deste trabalho. É notório e estimulante o seu amor e seriedade pela ciência.

Tenho muita admiração por vocês.

ÍNDICE

EXTRATO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO	4
3.1 <i>Moniliophthora roreri</i>	4
3.2 ASPECTOS GERAIS DAS CICLOFILINAS.....	7
3.3 CICLOFILINAS EM FUNGOS E PLANTAS.....	10
3.4 BIOINFORMÁTICA: UMA FERRAMENTA NA PREDIÇÃO DE ESTRUTURAS PROTEICAS	13
3.5 MODELAGEM POR HOMOLOGIA.....	15
3.6 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NO LIGANTE	18
3.7 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NO RECEPTOR: ACOPLAMENTO MOLECULAR (<i>DOCKING</i>).....	19
3.8 DINÂMICA MOLECULAR.....	21

3.9 INIBIDORES DERIVADOS DA QUINOXALINA	23
CAPÍTULO 1	28
EXTRATO.....	29
ABSTRACT.....	30
1.INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 Análises <i>in silico</i> da MrCYPA	33
2.2 Modelagem por homologia da MrCYPA.....	33
2.3 <i>Screening</i> virtual.....	34
2.4 <i>Docking</i> Molecular	35
2.5 Modelagem por homologia da Ciclofilina A do <i>Theobroma cacao</i> -TcCYPA	36
2.6 Dinâmica Molecular	36
2.8 Predição <i>in silico</i> dos parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade	Erro! Indicador não definido.
2.7 Expressão da MrCYPA em sistema Heterólogo	37
2.9 Análise da MrCYPA por Espectrometria de Massa.....	37
3. RESULTADOS	38
3.1 Análise da sequência de MrCYPA	38
3.2 Modelagem da MrCYP	39
3.3 Modelagem da estrutura 3D da Ciclofilina A do <i>Theobroma cacao</i>	43
3.4 Identificação da alça divergente na TcCYPA	45
3.5 Estudo de <i>Docking</i> entre MrCYPA e ligantes ZXJ3, ZINC83, ZINC93 e Ciclosporina A	46
3.6 Estudo de Dinâmica de estabilidade entre MrCYPA e ligante ZINC 83	50

3.7 Estudo da afinidade entre TcCYPA e ligantes ZXJ3, ZINC83, ZINC93 e Ciclosporina A	53
3.8 Análise toxicológica <i>in silico</i> dos ligantes ZXJ 3, ZINC 83, ZINC 93 e Ciclosporina – Relação atividade vs estrutura.....	Erro! Indicador não definido.
3.9 Expressão de ciclofilina A recombinante do <i>Moniliophthora roreri</i> em sistema heterólogo	56
4 DISCUSSÃO	58
4.1 Caracterização da ciclofilina A do fungo <i>Moniliophthora roreri</i> (MrCYPA) e predição de sua estrutura tridimensional	58
4.2 Estudo de novos possíveis inibidores de MrCYPA encontrada a partir de triagem virtual baseada em ligantes	58
4.3 MrCYPA é expressa em sistema heterólogo	59
4.4 Estudo de Acoplamento (<i>Docking</i>) mostrou interação entre MrCYPA e os novos possíveis inibidores ZXJ3, ZINC83, ZINC93.....	60
4.5 Predição estrutural 3D da Ciclofilina A do <i>Theobroma cacao</i> TcCYPA e identificação da alça divergent.....	61
4.6 Estudo da afinidade entre TcCYPA e novos possíveis inibidores ZXJ3, ZINC83, ZINC93	63
5- CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	64

EXTRATO

RANGEL, Fernanda de Souza. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro 2019. **Caracterização estrutural da ciclofilina do *Moniliophthora roreri* e o estudo de seus possíveis inibidores.** Orientador: Bruno da Silva Andrade Co-orientador: Carlos Priminho Pirovani

Palavras-chave: *Moniliophthora roreri*, ciclofilina A, ciclosporina A e inibidores.

O *Moniliophthora roreri* é um fungo basidiomiceto, hemibiotrófico, agente causador da monília no cacau. Vários países da América do sul, América central e América do norte foram acometidos pela doença, causando drásticas perdas econômicas. Atualmente o *Moniliophthora roreri* está em fase invasiva podendo chegar aos grandes países produtores de cacau do mundo, como a África e o Brasil. Em fungos fitopagênicos de plantas como *Magnaporthe grisea* e *Botrytis cinerea* foi identificado o aumento da expressão do gene *cyp* (codificador de ciclofilina) no momento da infecção, assim como trabalhos silenciando esse mesmo gene reduziu drasticamente a manifestação da doença, interferindo na formação de estruturas como apressórios e conídios. Trabalho com o conhecido inibidor de ciclofilina, a droga imunossupressora, a ciclosporina A, influenciou negativamente o crescimento do tubo germinativo do fungo em *Moniliophthora perniciosa*. Assim, estudos moleculares têm sido empregados no intuito para alcançar novas estratégias para conter a Monília. Desse modo, nosso trabalho teve como objetivo: i) caracterizar a ciclofilina A do *Moniliophthora roreri* (MrCYPA); ii) encontrar novas moléculas sintéticas e ou naturais com potencial inibitório de ciclofilinas; iii) realizar predição toxicológica dos novos inibidores com base estrutura- atividade biológica; iv) analisar as interações receptor (MrCYPA)-ligantes. Logo, uma série de metodologias *in silico* e *in vitro* foram utilizadas, onde se destaca, o Swiss-Model Workspace para a modelagem 3D da MrCYPA, o PharmaGist para triagem virtual baseada em ligantes, assim como o AutoDock para triagem de ligantes baseados no receptor. O Oziris DataWarrior foi utilizado para analisar a toxicidade das novas 33s moléculas com base em sua estrutura química. Análises *in vitro*, como expressão da MrCYPA em sistema heterólogo, teste de expressão/solubilidade em SDS-PAGE 1D e espectrometria de massas foram utilizadas para compreender melhor a proteína em estudo. Em geral, os resultados obtidos nesse estudo permitiu inferir que a MrCYPA possui em sua estrutura tridimensional um beta barril monomérico formado por 8 folhas beta antiparelas, 2 folhas alfa, onde as folhas alfa 1 e 2 estão situadas em extremidades opostas do barril. A MrCYPA interage com o inibidor controle Ciclosporina A, com energia de afinidade -5.8 Kcal/mol. Melhores interações ocorreram com novos ligantes encontrados Zinc 83, ZINC 93 e ZXJ 3 com melhor energia de afinidade de -8,2 Kcal/mol, ZINC 93 -8,6 Kcal/mol e ZXJ 3 -8,5 Kcal/mol. Na predição de toxicidade apenas o ZINC 83 apresentou um potencial mutagênico. Nas análises *in vitro*, foi evidenciado que a MrCYPA é expressa em sistema heterólogo, e a sua melhor expressão ocorre na fração solúvel e é obtida quando induzida a frio com temperatura entre 18 a 24° C. Sendo assim, nós acreditamos que os novos ligantes encontrados são moléculas em potencial como inibidores de ciclofilina A em *Moniliophthora roreri* e testes realizar testes *in silico*, *in vitro* e *in vivo* são necessários para melhor compreender essas estruturas.

ABSTRACT

RANGEL, Fernanda de Souza. State University of Santa Cruz, Ilhéus, February 2019.
Structural characterization of the cyclophilin of *Moniliophthora roreri* and the study of its possible inhibitors. Advisor: Bruno da Silva Andrade Co-advisor: Carlos Priminho Pirovani

Key words: *Moniliophthora roreri*, cyclophilin A, cyclosporin A and inhibitor

Moniliophthora roreri is a basidiomycete, hemibiotrophic fungus, the causative agent of moniliasis, also known as brown rot of cacao. Several countries of South America, Central America and North America were afflicted by the disease, causing drastic economic losses. Currently *Moniliophthora roreri* is in an invasive phase and can reach the major cocoa producing countries of the world, such as Africa and Brazil. In phytopathogenic fungi of plants such as *Magnaporthe oryzae* and *Botrytis cinerea*, the expression of the cyp gene (cyclophilin encoder) at the moment of infection was identified, as well as the silencing of the same gene reduced drastically the manifestation of the disease, interfering in the formation of structures as appressories and conidia. Studies with the known cyclophilin inhibitor, the immunosuppressive drug, cyclosporin A, negatively influenced the growth of the fungus germ tube in *Moniliophthora perniciosa*. Thus, molecular studies have been used in order to achieve new strategies to contain Moniliasis. In this way, our work had as objective: i) to characterize the cyclophilin A of *Moniliophthora roreri* (MrCYPA, ii-) to find new synthetic and / or natural molecules with inhibitory potential of cyclophilins ii) to perform toxicological prediction of new inhibitors based on structure-biological activity, iv) to analyze the interaction between receptor-ligands. A series of in silico and in vitro methodologies were used, including the Swiss-Model Workspace for the 3D construction of MrCYPA, the PharmaGist for ligand-based virtual screening, as well as the AutoDock for receptor-based ligand sorting. Oziris DataWarrior was used to analyze the toxicity of new molecules based on their chemical structure. In vitro analyzes, such as expression of MrCYPA in heterologous system, expression / solubility test on DAS-PAGE 1D and mass spectrometry were used to better understand the protein under study. In general, the results obtained in this study allowed us to infer that MrCYPA has in its three-dimensional structure a monomeric beta barrel composed of 8 antiparallel beta sheets, 3 alpha sheets, where the alpha 1 and 2 sheets are located at opposite ends of the barrel, and the alpha 3 in a rich loop region. MrCYPA interacts with the inhibitor control Cyclosporin A, with affinity energy -5.8 Kcal / mol. Better interactions occurred with new binders found Zinc 83, ZINC 93 and ZXJ 3 with better affinity energy of -8.2 Kcal / mol, ZINC 93-8.6 Kcal / mol and ZXJ 3 -8.5 Kcal / mol. In prediction of toxicity only ZINC 83 presented a mutagenic potential. In the in vitro analyzes, it was evidenced that the MrCYPA is expressed in a heterologous system, and its best expression in the soluble fraction is obtained when cold induced with temperature between 18 to 24 ° C.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1. <i>Moniliophthora roreri</i> - micrografias de várias estruturas conidiais mostrando cadeias basipetais de conídios. (Evans <i>et al.</i> 1978)	5
Figura 2. Ciclo de vida no <i>Moniliophthora roreri</i> . Adaptada de Vicente, 2018	6
Figura 3. Distribuição mundial da monilíase (Pérez- Vicente, 2018).	5
Figura 4. As Imunofilinas com seus respectivos inibidores. Adaptada de Singh, 2017	8
Figura 5. Atividade PPIase das Ciclofilinas. Adaptada de Kumari <i>et al.</i> 2013	8
Figura 6. Domínios das ciclofilinas.(Singh <i>et al.</i> 2017	11
Figura 7. Planta inoculada com solução de <i>Magnaporthe grisea</i> mutada no gene cyp.	11
Figura 8 Ensaios patogenicida em planta de de <i>Botris cinérea</i>	12
Figura 9 Alinhamento estrutural de ciclofilinas de vários organismos. Identificada alça divergente <i>Triticum aestivum</i> (Sekhonet. 2013)	12
Figura 10 Comparação de similaridade molecular entre molécula alvo e outras estruturas através do índice de Tanimoto (Rodrigues <i>et al.</i> 2012	19
Figura 11 Figura 11. Representação entre átomos diretamente ligados e não ligados: (A) Ligação covalente entre pares de átomos; (B) Ângulo entre os átomos e suas respectivas ligações (C) Ângulo de torção entre os átomos (D) Ângulo de torção impróprio entre os átomos e suas ligações covalentes. (E) Representação de interação dos Átomos não ligados. (Katto, R. 2014) Adaptada	22
Figura 12 Estrutura química da Quinoxalina (Franco, 2017)	23

CAPÍTULO 1: Caracterização estrutural da ciclofilina A do *Moniliophthora roreri* e o estudo de seus possíveis inibidores

Figura 1 Inibidores de Ciclofilina J sintetizados por Zhao e colaboradores (2018). ZJX 16, ZXJ 17 e ZXJ 18 foram utilizadas nesse estudo como moléculas de entrada para gerar o farmacóforo, e as demais foram utilizadas no estudo de *docking* molecular.

Figura 2 Sequência de aminoácidos da MrCYPA. Em cinza os resíduos correspondentes ao sítio ativo, em sublinhado os resíduos correspondentes ao domínio PPIase. (Predição InterPro)

Figura 3 Predição de regiões intrinsecamente desordenadas

Figura 4 Estrutura tridimensional da MrCYPA apresentando alfa-hélices (rosa), beta-barril de folhas beta (laranja) e os loopings (azul)

Figura 5 Alinhamento estrutural entre MrCYPA- modelo (rosa) e MpCYPA- molde (verde)

Figura 6 Representação em superfície do sítio ativo da MrCYPA, detalhando sua cavidade hidrofóbica

Figura 7 Validação do modelo MrCYPA. I-) QMEAN II-) ANOLEA

Figura 8 Estrutura tridimensional da TcCYPA.

Figura 9 Alinhamento estrutural entre TcCYPA (cinza) e CsCYPA

Figura 10 Validação do modelo TcCYPA

Figura 11 Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos MpCYPA, MrCYPA e TcCYPA

Figura 12 Alinhamento estrutural entre MpCYPA, MrCYPA e TcCYPA

Figura 13 Inibidores selecionados com maior energia de afinidade, ZINC 93, ZINC 83 e ZXJ 3

Figura 14 Mapa 2D entre resíduos de aminoácidos MrCYPA e Ciclosporina A

Figura 15 Mapa 2D entre resíduos de aminoácidos MrCYPA e ZINC 83

Figura 16 Mapa 2D entre resíduos de aminoácidos MrCYPA e ZINC 93

Figura 17 Mapa 2D entre resíduos de aminoácidos MrCYPA e ZXJ3

Figura 18 Dinâmica de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83: Desvio da raiz quadrática média (RMSD)	52
Figura 19 Dinâmica de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83: Desvio da raiz quadrática média de flutuação (RMSF)	53
Figura 20 Dinâmica de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83: Ligação de hidrogênio	53
Figura 21 Dinâmica de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83: Desvio da raiz quadrática média de flutuação (RMSF)	54
Figura 22 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e Cicloporina	55
Figura 23 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e ZINC 83	56
Figura 24 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e ZINC 93	57
Figura 25 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e ZXJ 3	58
Figura 26 Análise de expressão e solubilidade da ciclofilina A recombinante do <i>Moniliophthora roreri</i> induzida a frio. A) Extrato Total, B) Fração Insolúvel e C) Fração Solúvel 1) pET 28a sem inserto, 2) pET 28a com inserto, sem IPTG, 3) Indução com IPTG com 2h, 4) Indução com IPTG com 4h, 5) Indução com IPTG com 6h, 6) Indução com IPTG com 8h, 7) Indução com IPTG com 10h.	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Lista das proteínas alinhadas com as sequências de Ciclofilinas A de *Moniliophthora roreri* e *Moniliophthora perniciosa* 40

Tabela 2- Características físico químicas dos inibidores de entrada que possibilitam a interação molecular com receptor 48

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Moniliophthora roreri* é um fungo basidiomiceto, causador da Monília, uma das doenças mais devastadoras do cacau, árvore que fornece matéria prima para o chocolate. Esse fungo apresenta infecção seletiva aos frutos dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*. A doença é endêmica da Colômbia, mas encontra-se em fase invasiva, onde vários países da América do Sul, América Central e América do Norte foram acometidos e sofreram severos danos, com perdas de até 100% nas plantações (Barbosa *et al.* 2018). No Brasil, o fungo é classificado como praga quarentenária ausente e várias medidas fitossanitárias de prevenção vêm sendo tomadas para impedir a instalação da monília (MAPA-Plano de contingência da Monília do cacauero, 2014)

O sequenciamento do genoma do *Moniliophthora roreri* (Meinhardt *et al.* 2014) e trabalhos subsequentes com seu efetoroma (Barbosa *et al.* 2018) identificaram genes e proteínas importantes para melhor compreensão sobre mecanismos moleculares, biologia do fungo e o sistema de interação entre parasito-hospedeiro, assim como proporcionou a realização de estudos sobre proteínas relacionadas a patogenicidade e virulência (Meinhardt *et al.* 2014; Barbosa *et al.* 2018).

As ciclofilinas pertencem à superfamília das Imunofilinas e são amplamente conhecidas por possuírem atividade PPIase. Elas auxiliam no dobramento de proteínas, realizando a isomerização cis-trans em alguns aminoácidos de prolina que compõem a cadeia polipeptídica (Wang e Heitman 2005; Kaur *et al.* 2015). Além do domínio que confere a atividade catalítica PPIase (CLD), as ciclofilinas podem conter domínios diferentes como tetracopeptídio TPR, WD40, RNP ou (RRM; a U-box e um domínio glutaredoxina). Esses múltiplos domínios indicam o potente papel das ciclofilinas em processos como enovelamento de proteínas, que acionam várias funções como ligação com RNA, interação com histonas, sugerindo que também atuam como fatores de transcrição (Wang e Heitman 2005; Kaur *et al.* 2015, Single *et al.* 2017).

A ciclofilina A é uma isomerase citosólica, portadora do domínio CLD de PI 9.5, peso molecular 19.300 kDa, constituída de aproximadamente 179 resíduos de aminoácidos. Essas proteínas são conservadas e são alvo molecular da droga imunossupressora que revolucionou a área médica de transplantes de órgãos, a Ciclosporina A. Por esse motivo a ciclofilina passou a ser muito estudada principalmente em humanos e plantas.

Atualmente, vários estudos com ciclofilina A de fungos vêm sendo realizados. A proteína tem sido relacionada à patogenicidade e virulência, sendo importante no momento da infecção na planta, assim como na morfologia das hifas, produção de conídios, taxas de germinação e outras estruturas específicas como apressórios (Chen *et al.* 2011). Uma das prováveis razão para esse mecanismo é a dependência que os fitopatógenos possuem pela calcineurina, uma proteína que ativa fatores de transcrição, uma vez que estejam ligadas a ciclofilina (Monzani *et al.* 2011).

Ciclosporina A é uma droga imunossupressora, que se liga fortemente na região de alça da ciclofilina inibindo a sua atividade (Wang e Heitman 2005; Kaur *et al.* 2015; Single *et al.* 2017). Estudos com fitopatógenos, como *Magnaporthe grisea* evidenciaram que a Ciclosporina A influencia negativamente para o desenvolvimento de apressórios, crescimento de hifas e formação de conídios (Viaud *et al.* 2002). Em *Moniliophthora perniciosa*, a ciclosporina A também diminuiu drasticamente o crescimento de hifas (Monzani *et al.* 2011). Em contrapartida, em humanos ela apresenta vastos efeitos colaterais, principalmente de neuro e nefrotoxicidade, sendo utilizada na medicina apenas em casos de transplantes de órgãos para evitar rejeição (Garcia *et al.* 2004), tornando a sua aplicação como fungicida em fitopatógenos pouco viável, devido os possíveis riscos de ampla magnitude. Sendo assim, a Ciclosporina pode ser usada como droga protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas fungicidas para fitopatógenos de plantas, mas que no entanto não apresentem acentuados efeitos colaterais. (Monzani *et al.* 2011).

O grande intuito no nosso trabalho foi caracterizar a ciclofilina A do *Moniliophthora roreri* através metodologias *in silico* de modelagem por homologia, triagem virtual, *docking* e dinâmica molecular, a fim de encontrar moléculas de baixo peso molecular, com baixo custo, seguras e seletivas com alto potencial para atividade inibitória da ciclofilina A do *Moniliophthora roreri* (MrCYPA). A proteína também foi analisada por ferramentas da biologia molecular como expressão de proteínas em sistema heterólogo, identificação por espectrometria de massas, análises físico-químicas como teste de expressão e solubilidade.

Por fim, acreditamos que as moléculas ZJX 3, ZINC 93 e ZINC 83 possuem grande potencial de exercerem atividade inibitória da Ciclofilina no *M. roreri* e possivelmente são compostos que atuam como fungicidas e/ou fungistáticos. Testes futuros *in vitro* e *in vivo* necessitam ser realizados para comprovar a atividade e segurança dessas moléculas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a estrutura tridimensional da Ciclofilina de *Moniliophthora roreri* e estudar possíveis inibidores/moduladores dessa proteína, utilizando ferramentas de Bioinformática e Biologia Molecular.

2.2 Objetivos específicos

Elucidar a estrutura tridimensional da Ciclofilina de *M. roreri* e *T. cacao* utilizando ferramentas de modelagem por homologia;

Encontrar moléculas de fontes naturais ou sintética realizando triagens *in silico* baseadas nos ligantes (LBVS) e no receptor (RBVS) que possam se acoplar em sítios de interesse da Ciclofilina de *M. roreri*.

Verificar se os novos ligantes encontrados também possuem afinidade pela ciclofilina do *Theobroma cacao*.

Avaliar a capacidade da expressão de MrCYPA em sistema em sistema heterólogo, assim como suas características físico-químicas.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 *Moniliophthora roreri*

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora roreri*, pertencente à família Marasmiaceae (Aime e Phillips-Mora, 2005), é o agente causador da monília uma doença devastadora do cacaueiro (*Theobroma Cacao*) que infecta também o gênero *Herrania*. Desde a sua descoberta em 1917, tem passado por várias mudanças em sua nomenclatura. Inicialmente foi muito estudado pelo pesquisador Rorer, o qual realizava visitas constantes nas plantações infectadas na cidade de Quevedo, Equador, no intuito de fazer monitoramento da doença e realizar coletas para a caracterização taxonômica (Evans, 1981, 2002). Após alguns anos Rorer levou uma amostra do fungo para a Universidade da Califórnia, onde o pesquisador Smith a identificou como pertencer ao gênero *Monília*, ficando o fungo por um período sem nome científico específico. Em 1933 Ciferri e Parodi a partir de frutos coletados no Equador fizeram uma homenagem a Rorer e foram os primeiros a classificar o fungo como *Monília roreri*, um ascomiceto anamórfico.

No entanto, em 1978 Evans e colaboradores examinaram o *M. roreri* sobre seu substrato natural e cultura pura, evidenciaram que ele não apresentava características clássicas para o gênero *Monília*, mas que sofria maturação conidial basipetal e micélios com septos doliporos, assim como ocorre com os basidiomicetos (Evans *et al.*, 1978). A partir disso, criou-se um novo gênero chamado de *Moniliophthora* para inserir o patógeno que passou a ser classificado como *Moniliophthora roreri*, um fungo basidiomiceto anamórfico. Após algumas décadas, estudos demonstraram a meiose durante a esporogênese e germinação, sendo este fator o possível responsável por conferir maior variabilidade genética, alta resistência e adaptabilidade do fungo, sendo essas características importantes para classificá-lo como basidiomiceto teleomórfico. A partir desse estudo concluiu-se que o meiospоро é o principal propágulo infectante, e não o conídio (Aime e Phillips-Mora *et al.*, 2005, Evans *et al.*, 2002 e 2003).

Devido aos estudos pioneiros do pesquisador Rorer, acreditava-se que *Moniliophthora roreri* era nativo do Equador (Evans, 1981). Entretanto, estudos moleculares evidenciaram maior variabilidade genética na Colômbia sendo este o seu país de origem (PHILLIPS-MORA *et al.*, 2007).

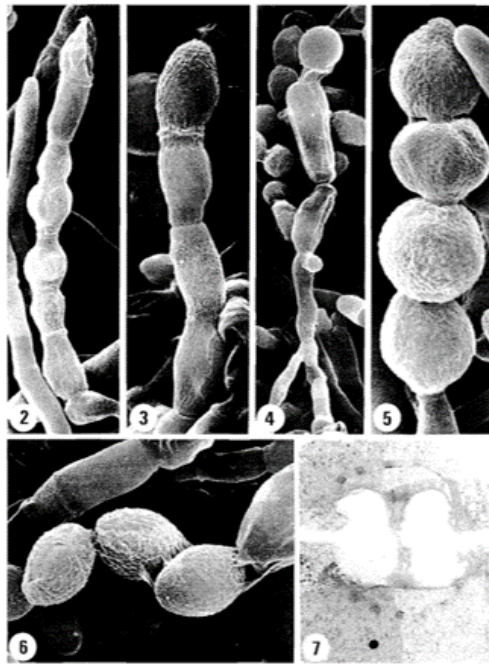


Figura 10 *Moniliophthoralaroreri*-micrografias de várias estruturas conidiais mostrando cadeias basipetais de conídios. (Evans *et al.*1978)

Essa espécie é um patógeno hemibiotrófico, onde apresenta duas fases no seu ciclo de vida a fase biotrófica (parasítica) com hifas monocarióticas e a fase necrotrófica (saprofítica) com hifas dicarióticas (Bailey *et al.*, 2013). As condições ambientais desempenham um papel fundamental no progresso de *M. roreri*. O ciclo começa quando a umidade é baixa (estação seca), onde milhões de esporos são gerados (até 44 milhões de esporos/cm²) para novas infecções (Alvarez *et al.*, 2014). Em seguida, estes meiosporos distribuídos pelo vento e chuva é depositado sobre a superfície das folhas e frutos do hospedeiro, desenvolvendo tubos germinativos monocarióticos (haploides) que são dirigidos para os tecidos centrais (mesoderme e sementes) (Bailey *et al.*, 2013, Alvarez 2014). Após longo período de incubação de aproximadamente 30 dias após a infecção ocorre um desequilíbrio hormonal na planta e perda total do fruto infectado, sendo os frutos mais suscetíveis aqueles com menos de três meses de idade (Aime e Phillios-Mora, 2005; Phyllips Mora e Wilkinson, 2007). Os sintomas iniciais da monília são inchaço, deformação, áreas de maturação precoce no fruto e manchas marrons cor de chocolate, o que caracteriza a fase biotrófica (Fulton, 1989; Evans, 1981 e 2002; Phyllips Mora e Wilkinson, 2007; Bailey *et al.* 2013).

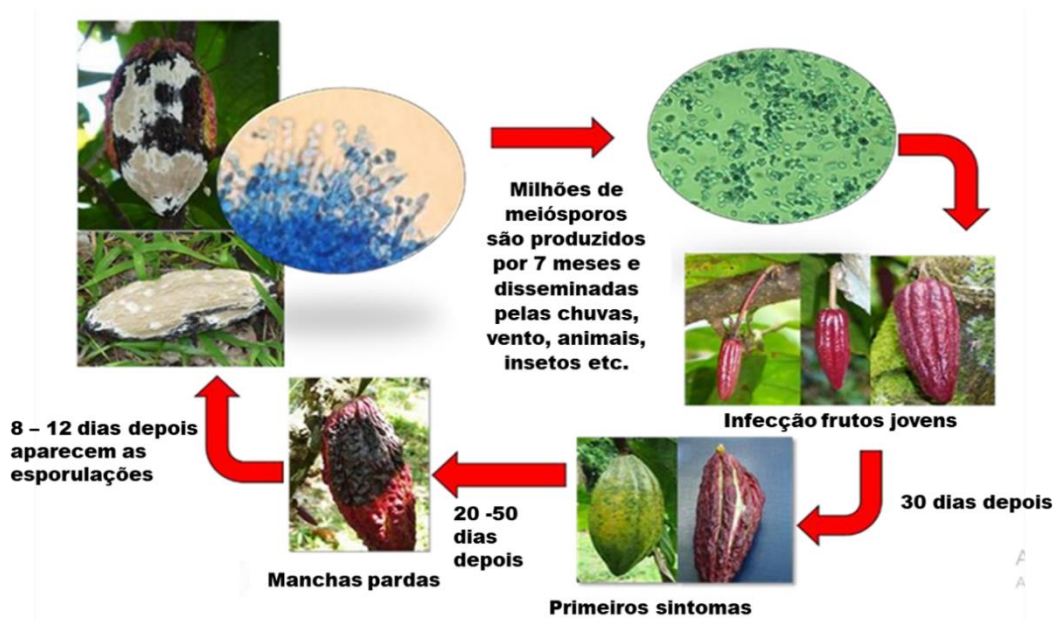


Figura 2 – Ciclo de vida no *Moniliophthora roreri*. Adaptada de Vicente, 2018.

Na fase necrotrófica (60 dias após a infecção), as hifas monocarióticas se unem, formando hifas dicarióticas e, posteriormente, ocorre a fusão dos núcleos e o crescimento do micélio branco, formando um pseudo estroma na superfície do fruto infectado, com isso, este torna-se esporulante e, posteriormente, necrótico (Evans, 2002; Phyllips Mora e Wilkinson, 2007).

Em 1950 acreditava-se que a *Monília* havia atingido o limite de sua distribuição natural, restrita apenas alguns países do noroeste da América do Sul, como Colômbia, Equador e Venezuela, e por isso, não era de interesse comum para outros países produtores de cacau. No entanto, o pesquisador Thurton, já descrevia o *Moniliophthora roreri* como um patógeno altamente destrutivo e uma doença de grande ameaça aos cultivos. Logo, em 1956 o fungo surgiu no Panamá e em 1978 na Costa Rica aumentando os seus limites geográficos o que levou a mudar a antiga percepção sobre a doença (Evans, 1986).

Evans e colaboradores (2003) consideram que o *Moniliophthora roreri* está em uma fase invasiva - chegando à Nicarágua em 1980, Peru em 1988, Honduras em 1997, Guatemala em 2002, Belize em 2004, México em 2005 (Phillips-Mora et al, 2007) e Jamaica 2016 (Barbosa et al. 2018). A presença desta doença tem efeitos tão devastadores na produção que a viabilidade econômica em longo prazo pode ser comprometida. Nos diferentes países, onde ela se encontra estabelecida, as perdas atribuídas têm sido tão sérias que as culturas inteiras têm sido abandonadas (Phillips-Mora et al. 2007, Barbosa et al. 2018).

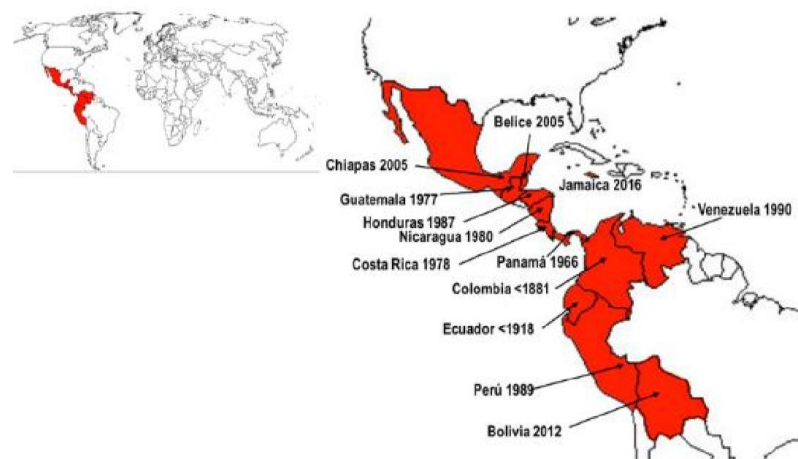


Figura 3 – Distribuição mundial da monília (Perez-Vicente,2018)

E por estar avançando de maneira considerável, há grande preocupação em devastar plantações em outros países produtores de cacau como Brasil ou África, sendo o último o maior produtor de cacau do mundo. Segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), no Brasil a monília é considerada como uma das 20 principais pragas quarentenárias ausentes, e possui desde 2012 um plano de contingência específico que estabelece procedimentos operacionais para a aplicação de medidas preventivas e emergenciais para erradicação de focos e contenção da praga.

3.2 Aspectos gerais das Ciclofilinas

As ciclofilinas são proteínas amplamente conhecidas devido a sua atividade peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) e por ser o alvo molecular da droga Ciclosporina A (Washet *et al.*, 1992; Viaud *et al.*, 2002; Single *et al.*, 2017). Junto com outras duas classes de proteínas, as FKBP e Parvulins, constituem a superfamília chamada de Imunofilinas, (Harikishore e Yoon, 2015; Donyak e Gestwicki, 2016). O termo “imunofilina” foi dada pela habilidade que todas possuem de se ligar a moléculas imunossupressoras originadas por fungos (Figura 4) (Singhet *et al.*, 2017).

A primeira ciclofilina descoberta e purificada foi a ciclofilina A, a partir de timócitos de bovinos (Handschumacher *et al.* 1984). As análises genômicas têm identificado um grande número de ciclofilinas em diversos organismos. Humanos possuem um total de 24 ciclofilinas (Gallet, 2003), *Arabidopsis*, 31 (Kumari *et al.* 2015), *Saccharomyces*, 8 (Wang & Heitman, 1995; Kumari *et al.* 2013), *Glycine Max*, 62 (Mainali *et al.* 2014). Elas exercem papel variado que inclui o auxílio no dobramento de outras proteínas, montagem, transporte, regulações de

sinalização de cálcio, controle transcricional, crescimento de neurônios, e também resposta de stress do ambiente (Li, *et al*,2005).

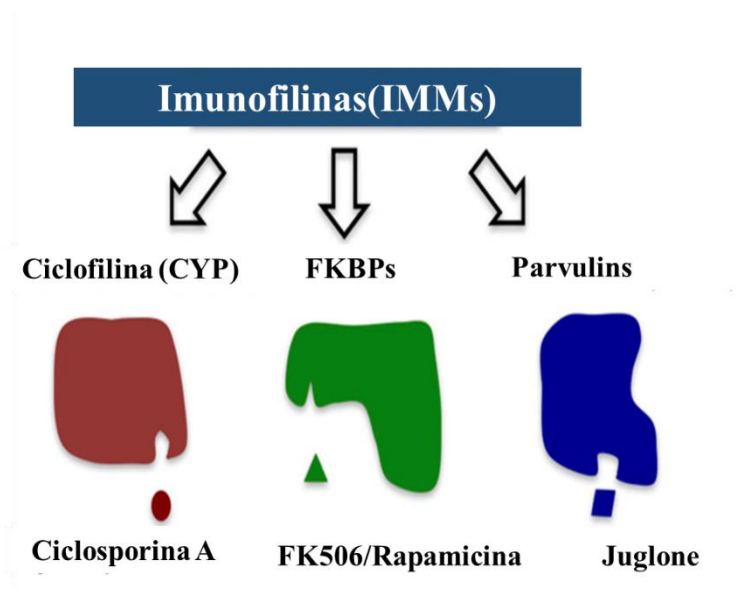


Figura 4: As Imunofilinas com seus respectivos inibidores. Adaptada de Singh,2017

As ciclofilinas (PPIase), também conhecidas como rotamases e exercem atividade catalítica da isomerização cis-trans na região amino-terminal nos resíduos de prolina (Stames e Zuker 1990; Walsh *et al.* 1992), ela é dada devido o domínio de 109 aminoácidos conhecido como CLD (cyclophilin-like domain) (Fisher *et al.*, 1989; Wang e Heitman, 2005). A função específica das PPIases de atuar nas ligações peptídicas dos aminoácidos de prolina mantendo-os na conformação cis ocorre em apenas 6 % na cadeia polipeptídica, sendo esses resíduos os únicos a permanecerem mais estáveis em tal conformação, e cerca de 99% desse fenômeno ocorre em regiões de alça entre folhas beta (Kumari,*et al.* 2013).

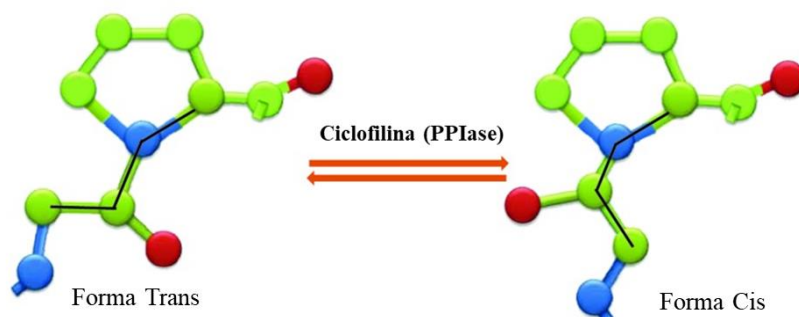


Figura 5 - Atividade PPIase das Ciclofilinas. Adaptada de Kumari *et al.* 2013

Tal função é de suma importância, uma vez que para uma proteína ser de fato útil a célula, ela necessita compor a sua estrutura tridimensional ativa. No entanto, muitas delas não

conseguem adquirir essa conformação sozinha, sendo necessário a ativação de um sistema molecular que recruta outras proteínas especializadas para assistir nesse enovelamento, levando a mudanças distintas na conformação. (Lu, C. *et al*, 2007). Existem várias proteínas que exercem tal atividade, elas são conhecidas como chaperonas moleculares, e as enzimas com atividade PPIase é uma classe de chaperona, chamada de chaperonina. Em um trabalho feito por Gething e Sambrook (1992), observou-se que as ciclofilinas foram localizadas próximas a proteínas isomerase dissulfeto e entre numerosas chaperonas, ressaltando a ideia que atuam para facilitar no dobramento e montagem proteica (Chen *et al*. 2017).

As ciclofilinas possuem domínios altamente conservados em procariotos e eucariotos, sugerindo a sua importância em vários processos vitais a célula que vão além da atividade PPIase (Chao *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2017 e Chen *et al.*, 2015). Elas também exercem papel fundamental na resposta do sistema imune adquirido, e isso ocorre porque a calcineurina, uma serina-treonina fosfatase cálcio dependente, necessita estar ligada a ciclofilina para promover a desfosforilação do fator nuclear de ativação de células T (NFATc), esse fator é imprescindível para haver a ativação da transcrição de genes da interleucina 2, necessário para a diferenciação dos linfócitos T e promover resposta específica para determinado antígeno (Costa e Ferreira, 2006).

Após a descoberta de conter sítio de ligação para droga ciclosporina A, a ciclofilina passou a ter relevância clínica de destaque, despertando grande curiosidade no meio científico. Logo, sendo objeto de estudo de diversas pesquisas em humanos, plantas e microrganismos, foi encontrada atuação significativa em vários processos como neoplasias, cardiopatias, mecanismos de resistência de planta, fator de virulência de vírus e fungos patogênicos (Luo *et al*, 2005; Zhao *et al.*, 2018)

Estudo realizado por Zhao (2018), comparou tecidos do fígado de humanos saudáveis e acometidos pelo quadro de carcinoma hepatocelular, na tentativa de identificar os genes mais expressos durante a progressão da doença. Na pesquisa ficou comprovado que o gene da ciclofilina é super expresso em fases importantes da patologia, contribuindo para o crescimento do tumor.

Mesmo com tantos estudos com a ciclofilina, muitos de seus mecanismos na célula e como eles interferem em um organismo como um todo, ainda possuem largas lacunas desconhecidas (Single *et al.*, 2017). Inclusive se a presença de múltiplos membros em um mesmo indivíduo confere um processo de compensação para eventual perda de membros em

particular, ou se cada um exerce funções específicas ainda não totalmente descritas na literatura. Contudo, devido possuir características peculiares as ciclofilinas vem ganhando força não apenas nas pesquisas relaciona a humanos e plantas. Nos últimos anos, a sua relação como fator de virulência de fitopatógenos vem demonstrando grande relevância no processo de infecção por fungos (Kumari *et al.*, 2013).

3.3 Ciclofilinas em fungos e plantas.

Para entender os mecanismos de controle de doenças em plantas causadas por fungos patogênicos é necessário um estudo detalhado da patologia e biologia do fungo (Viaud *et al.*, 2002). Logo, estudos com esses microrganismos utilizando ferramentas da biologia molecular foram aplicados na tentativa de identificar os genes mais expressos no momento de infecção. Em vários casos, observou-se que o genes codificadores de ciclofilinas elevaram a sua expressão de forma extrema em vários estágios da doença, confirmando a sua relação nos processos de infecção e/ou virulência de fungos em plantas.

Em *Magnaporthe oryzae*, o CYP1 influencia o turgor celular, geração de apressórios, crescimento de hifas e desenvolvimento de conídios, enquanto em *Botrytis cinerea*, a ciclofilina BCP1 é necessária para a penetração de células vegetais durante a infecção e o crescimento (Viaud *et al.* 2002; 2003). *Cryphonectria parasitica* CYP1 influencia na morfologia das hifas, produção de conídios, taxas de germinação de esporos e tamanho de esporos assexuados embora este fungo não forme apressórios (Chen *et al.* 2011). A forma como a ciclofilina atua no desenvolvimento dos fungos no momento da interação parasito-hospedeiro varia de acordo com a biologia de cada microrganismo, mas acredita-se que a sua participação em mecanismos diversos seja devido a importância da calcineurina no metabolismo fúngico e a capacidade que a ciclofilina tem de possuir domínios variáveis.

Assim, as ciclofilinas em fitopatógenos são divididas em duas classes: i) ciclofilinas de domínios únicos e ii) ciclofilinas de múltiplos domínios. As de domínios únicos carregam um domínio catalítico CLD (cyclophilin-like domain) onde as vezes inclui peptídeo sinal que o direciona para a via secretora (Gan *et al.* 2009; Singh *et al.* 2014). As ciclofilinas A, são classificadas como domínio único e é a mais abundante em fitopatógenos. As ciclofilinas de domínios múltiplos são aquelas que possuem domínios adicionais podendo ser outras regiões CLDs, ou domínios diferentes como repetições tetraco-peptídeo TPR, uma repetição interna de domínios WD40, RNP domínio de ligação de RNA ou motivo de reconhecimento (RRM; a U-box e um domínio glutarredoxina). Esses múltiplos domínios indicam o potente papel das

ciclofilinas em processos como enovelamento de proteínas, ligação com RNA e interação com histonas (Scheufler *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2001; Li *et al.* 2007; Bannikova *et al.* 2013; Schiene-Fischer 2015).

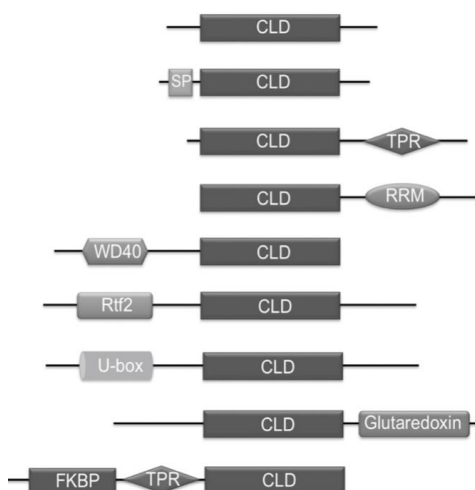


Figura 6 – Domínios das ciclofilinas (Singh *et al.* 2017).

Em um estudo feito por Viaud *et al.* (2002) com plantas inoculadas por mutante Cyp1 T33 de *Magnaporthe grisea*, resultou na menor taxa de infecção da planta, com base no número de lesões da doença observada, onde afetou a função do apressório que não penetrou na cutícula da folha e foi incapaz de se desenvolver completamente. A deleção não afetou o crescimento vegetativo em culturas, mas o desenvolvimento de conídios foi afetado. A CYP1 cyclophilin, portanto, parece desempenhar vários papéis celulares distintos em *Magnaporthe grisea*, influenciando o desenvolvimento de estruturas reprodutivas assexuadas e geração de turgor celular em apressórios (Figura 7).



Figura 7 – Planta inoculada com solução de *Magnaporthe grisea* selvagem e mutada no gene cyp. 1 e 2 folha de planta inoculada com solução de conídios selvagem 10^4 / mL. 3 inoculada com uma suspensão selvagem na concentração de 10^5 conídios / mL. 4 e 5 foram inoculadas com uma suspensão de conídios TR33 mutante cyp1

a uma concentração de 10^4 conídios / mL. A folha 6 foi de uma planta inoculada com uma suspensão de conídios TR33 mutante *cyp1* a uma concentração de 10^4 conídios / mL (Viaudet *al.*, 2002).

Trabalhos também foram realizados com *Botrytis cinerea* inoculando plantas de tomate com solução de conídios de feijão com solução de micélio, onde gene *bcp1* do fungo codificador da ciclofilina A, foi identificado e inativado. Nesse estudo mutante *bcp1* nulo ainda foi capaz de desenvolver estruturas de infecção, mas foi alterado no desenvolvimento de sintomas em folhas de feijão e tomate (Figura 8). Neste contexto foi possível comprovar que em *Botrytis cinerea*, a ciclofilina BCP1 é necessária para a penetração de células vegetais e o crescimento in vitro durante a infecção (Viaudet *et al.* 2003).

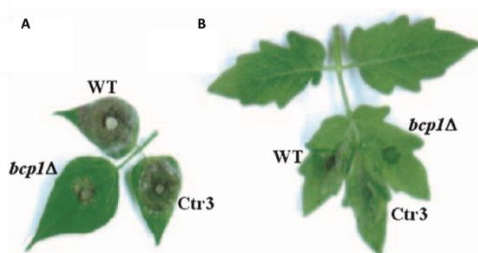


Figura 8 – Ensaio de patogenicidade de *Botrytis cinerea* em folhas de feijão(A) e folhas de tomate(B)(Viaudet *al.*, 2003).

Em plantas as ciclofilinas estão relacionadas com mecanismos de defesa a resposta hipersensível e tolerância ao stress. No entanto, alguns autores acreditam que elas podem se comportar ativando efetores de microrganismos fitopatogênicos ao provocar uma mudança conformacional nessas estruturas, atuando como um tipo de elicitor. Esse reconhecimento entre efector-ciclofilina, se dá através de uma loop exclusiva encontrada em plantas, normalmente rica com os aminoácidos Lys, Ser, Gly, Lys, Pro, Leu, His, sendo uma região de reconhecimento para o microrganismo.

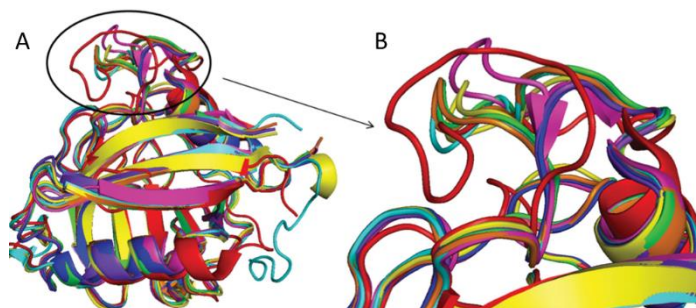


Figura 9– Alinhamento estrutural de ciclofilinas de vários organismos. Identificada alça divergente *Triticum aestivum* (Sekhonet et al 2013)

Uma alteração exclusiva em ciclofilinas de plantas foi identificada por meio de um alinhamento 3D com diversos organismos, como protozoários, fungos, mamíferos, bactérias, uma alça exclusiva nos aminoácidos 48KSGKPLH54 foi encontrada em (*Triticum aestivum*) (Sekhon *et al.*, 2013).

3.4 Bioinformática: Uma ferramenta na predição de estruturas proteicas

As proteínas são moléculas fundamentais para que haja condições favoráveis a vida. Elas estão envolvidas nos mais diversos processos biológicos atuando como enzimas, fatores de transcrição, inibidores, transportadores, mensageiros, entre outros. Por essa razão, a compreensão da função bioquímica e interações das proteínas são indispensáveis para descobertas de novos possíveis alvos moleculares, diagnóstico e entendimento sobre processos naturais e patológicos. Entretanto, para obter tais informações é primordial o conhecimento prévio da estrutura tridimensional, uma vez que a função química de cada proteína está relacionada a uma estrutura específica. Por tal motivo, o conhecimento minucioso dessas estruturas sempre despertou vasto interesse científico, e elucidar o maior número de estruturas tridimensionais proteicas tem unido esforços de instituições privadas e governamentais em todo o mundo (Santos Filho e Alencastro, 2003).

A resolução da estrutura tridimensional das inúmeras sequências de aminoácidos depositadas nos bancos de dados de genomas é um desafio que persiste e aumenta na era pós genômica (c). A inovação das técnicas experimentais para definir essas estruturas tem aumentado de forma considerável, sobretudo nas áreas de cristalografia de raios-X, difração de nêutrons e de ressonância magnética nuclear (RMN). Inclusive, em 2017 o prêmio Nobel de Bioquímica foi dado aos pesquisadores que criaram um novo método para elucidar estruturas de biomoléculas. No entanto, muitos problemas básicos persistem, como por exemplo a obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios necessários é em muitos casos, difícil e os cristais obtidos nem sempre têm a qualidade necessária para o trabalho experimental (somente uma em cada vinte proteínas, aproximadamente, produz cristais adequados). Além disso, em certas classes de proteínas, como por exemplo as proteínas de membrana celular, raramente cristalizam e dificilmente podem ser tratadas de modo satisfatório por RMN (Maggio *et. al.*, 2010, SBQ 2017; Almeida *et. al.*, 2017).

O reflexo desse contexto é a discrepância entre a quantidade de sequências contidas no maior centro de informações biotecnológicas (NCBI) de acesso livre, em relação ao banco de dados de estruturas resolvidas por métodos experimentais, o Protein Data Bank (PDB).

Segundo o NCBI, estão depositadas 17.364.607 sequências e no PDB apenas 148.827 estruturas (acesso em 09 de fevereiro de 2019).

Em contrapartida, um novo cenário foi sendo desenvolvido. Com o surgimento dos sequenciadores automáticos, a necessidade de elucidar os numerosos e complexos dados gerados pelos sequenciamento dos genomas, o desenvolvimento de ferramentas computacionais e aperfeiçoamento das técnicas moleculares, favoreceu o desenvolvimento da bioinformática. Ela cresceu e ganhou força em paralelo em com a internet, gerando uma rápida análise de dados e a troca de informações sobre os códigos biológicos e computacionais que estão cada vez mais em convivência harmônica, originando um vasto cenário de sistemas *in silico* para os mais diversos fins na biologia, incluindo a simulação de formas naturais e modificadas de biomacromoléculas ou produtos específicos (Espindola et. al., 2010).

A modelagem molecular é uma ramificação da Bioinformática, que estuda a predição da estrutura e da energia de um sistema molecular e suas variações dependentes das reações químicas (Sant'anna *et al.*, 1995). Segundo a IUPAC constitui na investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias em escalas de proporções reais. Um dos objetivos principais da bioinformática estrutural é modelar, analisar e identificar funções e entender como as estruturas de DNA, RNA e proteínas se relacionam. Hoje diversas técnicas, algoritmos, e programas estão disponíveis e muitos vem sendo desenvolvidos, tendo como alvo a geração de modelos proteicos tridimensionais, assim como a sua validação, a interação com outras moléculas e simulação de dinâmica molecular em condições fisiológicas. Essa ferramenta da bioinformática nos últimos anos vem sendo cada vez mais utilizada nas pesquisas desenvolvidas em diversas áreas, destacando-se na biologia molecular e na síntese de drogas (Altman e Dugan 2009 apud Nicolau Junior 2013).

Tendo em vista as dificuldades experimentais, a metodologia de modelagem molecular surgiu para contribuir para a elucidação de estruturas 3D de proteínas. Esta técnica possui essencialmente três métodos: *Ab initio*, enovelamento (threading) e modelagem por homologia. A decisão de se optar por um ou outro método baseia-se nas informações existentes sobre a proteína-problema, principalmente na existência ou não de uma estrutura(s) homóloga(s) (Gibas; Jambeck, 2001 apud Andrade 2008).

A resolução pela técnica de *ab initio* consiste em construir a proteína “do zero”, ou seja, baseado apenas em princípios físicos, sem a influência de estruturas proteicas homólogas ou correlatas, sendo sua principal vantagem (Klepeis *et al.*, 2005). Por outro lado, a principal desvantagem é que essa técnica requer grande aporte computacional e dessa forma é utilizada, quase que exclusivamente, para a determinação de estruturas de proteínas menores (Huang *et al.*, 2000; Nicolau Junior, 2013; Capriles *et al.*, 2014).

Outra técnica para a geração de estruturas proteicas é o *threading*, que consiste na modelagem de proteínas baseado no padrão de enovelamento de outras estruturas proteicas previamente determinadas. Dessa forma, sua principal vantagem é a possibilidade de modelar proteínas de médio e grande porte sem que exista a estrutura de uma proteína homóloga determinada. Contudo, por se basear em padrões de enovelamento, o *threading* nem sempre apresenta resultados satisfatórios (MA *et al.*, 2013; Capriles *et al.*, 2014).

Por fim, a estrutura de uma proteína pode ser determinada pela técnica de modelagem comparativa, também conhecida como modelagem por homologia. Essa técnica se baseia no alinhamento de aminoácidos idênticos entre uma estrutura molde com a sequência modelo a ser construído. Uma limitação dessa técnica é a necessidade de haver uma proteína molde para desenvolver todo o processo (Calixto *et al.*, 2013)

3.5 Modelagem por homologia

A Modelagem por Homologia (MH) é baseada no processo de evolução biológica, sendo que proteínas que evoluem a partir de um ancestral comum são conhecidas como homólogas. Segundo Santos Filho e Alvarez (2003) a modelagem por homologia é baseada em alguns padrões a nível molecular, sendo eles: (a) identidade entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: hélices- α e fitas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias. Outro fato importante é que as proteínas agrupam-se em um número limitado de famílias tridimensionais. Estima-se que existam cerca de 5.000 famílias proteicas. Consequentemente, quando se conhece a estrutura de pelo menos um representante de uma família é geralmente possível modelar, por homologia, os demais membros da família. De maneira geral, a sequência de aminoácidos entre homólogos sempre será menos conservada do que a estrutura (Santos – Filho e Alencastro 2003; Calixto 2013; Almeida *et al.*, 2017)

A modelagem por homologia, também denominada de modelagem comparativa, é a ferramenta mais bem sucedida na predição de estruturas 3D de proteínas *in silico*, uma vez que além de possuir o princípio da conservação de estruturas entre proteínas homólogas, implica para execução do método a existência de uma proteína-molde (estrutura tridimensional conhecida) determinada previamente por métodos experimentais (raio-X e RMN) (Calixto, 2013).

A modelagem por homologia consiste em cinco estágios principais que devem ser seguido independente do método escolhido para a construção do modelo. O primeiro passo é o 1) alinhamento e seleção do molde; 2) construção do modelo; 3) modelagem das alças; 4) modelagem das cadeias laterais; 5) refinamento; 6) validação (Calixto *et al.*, 2013).

O êxito na modelagem comparativa é diretamente proporcional ao grau de identidade entre a estrutura molde e a sequência modelo, no qual a etapa inicial do alinhamento possui grande importância e deve ser realizada com cuidado no processo. Neste método é necessário que ambas apresentem certo grau de identidade, respeitando uma escala de confiabilidade, sendo que modelos gerados com identidade superior a 50% são considerados de alta confiança, entre 30% e 50% intermediária e modelos entre 25% e 30% são considerados de baixa confiança e de difícil correção no processo de refinamento (Almeida *et. al.*, 2017).

Na construção do modelo estrutural, vários métodos podem ser empregados, todos bem conhecidos e documentados na literatura, sendo eles a restrição espacial (Rost, 1999), segmento correspondente (Levitt, 1992), e montagem de corpos rígido (Schoonman *et al.*, 1998).

A modelagem por satisfação de restrição espacial se baseia na formação de várias delimitações na estrutura-alvo em construção, usando um alinhamento entre a proteína-alvo e proteínas-molde relacionadas como referência. A geração de estruturas por restrição espacial tem como alicerce o fato de que as distâncias entre os resíduos alinhados na proteína-alvo e proteína-molde são similares (Rost, 1999).

O método de segmento correspondente, se baseia na construção de estruturas pelo uso de conjuntos de posições atômicas da proteína-molde como guia de posição. Todos os segmentos atômicos que atuam como guias de posição podem ser obtidos pelo escaneamento de proteínas com estrutura conhecida (Levitt, 1992). Em adição aos métodos anteriores, uma estrutura proteica pode ser gerada pela busca de restrição conformacional baseado na função de energia.

A construção do modelo pelo método de montagem de corpo rígido se baseia na dissecação da proteína-alvo em regiões conservadas e variáveis comparadas à proteína-molde. O sucesso do modelo depende diretamente da escolha da proteína-molde e do percentual de identidade do alinhamento. A montagem de corpo rígido permite um grau de flexibilidade e automação, proporcionando a construção de modelos de boa qualidade de maneira fácil e rápida (Schoonman *et al.*, 1998).

O refinamento é uma etapa indispensável no processo da modelagem, no qual a proteína recém modelada é submetida a um processo que normalmente inicia com a minimização de energia a fim de torna-la mais próxima da conformação nativa. Na minimização de energia utiliza-se campo de força da mecânica molecular como Amber e GROMOS, podendo em alguns casos utilizar outras técnicas mais aprofundadas como Monte Carlo, Dinâmica molecular e algoritmo genético (Calixto 2013).

Por fim, a validação verifica a qualidade do seu modelo construído, sendo necessário que o mesmo apresente bons parâmetros esteroquímicos. O gráfico de Ramachandran é provavelmente a ferramenta mais importante na determinação da qualidade da proteína, pois aponta a existência de impedimentos estereoquímicos na cadeia principal dos aminoácidos. Consideramos como válido, a estrutura que apresenta poucas distorções nos contatos atômicos (Laskowski *et al.*, 1996).

O SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) é um servidor para modelagem comparativa automatizada de estruturas proteicas tridimensionais (3D). Foi pioneira no campo da modelagem automatizada a partir de 1993 e é a instalação de modelagem automatizada baseada na web mais amplamente usada atualmente. Ele fornece vários níveis de interação com o usuário por meio de sua interface na internet: no primeiro modo de abordagem, apenas uma sequência de aminoácidos de uma proteína é submetida para construir um modelo 3D. Seleção de modelo, alinhamento e modelagem são feitos automatizados pelo servidor. No modo de alinhamento, o processo de modelagem é baseado em um alinhamento de modelo de destino definido pelo usuário. Tarefas complexas de modelagem podem ser tratadas com o "modo de projeto" usando o DeepView (Swiss-PdbViewer), um ambiente de trabalho integrado de sequência-a-estrutura (Schwede, T. *et al.* 2003). O software segue a sequência do processo de modelagem de homologia, consiste as etapas como: (i) seleção de modelo; (ii) alinhamento do modelo alvo; (iii) construção de modelos; e (iv) avaliação. Por sua vez, elas podem ser iterativamente repetidas até que uma estrutura de modelo satisfatória seja alcançada. A

abordagem do servidor SWISS-MODEL pode ser descrita como uma montagem de fragmentos rígidos(Schwede,*et al.* 2003).

3.6 Triagem virtual baseada no ligante

A triagem virtual baseada em ligantes é uma estratégia que utiliza compostos com atividade biológica já conhecida como fonte de informação inicial, sem levar em conta a estrutura de um alvo molecular, onde o raciocínio central se baseia no princípio de que as moléculas que compartilham semelhanças estruturais entre si podem apresentar também atividade biológica semelhante. (Baldi e Nasr, 2010)

Existe uma grande variedade de abordagens buscando selecionar um conjunto de ligantes que apresentem interações favoráveis do complexo receptor-ligante. Essas técnicas são amplamente utilizadas no desenvolvimento racional de novos fármacos, podendo esta ser aplicada nas mais variáveis vertentes. Basicamente a triagem virtual por novos ligantes são abordadas de duas maneiras: **i -**) o Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Ligante (LBDD - do inglês Ligand-Based Drug Design) e **ii -**) Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD do inglês Structure-Based Drug Design) (Duhovny, D.S et al, 2008).

O SBDD utiliza as informações da estrutura do receptor para avaliar e selecionar os compostos que melhor interagem com a cavidade alvo. Existem muitas abordagens baseadas em SBDD visando reduzir o número de compostos a serem testados com experimentos de acoplamento molecular. No entanto, a alta capacidade computacional demandada para avaliar a flexibilidade no SBDD tem sido um fator limitante comum a todas as abordagens (Quevedo, C. 2016)

O LBDD captura as características de ligantes que são conhecidos por apresentar interações favoráveis com o receptor alvo. Esse conjunto de características é usado para identificar ligantes similares em banco de dados de pequenas moléculas (Quevedo, C. 2016).O PharmaGist é uma ferramenta web disponível gratuitamente, utilizada para detecção de grupos farmacofóricos. O método empregado é baseado em ligantes e não requer a estrutura do receptor alvo. Em vez disso, a entrada é um conjunto de estruturas de moléculas semelhantes a drogas que são conhecidas por se ligarem ao receptor e a saída consiste em farmacóforos candidatos que são calculados pelo alinhamento flexível múltiplo dos ligantes de entrada. O método

manipula a flexibilidade dos ligantes de entrada de maneira explícita e determinística no processo de alinhamento (Duhovny, *et al.* 2008).

Para realizar a comparação entre moléculas é necessário empregar um padrão de medida, conhecido como coeficiente de similaridade, o qual quantifica o grau de semelhança entre as estruturas químicas avaliadas. Existem inúmeros coeficientes de medida, onde o mais empregado em triagens virtuais é o coeficiente de Tanimoto. Ele fornece valores de comparação na faixa de 0 (zero) a 1 (um). O valor de 0 (zero) significa que não há similaridade entre as moléculas comparadas, já o valor de 1 denota 100% de similaridade. Através do coeficiente de Tanimoto, calcula-se a razão do número de características comuns entre as moléculas, pelo número total de características presentes em ambas, subtraído pelo número de características comuns. (Figura 10) (Rodrigues *et al.* 2012)

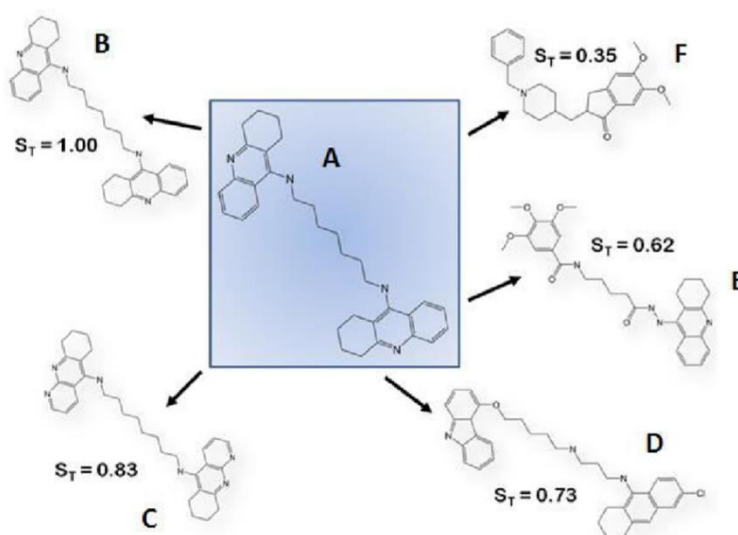


Figura 10 Comparação de similaridade molecular entre molécula alvo e outras estruturas através do índice de Tanimoto (Rodrigues *et al.* 2012)

3.7 Triagem virtual baseada no receptor: Acoplamento Molecular (*Docking*)

O *docking* molecular é um procedimento computacional que tenta prever a ligação não covalente entre a macromolécula (receptor) e uma pequena molécula (ligante) de forma eficiente, começando com estruturas obtidas de simulações MD ou modelagem de homologia, etc. O objetivo é prever as conformações e a afinidade de ligação (Trott e Olson, 2010).

Geralmente, o complexo molecular é composto de uma proteína conhecida como receptor e de uma molécula menor chamada de ligante que interage com o sítio ativo da proteína. Essas duas moléculas são mantidas juntas devido a forças atrativas que atuam entre elas e também devido a uma combinação das formas geométricas das duas moléculas. O processo de *docking* molecular pode ter aplicações práticas no desenho de fármacos, predição de complexos moleculares, simulação computacional da associação molecular entre substrato e enzima, entre outros (Brooijmans e Kuntz, 2003).

O *Docking* Molecular pode ser classificado em três níveis baseados no grau de aproximação de flexibilidade: (1) *Docking* de corpo rígido, no qual tanto a proteína quanto o ligante são considerados como dois corpos sólidos rígidos. (2) *Docking* Semi-flexível; esse modelo é assimétrico no qual uma das moléculas, geralmente o menor ligante, é considerado flexível, enquanto a outra é considerada rígida. (3) *Docking* flexível; nesse modelo, ambas as moléculas são consideradas flexíveis, entretanto, a flexibilidade de uma das moléculas (ou de ambas) geralmente é limitada ou simplificada devido ao alto custo computacional exigido (Halperin *et al.* 2002).

As funções de aptidão empregadas normalmente no *docking* proteína-ligante podem ser divididas em três grandes classes: funções de aptidão baseadas no campo de força, funções empíricas e baseadas no conhecimento. As funções de aptidão baseadas no campo de força são fundamentadas em um campo de força. Geralmente, os campos de força padrões quantificam a soma de duas energias, isto é, a energia de interação entre o receptor e o ligante, e a energia interna do ligante. As energias, normalmente, são calculadas através da combinação de van der Waals com os termos da energia eletrostática. Um potencial de Lennard-Jones é usado para descrever o termo de energia de van der Waals, enquanto o termo eletrostático é dado pela formulação de Coulomb com uma função dielétrica dependente da distância, fazendo com que a contribuição das interações carga-carga diminua. Contudo, existe a ausência dos termos de solvatação e entrópicos envolvidos na ligação, causando limitações nas funções de aptidão baseadas no campo de força.

Muitas funções de aptidão baseadas no campo de força existem. D-Score, G-Score (baseado no campo de força Tripos), GoldScore, e a função de aptidão AutoDock 4.0 (AUTOMated DOCKing of flexible ligands to receptors), baseada no campo de força AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement), são alguns dos mais tradicionais exemplos em termos de *docking*, mas os campos de forças mais clássicos e completos tais como AMBER,

CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics), e GROMOS (Groningen Molecular Simulation System), OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) também podem ser usados, entretanto com uma natural penalidade em termos de tempo computacional (Sousa *et al.* 2006).

O AutoDock Vina é um programa de código livre para a realização de acoplamento molecular e rastreo virtual desenvolvido por Oleg Trott do “Molecular Graphics Lab” no “The Scripps Research Institute”, La Jolla, EUA. A sua rapidez, precisão e livre acesso fazem do AutoDock Vina um programa rápido e fácil de usar. A função de pontuação do AutoDock Vina tem em conta as seguintes contribuições: interações estéricas (representadas pelos termos gauss 1, gauss 2, e repulsão), hidrofobicidade, ligações de hidrogênio e número de ângulos de torção de rotação livre dos ligandos (termo Nrot). O algoritmo de otimização global implementado no AutoDock Vina é o método de Iterated Local Search (Trott *et al.*, 2010).

O AutoDockTools é uma interface gráfica que permite executar, analisar e preparar o acoplamento molecular a realizar no AutoDock Vina. Este programa inclui as seguintes funcionalidades: visualização de arquivos de proteínas e compostos, definição do tamanho da “caixa” de acoplamento que especifica o espaço cartesiano de procura em que o programa irá realizar o acoplamento, seleção dos ângulos torcionais de rotação livre dos compostos e adição ou remoção dos átomos de hidrogênio (Trott *et al.*, 2010).

3.8 Dinâmica Molecular

Ferramenta que simula através de funções matemáticas, as estruturas, reações químicas e sistemas biológicos baseados nas leis da física. A aplicação dessa ferramenta na área da pesquisa permite analisar previamente pelo computador diversos fenômenos antes de serem avaliados por métodos experimentais. Além disso, com implementação da química computacional, é possível avaliar fenômenos que não ocorrem na natureza, inovando a forma de fazer ciência (Andrade *et al.* 2016).

Os métodos mais utilizados para análise de biomoléculas dentro da química computacional é a combinação da mecânica quântica com a mecânica molecular, ou a aplicação única da mecânica molecular. Iremos destacar a última devido ter sido a metodologia empregada nesse trabalho (Katto, 2014).

A mecânica molecular foi aplicada em 1960 por Lifson em sistemas biológicos, e vêm sendo utilizada há muitos anos, fornecendo informações importantes como estrutura e funções

das moléculas. Logo, a Mecânica Molecular (MM) é geralmente baseada em otimização de funções matemáticas com várias contribuições físicas, tais como os termos de atração e repulsão (forças intermoleculares) e outros para determinar a contribuição de energia interna (forças intramoleculares). A maior vantagem da mecânica molecular em comparação aos métodos quânticos é, sem dúvida, sua velocidade (Patel e Brooks, 2004)

Os campos de forças descritos na literatura são diversos, tais como: Amber (PARM99) (Cornel *et al.* 1995) CHARMM22 (Marcherel *et al.* 1998) GROMOS (Gusteren *et al.*, 1998), entre outros. O campo de força utilizado nesse trabalho foi o AMBER e nos permite prever estados de transição e estruturas de equilíbrio e energias relativas entre isômeros conformacionais ou entre moléculas diferentes.

Os cálculos do campo de força estão divididos basicamente em dois tipos: diretamente ligados (interações fortes) e os não diretamente ligados (interações mais fracas). Os termos diretamente ligados são descritos pelo cálculo do potencial entre as distâncias dos átomos, dos ângulos de ligação e ângulos torcionais. Os não diretamente ligados se dividem em dois tipos: interações de van der Waals e eletrostática. As ligações mais fortes são determinadas pelos átomos diretamente ligados por ligações covalentes. A equação do campo de força AMBER, é representada pela soma de várias contribuições de energia, ou seja, a ligação de estiramento (E_{lig}), ângulo de flexão (E_{ang}), torção (E_{tor}), eletrostática (E_{ele}) e termo de van der Waals (E_{vdW}) (Zgarbová, M. *et al.* 1995).

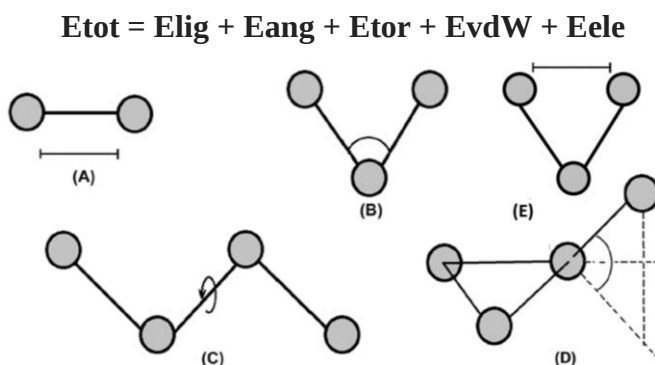


Figura 11. Representação entre átomos diretamente ligados e não ligados: (A) Ligação covalente entre pares de átomos; (B) Ângulo entre os átomos e suas respectivas ligações (C) Ângulo de torção entre os átomos (D) Ângulo de torção impróprio entre os átomos e suas ligações covalentes. (E) Representação de interação dos Átomos não ligados. (Katto, R. 2014) Adaptada

No entanto, estes métodos não levam em consideração os elétrons do sistema, e sim as interações entre núcleos. Apesar dos efeitos eletrônicos já estarem implicitamente incluídos nos

campos de força através de parametrizações, e assim reduzindo o custo computacional. O uso de campos de força pode ser comparado com vários tipos de resultados experimentais. Logo, se o modelamento de um campo de força for fisicamente adequado e bem parametrizado, a simulação da Dinâmica Molecular (DM) pode, em princípio, nos permitir compreender a estrutura energética e a dinâmica do sistema(c).

3.9 Inibidores derivados da Quinoxalina

As piridinas, quinolinas e quinoxalina são classificadas como estruturas químicas privilegiadas, na qual através de modificações específicas, podem se tornar uma alternativa viável para novos ligantes para alvos macromoleculares. As quinoxalinas, na qual destacamos nesse trabalho, também conhecidas como benzoparadiazinas, 1-4 benzodiazina, benzopirazina, 1-4 diazanoftaleno, fenopiazina, ou fenziiazina são uma importante classe de compostos heterocíclicos aromáticos bicíclicos que possuem em sua estrutura, um benzeno acoplado a um anel pirazina. (Zhoe *et al*,2018). Elas são encontradas na natureza em moléculas indispensáveis a vida, como as bases nitrogenadas púricas que constituem os ácidos nucleicos. Possuem fórmula molecular $C_8H_6N_2$, massa molar 130,15 g.mol, é uma base fraca, com pKa em torno de 0,56 e seu estado físico é sólido em condições padrão (Mamedov. 2016).



Figura 12 Estrutura química da Quinoxalina (Franco, 2017)

Essa classe de compostos também pode ser adquirida por métodos sintéticos, através de reações químicas como, o- fenilenodiamina com glicol, na presença de um catalizador ácido, e quando alfa dicetonas ou alfa cetoaldeídos passam a ser substrato, são obtidas as quinoxalina 2 substituídas e 2,3 dissustituídas por diversos grupos funcionais, originando vários compostos estruturalmente interessantes, na qual tem sido citados na literatura como estruturas privilegiadas que possibilitam diversas aplicações no contexto biotecnológico (Miranda *et al*. 2009).

Os derivados quinoxalínicos tem apontado resultados satisfatórios em resposta antitumoral, antiprotózoário e anti-inflamatória, antimicrobiana, fungicida, antiviral e vasoconstritora, entre outros, e estão disponíveis comercialmente por nomes como Equinomicina, Levomicina, Brimonidina, Quinacillina e Raltegravir. Assim, devido sua potente atividade e vasta aplicação biológica, essas moléculas tem ganhado destaque nos últimos anos, e tem sido um alvo promissor para pesquisadores com diversas finalidades (Gu *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017).

Logo, a obtenção de compostos heterocíclicos é um desafio que mobiliza vários grupos de pesquisa dentro da química, onde a buscam por métodos mais vantajosos para o acesso a moléculas biologicamente relevantes e seguras nos aspectos toxicológicos (Franco, 2017).

4.REFERÊNCIAS

AIME E PHILLIPS-MORA, W. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. PLANT PATHOLOGY.2007

AIME e PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. MYCOLOGIA, v. 97: 1012-1022. 2005.

ALMEIDA J. G, *et al* – Membrane proteins structures: A review on computation modeling tools – ELSEVIER , Julho 2017

ÁLVAREZ, J.C. *et al.* Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Biology stage of *Moniliophthora roreri* in Colombia. ACTA AGRONÓMICA, v. 63 (4): 388-399. 2014.

BAILEY, B.A. *et al.* Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. Physiological and Molecular PLANT PATHOLOGY, v. 81: 84-96. 2013.

BARBOSA, S. C. *et al.* Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. BMC GENOMICS. 2018

CALIXTO, P. H M. Aspectos gerais sobre a modelagem comparativa de proteínas. Ciência Equatorial. Volume 3 - Número 1 - 1º Semestre 2013

CAPRILES, P. V. S. Z.; TREVIZANI, R.; ROCHA, G. K.; DARDENNE, L. E.; CUSTÓDIO, F. L. Modelos Tridimensionais. In: VERLI, H. Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular. Organização de Hugo Verli. Porto Alegre , 2014

ESPINOLA F. S. *ET AL.* Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica- Biosci. J., Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 463-477, May/June 2010

EVANS,*et al.* On the taxonomy of Monilia, an important pathogen of Theobroma cacao in South America. CANADIAN JOURNAL OF BOTANY, v 56: 2528-2532. 1978.

EVANS,*et al.* What's in a name: Crinipellis, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? MYCOLOGIST, v. 16: 148-152. 2002.

EVANS, H.C. Invasive neotropical pathogens of tree crops. Pg. 83-112. In: WATLING, R. *et al.* (eds). TROPICAL MYCOLOGY. Vol. 2. Micromycetes. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2002.

EVANS, H.C. Pod rot of cacao caused by Moniliophthora (Monilia) roreri. PHYTOPATHOLOGICAL PAPERS. v. 24: 1-44. 1981b.

GALET, A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. JOURNAL CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY.2003

HALPERIN, I. *et al.* Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions.2002. PROTEINS, 47(4), 409-443

HANDSCHUMACHER, et al. Cyclophilin: A Specific Cytosolic Binding Protein for Cyclosporin A. SCIENCE , New Series, Vol. 226, No. 4674 (Nov. 2, 1984), pp. 544-547.

KAUR et al. Characterization of Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase- and Calmodulin-Binding Activity of a Cytosolic Arabidopsis thaliana Cyclophilin AtCyp19-3. PLoS One. 2015;10(8):e0136692. Published 2015 Aug 28. doi:10.1371/journal.pone.0136692.

KLEPEIS et al. AB initio prediction of the three-dimensional structure of a de novo designed protein: a double-blind case study. PROTEINS, V. 58, N. 3, P. 560-70, FEB., 2005.

KUMARI et al. Cyclophilins: proteins in search of function. PLANT SIGNAL BEHAV. 2013 Jan;8(1):e22734. doi: 10.4161/psb.22734. 2013

KUMARI, S. Expression of a cyclophilin OsCyp2-P isolated from a salt-tolerant landrace of rice in tobacco alleviates stress via ion homeostasis and limiting ROS accumulation. FUNCTIONAL & INTEGRATIVE GENOMICS. 2015 15. 395-412. 10.1007/s10142-014-0429-5.

LEVITT, M. Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching. J MOL BIOL, V. 226, N. 2, P. 507-33, JUL., 1992.

Li. et al, A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in Arabidopsis. PLANT CELL. 2007

MAGGIO et al. Recent developments in computational proteomics. TRENDS BIOTECHNOL. 2010 Jul;19(7):266-72.

MEINHARDT *et al.* Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. BMC Genomics. 2014;15:164. 2014

MAMEDOV, V. A. Quinoxalines: synthesis, reactions mechanisms and structure. Springer, Switzerland, 2016

MONZANI *et al.* Structural Analysis of Cyclophilin and Inhibitory Activity of Cyclosporin A on Germination and Growth of *Moniliophthora perniciosa*. Pharm Anal Acta S7:001. doi:10.4172/2153-2435.S7-001. 2011

NICOLAU JUNIOR, N. Diferenças estruturais e “docking” receptor-ligante da proteína e7 do vírus do papiloma humano (HPV) de alto e baixo risco para câncer cervical. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2013.

PHILLIPS-MORA, W. *ET AL.* Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. PLANT PATHOLOGY, V. 56: 911-922. 2007.

PHILLIPS-MORA, W. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. PHYTOPATHOLOGY, V. 97: 1644-1647. 2007.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. PROTEINS ENG, v. 12 n. 2, p. 85-94, Feb., 1999.

SANTOS FILHO O. A E ALENCASTRO R. B. Modelagem de proteínas por homologia. QUIM. NOVA, Vol. 26, No. 2, 253-259, 2003.

SCHEUFLER, C. *ET AL.* Structure of TPP domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp 70-Hsp90 multiple chaperone machine. CELL. 2000

SCHIENE-FISCHER, C. Multidomain Peptidyl Prolylcis/trans Isomerases. BIOQUIM. BIOPHYS. ACTA. 2015

SCHOONMAN, *et al.* Practical evaluation of comparative modelling and threading methods. COMPUT CHEM, V. 22, N. 5, P. 369-75, SET., 1998.

SCHWEDE. T. Protein modeling: what happened to the “protein structure gap”? VOLUME 21, ISSUE 9, 3 SEPTEMBER 2013, PAGES 1531-1540

SEKHON. *et al.* Structural and biochemical characterization of the cytosolic wheat cyclophilin TaCypA-1. ACTA CRYSTALLOGR. D BIOL. CRYSTALLOGR. 2013

SINGH, K. *et al.* Less studied proteins with critical roles in pathogenesis. REVIEW PHYTOPATHOLOGY. JUN 2017

TROTT, O., OLSON, A. J. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY 31 455-461

VIAUD. M. *et al.* A Magnaporthe grisea cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. THE PLANT CELL, VOL. 14, 917–930, APRIL 2002.

VIAUD. M. *et al.* Cyclophilin a and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin a inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. MOLECULAR MICROBIOLOGY, V. 50(5): 1451-1465. 2003.

VYAS, *et al.* Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2012

WALTERS, *et al.* 1998. Virtual screening – an overview. SCIENCE, 3(4), 160-178.

Capítulo 1

Caracterização estrutural da ciclofilina de *Moniliophthora roreri* e o estudo de seus possíveis inibidores

Fernanda de Souza Rangel ¹, Bruno da Silva Andrade ^{1,3}, Carlos Priminho Pirovani¹

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Centro de Genética e Biologia Molecular (CBG)

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Núcleo de Biologia computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas (NBCGIB)

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Laboratório de Biologia e Química Computacional (LBQC).

*Autor correspondente: Bruno da Silva Andrade, UESB, LBQC , Av José Moreira Sobrinho, Jequié, Bahia 45206-190, Brasil. E-mail: bandrade@uesc.br

Abreviaturas: MrCYPA: ciclofilina do *Moniliophthora roreri*, CYP: ciclofilinas, PPIase: peptidil prolil cis trans isomerase

Palavras-chaves: Ciclofilina, *Moniliophthora roreri*, Ciclosporina, Inibidores.

EXTRATO

Rangel, Fernanda de Souza. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro 2019. Caracterização estrutural da ciclofilina do *Moniliophthora roreri* e o estudo de seus possíveis inibidores. **Orientador:** Bruno da Silva Andrade **Co-orientador:** Carlos Priminho Pirovani

Palavras-chave: *Moniliophthora roreri*, ciclofilina A, ciclosporina A e inibidores

Moniliophthora roreri é o agente causal da monilíase no *Theobroma cacao*, árvore do chocolate. É um fungo basiodiomyceto hemibiotrófico, seletivo ao fruto da planta, onde as perdas podem chegar até 90% nas plantações. A ciclofilina A em é uma isomerase que em fungos é importante no processo de morfogênese, germinação de esporos e crescimento do tubo, considerada fundamental na virulência e patogenicidade. Sendo assim, mostrou-se ser um grande alvo em potencial para formulação de novos fungicidas. Em plantas, a Ciclofilina A parece apresentar funções ambíguas, atuando no mecanismo de defesa e tolerância ao estresse, assim como na ativação de efetores fitopatogênicos. Nesse estudo realizamos a modelagem molecular e minimização de energia da ciclofilina A de *Moniliophthora roreri* e *Theobroma cacao*, assim como uma triagem virtual por ligantes onde examinou 120 moléculas no banco de dados do ZINC Database, utilizando o farmacóforo da droga inibidora conhecida Ciclosporina A. Foi realizado também o estudo de acoplamento molecular baseado no ligante com quatro moléculas selecionadas, assim como o estudo de dinâmica molecular. A ciclofilina A de *moniliophthora roreri* também foi expressa em sistema heterólogo, e realizado teste de solubilidade. Foram encontradas três novas moléculas com menor peso molecular e com farmacóforo semelhante ao inibidor conhecido. As estruturas zinc 93, ZINC 83 e ZXJ 3 foram selecionadas com base na afinidade ser superior em comparação ao ligante conhecido. Na dinâmica molecular as interações pareceram ser estáveis e numerosas. Nossos resultados mostram que ZINC 83, ZINC93, ZXJ3 podem ser eficazes contra a isomerase Ciclofilina A de *M. roreri* e podem ser testadas *in vitro* e *in vivo* para desenvolver novos fungicidas.

ABSTRACT

Rangel, Fernanda de Souza. State University of Santa Cruz, Ilhéus, February 2019.

Structural characterization of the cyclophilin of *Moniliophthora roreri* and the study of its possible inhibitors. **Advisor:** Bruno da Silva Andrade **Co-advisor:** Carlos Priminho Pirovani

Key words: *Moniliophthora roreri*, cyclophilin A, cyclosporin A and inhibitor

Moniliophthora roreri is the causative agent of moniliasis in *Theobroma cacao*, tree of chocolate. It is a hemibiotrophic basidiomycete fungus, selected from the plant's fruit, where the alterations can reach up to 90% in the plantations. Cyclophylline A is an isomerase that, in fungi, is important in the process of morphogenesis, spore germination and tube growth, considered fundamental in virulence and pathogenicity. Thus, it proved to be a great potential target for the application of new fungicides. In plants, Cyclophylline seems to have ambiguous functions, acting in the defense mechanism and stress tolerance, as well as in the activation of phytopathogenic effectors. In this study, we performed the molecular modeling and energy minimization of cyclophilin A from *Moniliophthora roreri* and *Theobroma cacao*, as well as a virtual screening by ligands where we examined 200 molecules in the ZINC Database, using the pharmacopharyngeal drug known as Cyclosporine A. It was also carried out the study of molecular coupling based on the ligand with four selected molecules, as well as the study of molecular dynamics. Cyclophyllin A of *moniliophthora roreri* was also expressed in a heterologous system, and a solubility test was performed. Three new molecules with lower molecular weight and with a pharmacophary similar to the known inhibitor were found. The zinc 93, ZINC 83 and ZXJ3 structures were selected based on their higher affinity compared to the known ligand. In molecular dynamics the interactions appeared to be stable and numerous. Conclusion: Our results show that ZINC 83, ZINC91, ZXJ3 can be effective against the *M. roreri* cyclophilin A isomerase and can be tested in vitro and in vivo to develop new fungicides

1.INTRODUÇÃO

A monília do cacau é uma doença devastadora causada pelo fungo *Moniliophthora roreri* (Philips-Moura *et al.* 2007; Bailey *et al.* 2013). É endêmico da Colômbia, mas atualmente está em fase invasiva, onde países da América da sul, América Central e até América do Norte sofreram perdas com percentual de 30% até 90%. (Meinhard *et al.* 2014; Silveira, 2017) Por isso, mesmo ainda sendo considerado geograficamente limitante, há uma grande preocupação de *Moniliophthora roreri* invadir outros territórios, bem como chegar aos grandes produtores de cacau no mundo, promovendo um colapso no cultivo da árvore do chocolate. No Brasil, ele é classificado com uma praga quarentenária ausente e causa preocupação devido à localização dos países endêmicos fazer fronteira com o Brasil. (Barbosa *et al.* 2017)

O *Moniliophthora roreri* é um fungo basidiomiceto, hemibiotrófico, seletivo a dois gêneros da família Malvaceae, sendo eles *Herrania* e *Theobroma*, no qual infecta de maneira específica o fruto da planta (Evans *et al.* 2002, 2003). Seus esporos são produzidos em uma taxa de 44 milhões/cm² formando uma massa micelial, que se torna densa e pulverulenta, conhecida como pseudo estroma, onde não ocorre a formação de basidiomas (Silveira, 2017). A sua grande produção, juntamente com a alta resistência aumentam a capacidade infectante de alcançar novos territórios (Barbosa *et al.* 2018). Dispersados pelo próprio ambiente ou pelo homem o meiosporó tem acesso ao fruto através dos estômatos, ou qualquer outro tipo de abertura, colonizando o tecido no espaço intercelular onde se estabelece um período de latência 3 a 8 semanas. (EVANS, 1981). Nesse período com a hidrólise do tecido vegetal, aparecem os primeiros sintomas no fruto como formas irregulares, conhecida como tumefação (Pérez-Vicente, 2017) Logo após, nas regiões lesionadas dos tecidos infectados há a formação de manchas irregulares pardas, cor de chocolate, caracterizando a fase necrotrófica com hifas que invadem as células levando à necrose interna e externa e à morte dos tecidos infectados, e após poucos dias há o crescimento micelial branco creme e formação dos meiosporos, (Barbosa *et al.* 2018; Pérez-Vicente 2017)

As ciclofilinas constituem um subgrupo de proteínas chamada de Imunofilinas, na qual foram assim nomeadas devido à capacidade de se ligarem a compostos imunossupressores produzidos por fungos (Kumari *et al.* 2013). Elas são notoriamente conservadas nos organismos, principalmente em eucariotos. A maioria das ciclofilinas exibem atividade enzimática da PPIase, multiplicidade, diversas localizações e ativo papel no dobramento e maturação de proteínas. As ciclofilinas tem a capacidade de obter outros domínios além do

característico CLD (domain-like cyclophilin) e alguns trabalhos relatam a perda do mesmo durante o processo evolutivo. A ciclofilina A, além de atuar como isomerase no dobramento de proteínas, está relacionada com a formação de linfócitos T, uma vez que para iniciar esse processo é necessário a formação no complexo ciclofilina-calcineurina para que haja ativação de genes IL2 (Zhao et al. 2018).

Em fungos fitopatogênicos as ciclofilinas estão fortemente relacionadas com virulência e patogenicidade. Vários trabalhos tem relatado que em plantas infectadas com fungos mutantes para o gene ciclofilina, tem apresentado menos lesões quando comparadas com as selvagens, assim como o aumento da expressão do gene de ciclofilina no fungo no momento da infecção em plantas (Viaud et al. 2002). Acredita-se que o complexo ciclofilina-calcineurina é necessários na rota metabólica de lipídios do fungo, sendo esta essencial para a gênese de estruturas de infectantes (Singh et al. 2017).

Estudos com a droga de ação imunossupressora em humanos ciclosporina A, tem demonstrado interação com ciclofilina A de fungos fitopatogênicos, e tem confirmado a atividade inibitória da enzima. Em *Moniliophthora perniciosa*, teste com soluções de ciclosporina A inibiu 50 % o crescimento de vegetativo do fungo, fato que ocorreu também com *Magnaporthe grisea* (Viaud et al. 2002; Monzani et al. 2011,).

Em plantas, as ciclofilinas estão relacionadas com diversas funções e vias regulatórias, assim como amplas situações de estresse como por HgCl₂ etileno, alteração de temperatura, oscilação de luz, infecções por patógenos, e outras desconhecidas, onde a sua foldase, se caracteriza em ser essencial para resistência diante de situações adversas (Romano, 2004; Kumari et al. 2013)

No entanto, de forma ambígua, elas também tem se mostrado presentes em diversos processos patológicos incluindo infecção viral (Lin et al. 2012), artrite reumatoide (Kim et al., 2005), doenças cardiovasculares (Simone et al. 2019) e cânceres (Wang et al., 2017). Outro fator interessante que tem chamado a atenção de vários pesquisadores é a possibilidade de quando ao entrar em contato com efetores de fitopatógenos no citoplasma da célula vegetal, a ciclofilina induz uma mudança conformacional no efector, assumindo outra função no mesmo ambiente, contribuindo assim para o aumento de virulência e patogenicidade de fitopatógenos. Casos dessa natureza foram evidenciados com o efector VirD2 de *Agrobacterium tumefaciens* (Deng et al. 1998) e AvrGf2 de *Xanthomonas fuscans* (Gothetz et al. 2016)

Diante desse contexto, acreditamos que trabalhar com Ciclofilinas é desafiador, uma vez que a sua multiplicidade de atuações dificulta compreender de forma profunda seus mecanismos (Docena, 2006). A ciclofilina A do *Moniliophthora perniciosa* está relacionada com a patogenicidade e virulência do fungo, atuando no crescimento de hifas, formação de micélio e desenvolvimento estrutural de basidiósporos (Manzoni, 2010). No entanto, por não haver pesquisas anteriores sobre ciclofilina em *Moniliophthora roreri*, o nosso trabalho se torna pioneiro nessa vertente, e tem como objetivo encontrar novos inibidores sintéticos e ou naturais de ciclofilina A que possuam características químicas superiores quando comparada ao inibidor conhecido. Para melhor compreender a interação da enzima – receptor, elucidar as estruturas tridimensionais da MrCYPA e TcCYPA é uma das etapas fundamentais desse estudo, assim como averiguar se os novos ligantes encontrados também possuem afinidade pela ciclofilina do *Theobroma cacao*. Para alcançar esses objetivos uma série de metodologias moleculares foram empregas como expressão de proteína recombinante em sistema heterólogo, espectrometria de massas, modelagem por homologia, *docking* e dinâmica molecular.

Em suma, ao final desse estudo visamos propor novas moléculas com potencial fungicida aptas para prosseguirem com testes *in vitro* e *in vivo* no intuito de atuarem como novas perspectivas no controle da monília, causada por *Moniliophthora roreri*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análises *in silico* da MrCYPA

A sequência fasta dos resíduos de aminoácidos da ciclofilina A do *Moniliophthora roreri* foi obtida no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), (Meinhard *et al.* 2014) e denominada como MrCYPA. Posteriormente utilizando o servidor Sinal P 4.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.* 2011) verificamos se a sequência havia peptídeo sinal. O Compute Pi/Mw-ExPasy foi utilizado para realizar predições referentes ao ponto isoelétrico e peso molecular (https://web.expasy.org/compute_pi/) (Gasteiger *et al.* 2005). A análise no InterPro foi utilizada para identificar domínios conservados característicos da família na qual a proteína em estudo está inserida (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/about.html>) (Michel *et al.* 2019)

2.2 Modelagem por homologia da MrCYPA

Inicialmente foi feita uma busca por proteínas homólogas, utilizando sequências de aminoácidos da MrCYPA depositadas no NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Elas foram selecionadas de acordo com a confiabilidade da anotação e grau de identidade com

proteínas homólogas, que foram analisadas através de alinhamentos simples e múltiplos no BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), T-coffee (<http://tcoffee.vitalit.ch/apps/tcoffee/do:regular>) (Di Tommaso *et al.* 2011) e ClustalW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sieveres *et al.* 2011). Para a construção do modelo utilizamos o software *Swiss-Model workspace* (<https://swissmodel.expasy.org/>) (schwede *et al.* 2003). Em seguida a estrutura proteica da MrCYPA foi refinada através do pacote AMBER 14 (Case *et al.* 2013) e validada usando os programas QMEAN (schwede *et al.* 2003), ANOLEA (Melo *et al.* 1997) e Procheck (Laskowski *et al.* 1993).

2.3 Screening virtual

A partir da revisão bibliográfica, foram obtidas as estruturas de 19 inibidores de uma cicloflina homóloga (CYP J), descritos por Zhao (2018), que posteriormente foram desenhadas em 3D no software Marvin Sketch 18.10 (ChemAxom) e salvas no formato mol2. Em seguida, para gerar o farmacóforo, utilizamos o PharmaGist (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>) (Schneidman-Duhovny *et al.* 2008), onde selecionamos 3 inibidores dos 19 sintetizados por Zhao *et al.* (2018), para serem os ligantes de entrada e moléculas chave. Estes, por sua vez, tiveram capturadas suas interações favoráveis conhecidas entre o ligante e receptor alvo. Logo, levando em consideração características como: (I) anel aromático, (II) doador/receptor de ligações de hidrogênio, (III) carga (ânion/cátion) e (IV) hidrofobicidade, o algoritmo gerou candidatos a farmacóforos. Por fim, após escolher o melhor farmacóforo, o arquivo de alinhamento no formato mol2 foi gerado e submetido na ferramenta ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu/>) (Koes e Camacho. 2012), onde uma lista de 100 moléculas sintéticas, com características químicas semelhantes aos inibidores de entrada, foi disponibilizada.

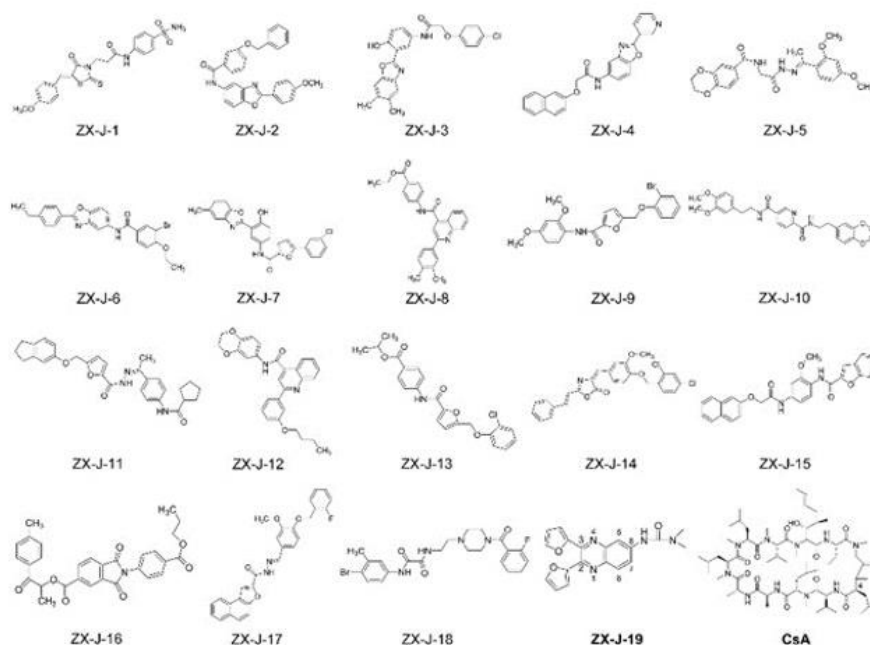


Figura 1 Inibidores de Ciclofilina J sintetizados por Zhao e colaboradores (2018). ZJX 16, ZXJ 17 e ZXJ 18 foram utilizadas nesse estudo como moléculas de entrada para gerar o farmacóforo, e as demais foram utilizadas no estudo de *docking* molecular.

2.4 Docking Molecular

Para realizar o *docking* as moléculas do ligante e receptor foram preparadas utilizando o software AutoDock tools. Logo, Iniciamos o processo com a adição de átomos de hidrogênio ao receptor para computar o seu estado de protonação. Posteriormente, geramos a grid box indicando as coordenadas do sítio ativo, que foram desenhadas de acordo com ciclofilinas homólogas resolvidas por cristalografia descrito por (Monzani *et al.*2013) e (Zhao et al2018). Em seguida, os ligantes e receptor foram salvos em formato pdbqt. Para o cálculo do *docking* usamos o AutoDock Vina (Trot e Olson, 2010), onde gerou 9 posições de *docking* para cada ligante com o sítio da MrCYP e seus valores de energia de afinidade. As posições do *docking* foram avaliadas usando o Pymol 2.0 (Schrödinger, 2018) e Discovery Studio 4.5 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017) para selecionar a melhor posição de cada ligante com o sítio da MrCYPA. Para isso foi considerada a energia de afinidade entre o ligante e o receptor, bem como a interação dos ligantes com os aminoácidos do sítio ativo e o desvio médio quadrado (RMSD). Por último, checamos as ligações de hidrogênio e interações não covalentes para cada complexo de acordo com mapa 2D.

2.5 Modelagem por homologia da Ciclofilina A do *Theobroma cacao*-TcCYPA

A estrutura 3D da TcCYPA foi elucidada por modelagem por homologia, onde inicialmente realizamos uma busca por sequências de aminoácidos da TcCYPA no NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>). Em seguida utilizando o BLAST P (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) realizamos uma busca por sequências de proteínas homólogas com estrutura tridimensional resolvida por cristalografia ou ressonância magnética nuclear com maior percentual de identidade de cobertura com a sequência em estudo. Esses scores foram analisados utilizando programas on line de alinhamentos múltiplos como T-coffee (<http://tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/do:regular>) e Clustal ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Em seguida, a estrutura tridimensional da Ciclofilina A de *Citrus sinensis* código de acesso 4jjm.1.A (<https://www.wwpdb.org/>) foi utilizada como molde para a construção do modelo 3D da TcCYPA. Para a construção do modelo utilizamos o software *Swiss-Model workspace* (<https://swissmodel.expasy.org/>). Por fim, a estrutura proteica da MrCYPA foi minimizada através do pacote AMBER 14 (Case *et al.* 2013) e validada usando os programas QMEAN (schwede *et al.* 2003), ANOLEA e Procheck.

2.6 Dinâmica Molecular

Os processos de minimização de energia da TcCYPA e MrCYPA e dinâmica molecular de estabilidade MrCYPA-ligantes, foram realizados utilizando o campo de força AMBER 14 (Case *et al.* 2013). Ele é constituído por um pacote de programas especializados em simulação e otimização de biomoléculas e sistemas orgânicos. No primeiro passo, utilizamos um dos programas inseridos no AMBER, o “tLEaP” para gerar os arquivos de topologia, coordenadas e solvatação das proteínas estudadas. Logo, as proteínas foram submetidas ao campo de força ff14SB no intuito de estabelecer as interações e distância dos átomos ligados e não ligados, com cutoff de 7Å. O processo de refinamento da MrCYPA e TcCYPA ocorreu através do programa “SANDER” (Pearlman *et al.* 1995), onde, as moléculas iniciais foram submetidas a uma minimização prévia, que consistiu em encontrar a melhor conformação de cada molécula na superfície de energia potencial através dos algoritmos Steepest Descent e, posteriormente, Gradiente Conjugado. Esse processo utilizou imin=1 para otimização da estrutura, e 5000 ciclos de steepest descent e 5000 ciclos de gradiente conjugado. Em seguida foram realizados cálculos de Dinâmica Molecular (DM) através de uma simulação na qual as moléculas foram aquecidas

a 300 K, por 300 ps. Todos os cálculos de refinamento e Dinâmica Molecular utilizaram a constante de Coulomb padrão do AMBER.

2.7 Expressão da MrCYPA em sistema Heterólogo

O DNA recombinante foi adquirido pela empresa GENONE, onde a ORF sintética foi inserida no vetor pET28a, com sítios de restrição *NcoI* e *XhoI*, o plasmídeo recombinante foi inserido por choque térmico em células competentes da estirpe de *E. coli* Rosetta (DE3), conforme Sambrook *et al.*, (1989). Em seguida, a estirpe bacteriana transformada foi cultivada em meio LB (Luria-Bertani) e incubada a 37 °C sob agitação em 180 rpm até atingir a OD 600 (densidade ótica) ηm de ABS. Posteriormente, a expressão foi induzida com adição de 0,4 mmolL⁻¹ de IPTG (Isopropil beta-D-tiogalactosídeo) em temperatura distintas, onde uma foi a 37 °C e outra a 18 °C, ambas no tempo de 0 até 10 horas. Após a etapa de indução a cultura de células foi centrifugada a 14000rpm e o precipitado ressuspense com tampão de ligação e lisozima 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ por 30 min. Esse extrato total de bactéria foi sonificado por 20 s intercalado com 30 s de repouso no gelo, utilizando amplitude 70 % em ultrassonicador (Pgex 30), promovendo o rompimento total das membranas. O material lisado foi centrifugado à rotação de 14000 rpm, 4°C por 20 min, tanto o sobrenadante quanto o pellet foram utilizados para identificação por espectrometria de massas testes de expressão e solubilidade em SDS-PAGE.

2.9 Análise da MrCYPA por Espectrometria de Massa

Inicialmente para a análise dos peptídeos da MRCYPA, através do espectrômetro de massas, foi realizada a digestão das bandas de proteínas presentes no gel 1-D SDS-PAGE 12%. Para isso o primeiro passo realizado foi o recorte do gel contendo a banda referente a MrCYPA e logo depois esse gel contido no tubo foi lavado 3 vezes sob centrifugação com 200 μL da Solução B (25 mM NH₄HCO₃ em 50% de Acetonitrila-ACN), descartando o sobrenadante. Em seguida o gel foi lavado sob centrifugação com 200 μL de água MiliQ, deixando em repouso por 5 min, após acrescentou-se 25 μL da solução D (10mM DTT- 1,4 Dithiothoreitol- em 25mM NH₄HCO₃), o suficiente para cobrir o gel no tubo. Posteriormente, agitou-se rapidamente em vortex e deixou-se o tubo sob incubação por 1h na temperatura de 56°C. Após esse tempo, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 25 μL da Solução E (55mM de Iodoacetamida), em seguida, deixou-se sob agitação por 45 min à temperatura ambiente, no escuro, e retirou-se o sobrenadante. Logo depois, o gel contendo a proteína foi lavado novamente 3 vezes com a

Solução B, sendo que a cada lavada foi retirado o excesso da solução. O gel foi lavado com mais 200 µL de água MiliQ, descartando-se o sobrenadante. Após, acrescentou-se 100 µL de acetonitrila 100 % para a desidratação completa do gel, deixando por 5 min à temperatura ambiente, retirando posteriormente o excesso do reagente. Após esse procedimento, o tubo foi colocado no Speed Vac por 20 minutos para a secagem total do gel. Posteriormente, o gel foi reidratado com uma solução de tripsina gelada, sendo submetido a incubação de 4 °C por 10 min. Logo após, foi adicionado a solução A, até a cobertura completa do gel. O próximo passo foi incubar a 37 °C por 16 horas para a obtenção dos peptídeos. No dia seguinte, o sobrenadante contendo a digestão foi transferido para um tubo limpo, adicionado 50 µL da solução C (50% de ACN em 5% de Ácido fórmico) e agitou-se o tubo durante 30 minutos, suavemente. Para finalizar, o volume do sobrenadante foi reduzido para até 15 µL em Speed Vac. Logo após, a amostra aplicado em *vials* para posterior análise dos peptídeos no espectrômetro de massas. Os resultados foram analisados utilizando a ferramenta MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com) para identificação dos peptídeos analisados.

3. RESULTADOS

3.1 Análise da sequência de MrCYPA

A sequência da Ciclofilina A do fungo *Moniliophthora roreri* foi identificada no trabalho de Meinhardt *et al.* (2014), no qual o genoma e transcriptoma do fitopatógeno foi sequenciado. A análise dessa sequência revelou uma ORF de 537 pb, codificando uma proteína de 179 aminoácidos, com massa molecular e ponto isoelétrico de 19,3 kDa e 9.56 respectivamente. A análise da sequência no Signal P não indicou a presença de peptídeo sinal, nem regiões desordenadas. Uma predição realizada no InterPro identificou o domínio CLD conservado na sequência MrCYPA, característico das peptidil prolil cis-trans isomerase, iniciando no aminoácido 22 até o 178, totalizando 157 resíduos (Figura 2 e 3)

MrCYPA	{	MASFLRRFASTASTAANKANVFFDIAVNSQPAGRIVFKLYDDAVPRTAKNFREL
		ATGOHGFGYVGSSFHRIIPNFMVQGGDFTNHNGTGGKSIYGDKFPDENFKFKHS
		KPGLLSMANAGPNTNGSQFFITTVVTSWLDGRHVVFGEVVEGMDVLKNEAGS
		EGGKPKQKVTVTSSGTV

Figura 11 Sequência de aminoácidos da MrCYPA. Em cinza os resíduos correspondentes ao sítio ativo, em sublinhado os resíduos correspondentes ao domínio PPIase. (Predição InterPro)

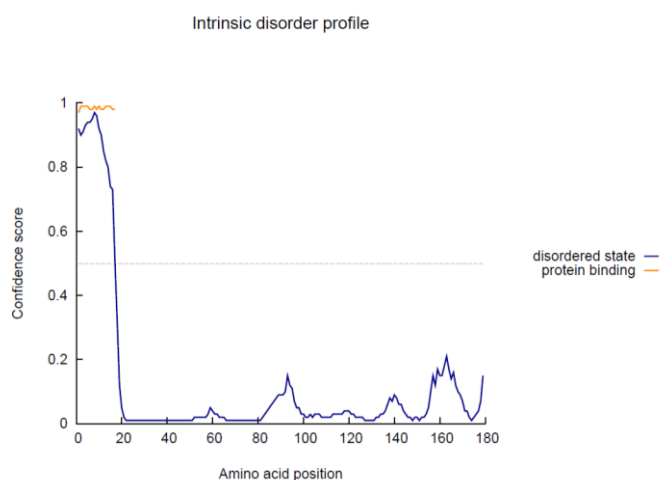


Figura 12 Predição de regiões intrínsecamente desordenadas da MrCYPA

3.2 Modelagem da MrCYP

Inicialmente foi realizada uma busca no NCBI por sequências de ciclofilinas A do fungo basidiomiceto *Monilophthora roreri*, com a finalidade de montar um pequeno banco de dados. Nessa fase foram baixadas 150 sequências, das quais foram excluídas as anotações hipotéticas, não publicadas, repetidas e com tamanho maior de 215 resíduos de aminoácidos. Em seguida, alinhamos as nove sequências mais completas com a sequência da ciclofilina A do fungo *Moniliophthora perniciosa* (MpCYPA), utilizado nesse trabalho como molde para a modelagem por homologia da MrCYPA, com código PDB 3O7T. Nessa etapa, a sequência ESK90674.1 adquiriu cobertura de 100% e identidade de 72%, sendo essa a escolhida para a construção do modelo 3D da MrCYPA.

Código de acesso aminoácidos	Descrição	Nº de	Cobertura	Identidade
ESK90674.1	Cyclophilin <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	179	100%	72%
ESK87056.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	161	95%	83%
ESK96655.1	Hypothetical protein Moror_6875 <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	172	53%	96%
ESK96551.1	Peptidyl-prolyl isomerase b <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	219	98%	60%
KTB42597.1	Hypothetical protein WG66_4803 <i>Moniliophthora roreri</i>	172	76%	52%
ESK93852.1	Peptidyl-prolyl isomerase b <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	220	96%	57%
ESK87069.1	Hypothetical protein Moror_11950 <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997	248	100%	35%
KTB29748.1	Hypothetical protein WG66_17627 <i>Moniliophthora roreri</i>	203	95%	40%
KTB27846.1	Hypothetical protein WG66_19633 <i>Moniliophthora roreri</i>	169	45%	73%

Tabela 1. Lista das proteínas alinhadas com as sequências de Ciclofilinas A de *Moniliophthora roreri* e *Moniliophthora perniciosa*.

O modelo 3D da MrCYPA apresenta um β -barril monomérico, formado por oito folhas beta antiparelas, 2 alfa-hélices, sendo uma em cada extremidade do barril (Figura 4), na qual as estruturas que correspondem ao β -barril são extremamente conservadas, havendo divergências um pouco mais acentuadas nas áreas de loops. O alinhamento feito no T-coffee mostrou identidade entre a MrCYPA e seu molde cristalográfico MpCYPA de 90% e cobertura de 89%. No Alinhamento estrutural realizado no Pymol, o RMSD foi de 0.543 Å, valor que demonstra mínimas diferenças entre o molde-modelo.

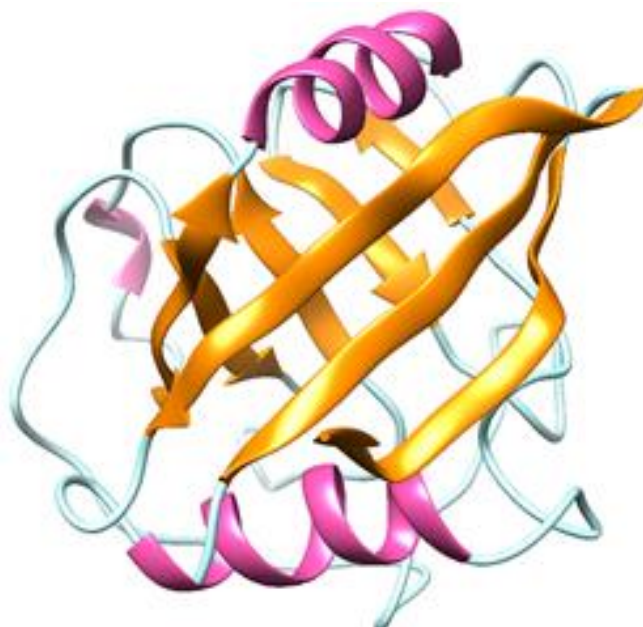


Figura 13 Estrutura tridimensional da MrCYPA apresentando alfa-hélices (rosa), beta-barril de folhas beta (laranja) e os loopings (azul).

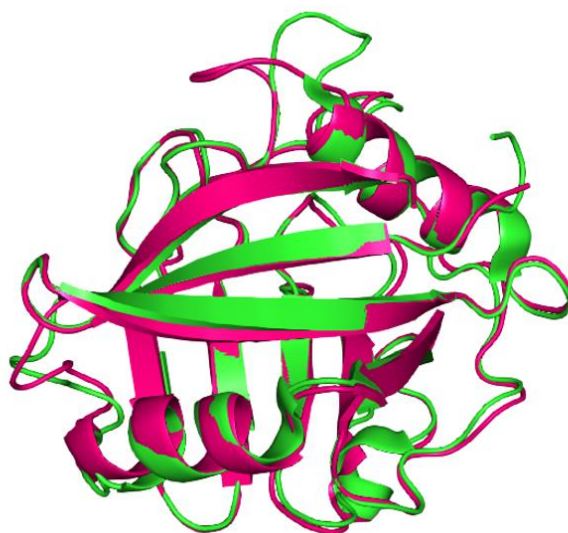


Figura 14 Alinhamento estrutural entre MrCYPA- modelo (rosa) e MpCYPA- molde (verde).

O sítio ativo da MpCYPA foi descrito por Monzani e colaboradores (2011), sendo composto pelos resíduos de aminoácidos ARG 53 , PHE 58, MET 59, GLY61, GLY 63, ASN 69, GLY 72, TRP 119, LYS 143, ALA 146, onde todos estão localizados no domínio PPIase, que inicia na PHE 22 e termina na VAL 179. Ambos apresentaram grande similaridade com sítio e domínio MrCYPA, apresentando algumas divergências na qual os resíduos ALA 146 e LYS 143 foram substituídas por GLU e GLN respectivamente. O sítio da MrCYPA mostrou-

se rico em aminoácidos hidrofóbicos, onde se destaca a presença do resíduo glicina em várias posições, como 102, 70, 148 e 147. Outros aminoácidos com a mesma característica foram visualizados, como ALA 101, ILE 55, HIE 124 e o resíduo aromático TRP 119. Aminoácidos polares também constituem o sítio ativo, como a ARG 53, ASN 100 e GLU 146. Em uma análise da superfície molecular da MrCYPA podemos visualizar uma extensa cavidade de hidropaticidade localizada em região de interação com ligantes.

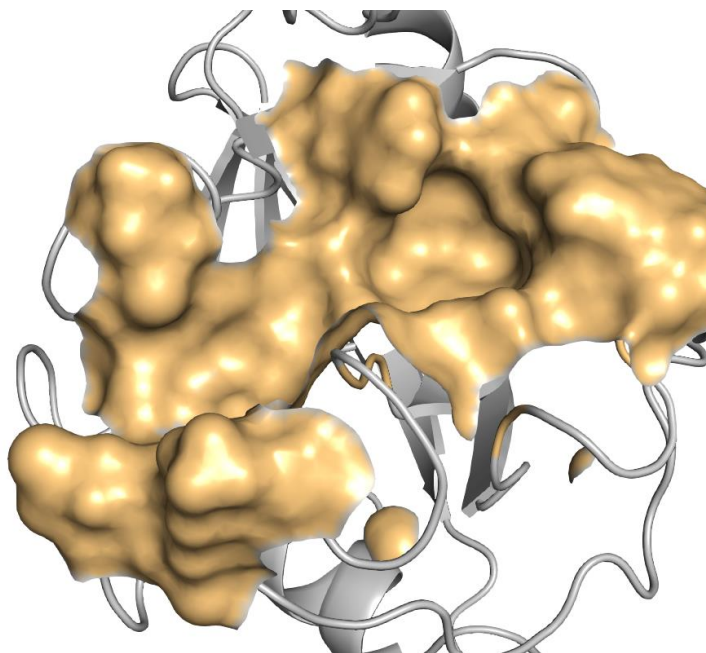


Figura 15 Representação em superfície do sítio ativo da MrCYPA, detalhando sua cavidade hidrofóbica

Os scores QMEAN e Local Quality Estimete (dados suplementares) foram de 1.45, e 0,8 respectivamente, demonstrando que o modelo construído está com nível de qualidade igual ou superior as estruturas proteicas resolvidas por métodos experimentais. Entretanto, mesmo com qualidade satisfatória, após a modelagem, a cadeia foi submetida a simulação de dinâmica molecular, para otimizar a geometria espacial dos aminoácidos. Adicionalmente, a estrutura da proteína foi validada usando os programas PROCHEQ e ANOLEA (Figura 7). O diagrama de Ramachandran mostrou que 86.8% dos resíduos estão em regiões muito favoráveis, 13.2% em regiões permitidas, não havendo resíduos em regiões generosamente permitida e não permitida. No ANOLEA, a maioria dos resíduos apresentaram valor de entropia negativo (verde) e poucos resíduos com valores positivos(vermelho).

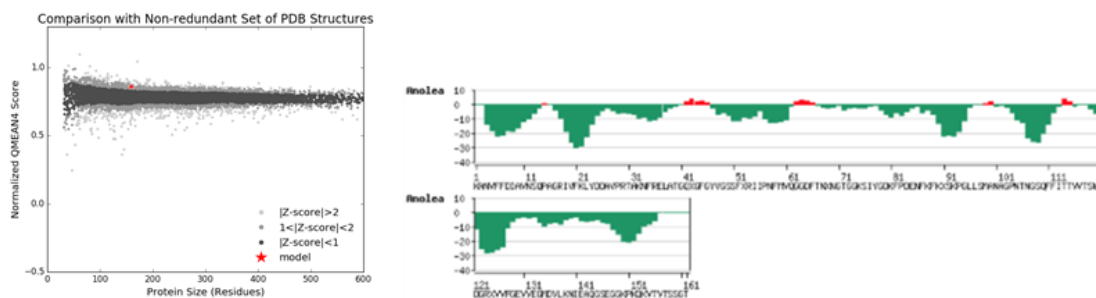


Figura 16 Validação do modelo MrCYPA. I-) QMEAN mostrando que a qualidade do modelo da Ciclofilina A do *Moniliophthora roreri* está superior quando comparada com proteínas com a mesma quantidade de aminoácidos resolvidas por métodos experimentais II-) ANOLEA Predição de energia livre dos resíduos de aminoácidos .

3.3 Modelagem da estrutura 3D da Ciclofilina A do *Theobroma cacao*

O modelo do TcCYPA foi elucidado, utilizando o Software Swiss Model Workspace, onde apresentou em sua estrutura tridimensional um beta barril monomérico, formado por oito folhas beta antiparelas, 2 alfa-hélices, tendo uma em cada extremidade do barril (Figura 18). O alinhamento feito no T-coffe mostrou identidade entre a TcCYPA e seu molde cristalográfico ciclofilina de *Citrus sinensis*, com código PDB 4JJM (CsCYPA) de 67% e cobertura de 72%. No Alinhamento estrutural realizado no Pymol, o RMSD (derivação da raiz quadrada média) foi de 0.72 Å, valor que demonstra mínimas divergências entre o molde-modelo.

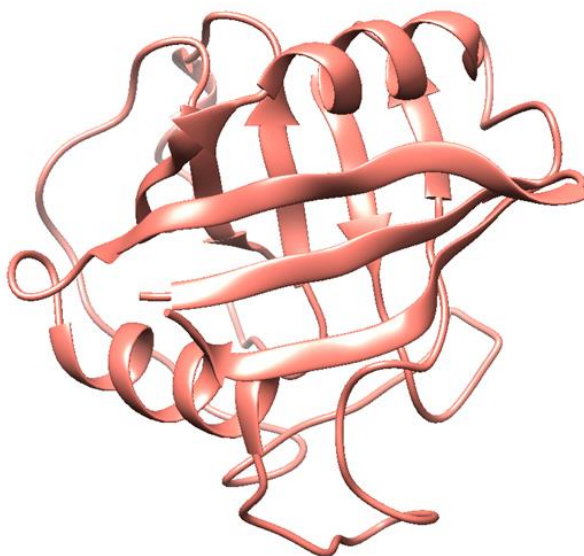


Figura 17 Estrutura tridimensional da TcCYPA, construída a partir do molde CsCYPA.

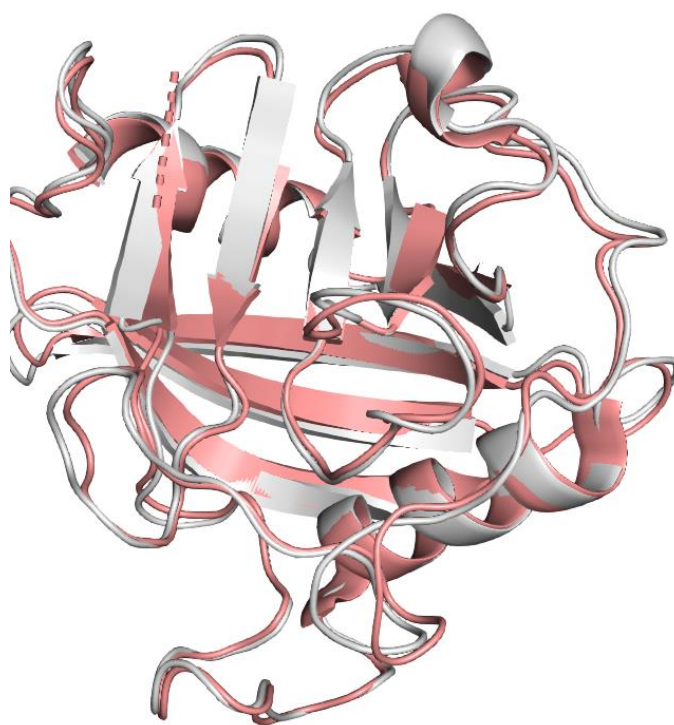


Figura 18 Alinhamento estrutural entre TcCYPA (cinza) e CsCYPA (rosa).

O QMEAN foi de 1.21 e GMQE de 0.72, demonstrando uma alta qualidade do modelo construído, podendo ser comparado com as melhores estruturas resolvidas por métodos experimentais. Mesmo assim, para aperfeiçoar a acurácia da estrutura tridimensional da TcCYPA, ela foi submetida a uma dinâmica molecular onde regiões com alta energia livre nos átomos que constituem a cadeia foram minimizados. Logo após, o modelo foi mais uma vez validado utilizando o Procheck, onde de acordo com o gráfico de Ramachandran 84% dos resíduos estão em região muito favorável, 15% em regiões e 0.8% em região desfavorável, na qual corresponde ao GLU 84.

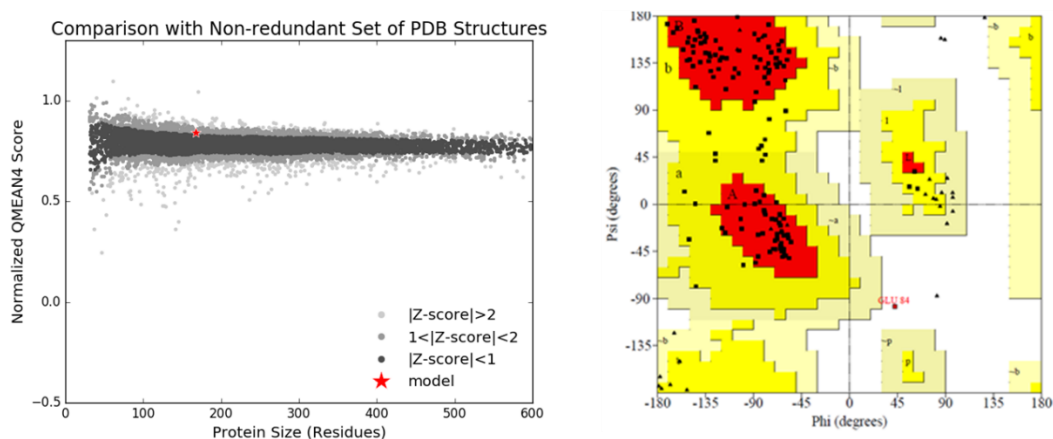


Figura 19 Validação do modelo TcCYPA. QMEAN e Procheck

3.4 Identificação da alça divergente na TcCYPA

Após realizarmos alinhamento múltiplo e estrutural entre as sequências MrCYPA, MpCYPA e TcCYPA, foi visualizado uma alça divergente na TcCYPA localizada no 94*GNSGKRL*101.

TcCYPA	MATKTRVVSVAVLWILVLFGLTLALIQNRLSDAGISEPKLNQVVEDDSEEVTHKVYFDVQI	60
MpCYPA	-----SHMANVFFNISI	12
MrCYPA	-----MASFLRRF-----ASTASTAANKANVFDDIAV	27
	:*:::	
TcCYPA	DGKSAGRIVMGLFGKTVPKTAENFRALCTGEKGTGNSGKRLHYKGSTFHRIIPSFMIQGG	120
MpCYPA	NDKPEGRIVFKLYDEAVPKTAKNFRELATGQHGF-----GYKDSIFHRVIPQFMLQGG	65
MrCYPA	NSQPAGRIVFKLYDDAVPRTAKNFRELATGQHGF-----GYVGSSFHRIIPNFMVQGG	80
	::: ****: *:..*:**:* **.*:*	
TcCYPA	DFTRGDGRGGESIYGEKFADENFKLKHDPGLLSMANGGPDNGSQFFITTVTTSWLDGR	180
MpCYPA	DFTRHNGTGGKSIYGEKFADENFQVKHTKPGLLSMANAGANTNGSQFFITTVPTSWLDGK	125
MrCYPA	DFTNHNGTGGKSIYGDKFPDENFKFKHSPGLLSMANAGPNTNGSQFFITTVTTSWLDGR	140
	. :* **:*:**:* **.*:* **.* :***** **.*:	
TcCYPA	HVVFGKVLAGMDVVYKIEGEGRHSGVPSKVVIVDSGEMPI	221
MpCYPA	HVVFGEVIEGLDIVRKVEGKGSASGKTNATIKITDCGTV--	164
MrCYPA	HVVFGEVVEGMDVLKNIEAQSGEGKPKQKVTVTSSGTV--	179
	*****:* *:*: :*:.* .* :.: :...:	

Figura 20 Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos MpCYPA, MrCYPA e TcCYPA.



Figura 21 Alinhamento estrutural entre MpCYPA, MrCYPA e TcCYPA. Identificação de alça divergente em TcCYPA

3.3 Screening virtual

Zhao e colaboradores (2018) sintetizaram 19 inibidores de ciclofilina para humanos no qual o farmacóforo foi baseado no inibidor conhecido de Ciclofilina, chamado de Ciclosporina A. Devido essa similaridade e por terem um baixo peso molecular, utilizamos em nosso Screening virtual três estruturas das dezenove, sendo estas ZXJ17 ZXJ18 ZXJ19, para serem as moléculas de entrada no PharmaGist. As suas características físico-químicas responsáveis pela interação com o receptor, como a) grupo aromático, b) doadores e aceptores de hidrogênio e c) hidrofobicidade, podem ser visualizadas na tabela 2. Diante dessas propriedades, todas as interações possíveis para cada inibidor foram pontuadas e submetidas a um alinhamento, no qual geraram 6 possíveis grupos farmacofóricos. O melhor grupo obteve um score de 12.12, com um grupo aromático, no qual foi equivalente a um grupo hidrofóbico, três grupos doadores e umceptor de H. Logo, este foi o escolhido por possuir de fato o maior número de características relevantes para interação. Em seguida, baseado no farmacóforo obtido foi realizada uma busca no banco de dados ZINC database, onde 100 moléculas com propriedades similares foram disponibilizadas.

	Aromáticos	Hidrofóbicos	Doadores de H	Aceptores deH
ZXJ 17	2	8	3	4
ZXJ 18	1	4	5	4
ZXJ 19	1	3	3	5

Tabela 2- Características físico químicas dos inibidores de entrada que possibilitam a interação molecular com receptor

3.5 Estudo de *Docking* entre MrCYPA e ligantes ZXJ3, ZINC83, ZINC93 e Ciclosporina A

Além dos inibidores adquiridos pelo screening virtual, o estudo de *docking* molecular ocorreu com todas as novas moléculas sintéticas descritas por Zhao et al (2018), incluindo também nesse processo os inibidores clássicos de Ciclofilinas, como a Ciclosporina A, Alisporivir e NIM811, totalizando 122 ligantes. Dentre esses, os 10 que apresentaram melhor energia de afinidade no *docking*, foram selecionados e classificados como TOP10. As moléculas inseridas nesse grupo foram ZXJ 3, ZINC 58, ZINC 60, ZINC 61, ZINC 79 ZINC

83, ZINC 90, ZINC 91, ZINC 93 e ZINC 99. Em seguida, analisamos as interações entre receptor-ligante dos TOP 10 e selecionamos os ligantes ZXJ 3, ZINC 83, ZINC 93 para prosseguir com as análises, por possuir maior número de interações e melhor energia de afinidade.



Figura 22 Inibidores selecionados com maior energia de afinidade, ZINC 93, ZINC 83 e ZXJ 3

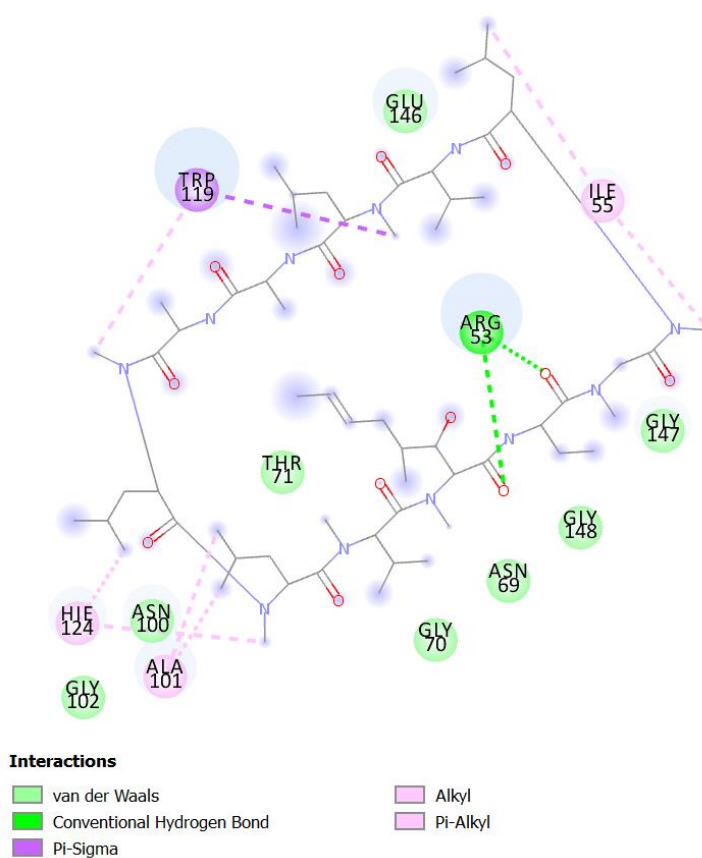


Figura 23 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos MrCYP A e Ciclosporina A

No estudo de *docking* entre a ciclosporina A e a MrCYPA, podemos observar 13 interações com resíduos de aminoácidos do sítio ativo, em que energia de afinidade foi de -5.8 Kcal/mol. O TRP 119 interagiu no C 53 do ligante através de uma ligação Pi sigma, o mesmo anel aromático interagiu com o C 46 através de uma ligação Pi-Alkyl. A ALA 101 fez duas interações, uma com o radical terbutil e outra no C 39 próximo ao grupamento amina da ciclosporina. A ARG 53 apresentou duas ligações de hidrogênio, ambas realizadas com grupamento amidas, sendo uma com o oxigênio 11, e outra com o Oxigênio 01. As interações de Van der Waals ocorreram em maior número, localizadas nos resíduos ASN 100, GLY 102, GLY 70, ASN 69, GLY 148, GLY 147, THR 71 e GLU 146.

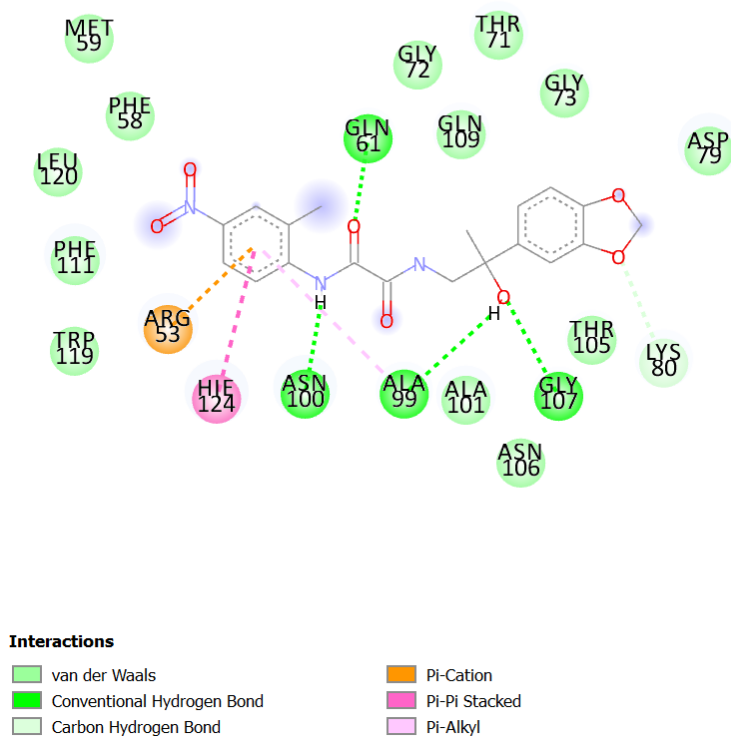


Figura 15 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos MrCYPAe ZINC 83

O ligante ZINC 83 realizou 20 interações com resíduos de aminoácidos do sítio MrCYPA e a energia de afinidade foi de -8.2 Kcal/mol. A GLN 61 realizou uma ligação de com oxigênio com do grupo cetona do ligante, a ASN 100 também interagiu através uma ligação de hidrogênio de um grupo amina, GLY 107 foi doador de elétrons na formando ponte de hidrogênio para um dos grupos álcool de ZINC83. A ALA 99 realizou dois tipos de interações; uma atuou como aceptora de hidrogênio a partir do grupo álcool do ligante, e outra

efetuou uma interação de caráter hidrofóbico do tipo Pi-alkyl com um anel aromático do ligante. O grupamento amina da ARG 53 realizou uma interação eletrostática do tipo Pi-cátion com um dos anéis aromáticos do ligante e a HIE 124 interagiu com o anel aromático através de ligação Pi-Pi stacking. Os resíduos MET 59, PHE 58, GLY 72, GLN 109, THR 71, GLY73, ASP 79, THR105, ASN 106, ALA101, TRP119, PHE 111, LEU 120 realizaram interações de Van der Waals.

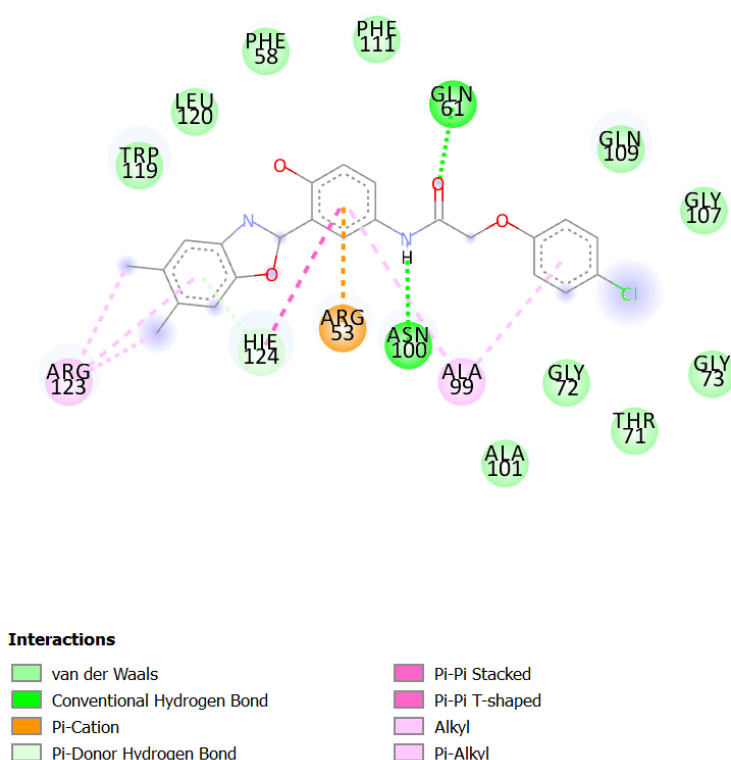


Figura 24 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos MrCYPA e ZINC 93

O ligante ZINC 93 interagiu com 16 resíduos de aminoácidos do sítio da MrCYPA da e obteve energia de afinidade de -8,6 Kcal/mol, da seguinte maneira: a GLN 61 interagiu como aceptora de hidrogênio com um dos grupamentos amidas do ligante, a ASN 100 também interagiu com O 1 do grupamento amina. A ALA 99 realizou duas interações hidrofóbicas do tipo Alkyl com dois anéis aromáticos do ligante. A ARG 123 também realizou três ligações hidrofóbicas, uma com o anel aromático e duas com dois radicais metil ligado ao mesmo anel aromático. A resíduos de aminoácidos ALA 101, GLY 72, THR 71, GLY 73, GLY 107, GLN 109, PHE 111, PHE 58, LEU 120 e TPR 119 realizaram interação de Van der Waals em diversos pontos apolares do ligante.

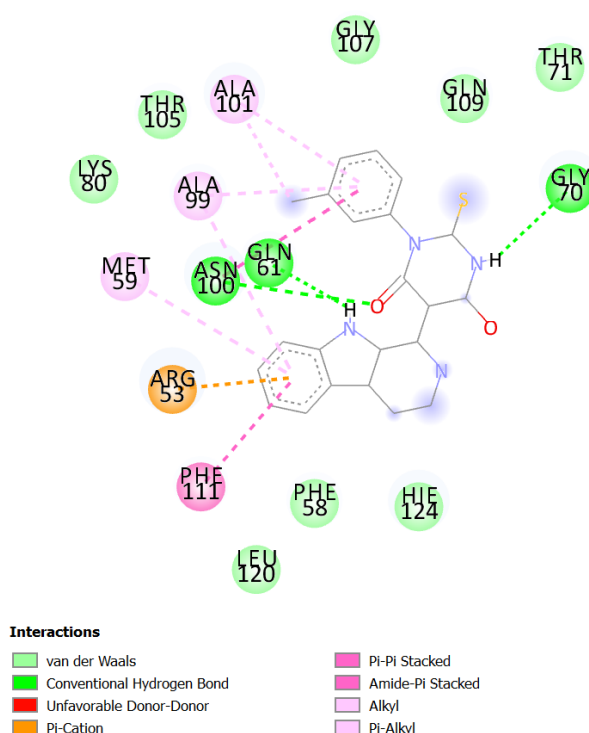


Figura 17 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos MrCYPA e ZJ3

O ligante ZJ3 interagiu com 16 resíduos de aminoácidos localizados no sítio da MrCYPA e a energia de afinidade foi de -8,5 Kcal/mol. A ASN 100 interagiu com o H 8 do grupamento amida, a GLN61 com um grupo amina e GLY 70 com outro grupamento amina do ligante, todas elas por ligação de hidrogênio. Por sua vez, a ARG 53 efetuou uma interação eletrostática do tipo Pi-cátion com anel aromático. MET 59, ALA 99 e ALA 101 interagiram com o ligante através de ligações hidrofóbicas com o anel aromático do tipo Pi- Alkyl. A PHE111 realizou ligação hidrofóbica do tipo Pi- pi stacked. Foram realizadas diversas interações de Van der Waals com os resíduos de aminoácidos LEU 120, PHE 58, HIE 124, THR 71, GLN 109, GLY107, THR 105, LYS 80.

3.6 Estudo de Dinâmica de estabilidade entre MrCYPA e ligante ZINC 83

A análise de dinâmica de estabilidade (DE) foi realizada entre a MrCYPA e o ligante ZINC 83. Em seguida foram gerados os gráficos de RMSD, RMSF (desvio da raiz média de flutuação) e ligações de hidrogênio, descrevendo a estabilidade do complexo estudado. Na figura 21, podemos observar o desempenho do complexo MrCYPA-ZINC83, no qual o RMSD nos primeiros 10000 ps ocorreu um distanciamento de aproximadamente 0,1 nm, seguido de um momento de oscilação no tempo de 10000 até 16000 ps, onde a partir dessa “frame”, o ligante atingiu estabilidade e se manteve nesse estado até a conclusão da simulação de 50000

ps. O gráfico de RMSF (Figura 22) mostrou picos correspondentes ao deslocamento de alguns resíduos de aminoácidos, onde temos próximo ao aminoácido 50 um deslocamento de até 0,1 nm, picos simultâneos na mesma proporção podem ser visualizados entre os aminoácidos 75 até 90. O maior deslocamento ocorreu próximo ao aminoácido 100, de 0,21 nm. Outros deslocamentos podem ser vistos próximos aos resíduos 125 e 140. Logo, todos os deslocamentos observados, correspondem posições específicas a aminoácidos do sítio ativo do receptor (Figura 23). O gráfico de ligações de hidrogênio apresentou estabilidade da interação proteína-ligante, com média de 200 ligações a cada 100 passos de dinâmica molecular, durante todos o tempo de simulação.

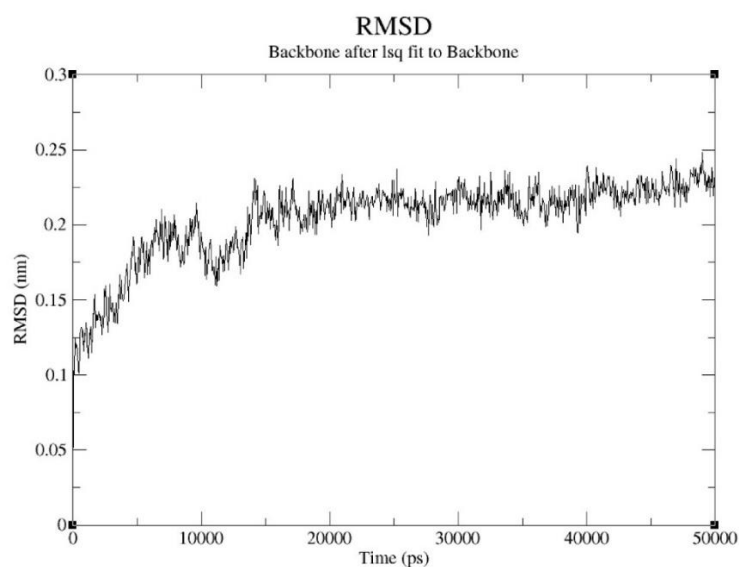


Figura 18 Dinâmica de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83: Desvio da raiz quadrática média (RMSD)

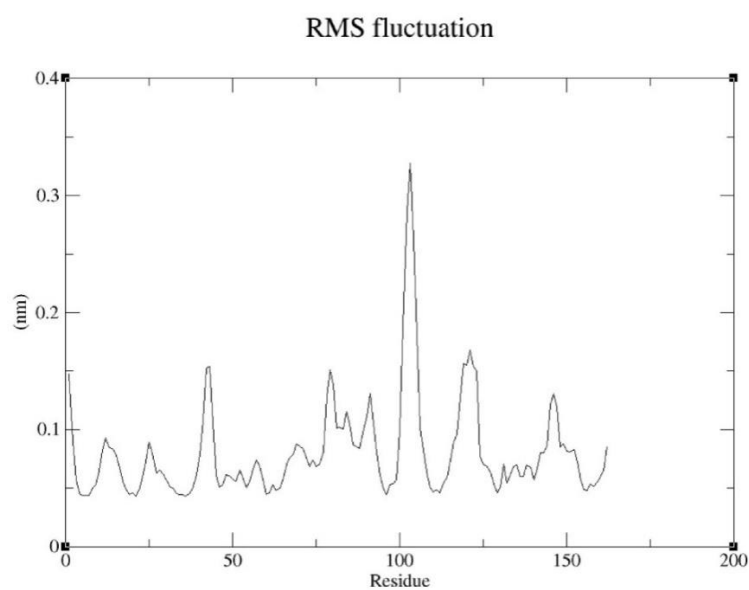


Figura 19 Dinâmica de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83: Desvio da raiz quadrática média de flutuação (RMSF)

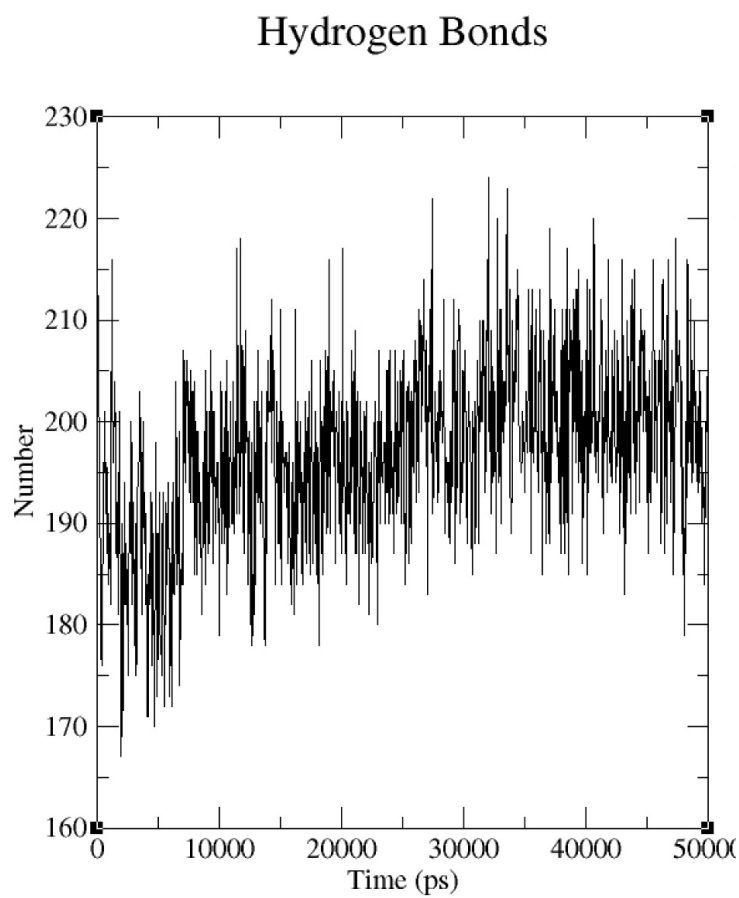


Figura 20DM de estabilidade entre complexo MrCYPA-ZINC83 Ligação de hidrogênio.

3.7 Estudo da afinidade entre TcCYPA e ligantes ZXJ3, ZINC83, ZINC93 e Ciclosporina A

O estudo de *docking* molecular foi realizado entre a ciclofilina A do *Theobroma cacao* e os ligantes ZINC 83, ZINC 93, ZXJ3 e Ciclosporina A no intuito de identificar os níveis de interações que ocorrem entre essas moléculas. Nessa fase do nosso estudo, iniciamos com o ligante controle Ciclosporina A, onde foi possível observar que na posição 1, com o valor de RMSD igual a 0, foram obtidas as melhores interações entre receptor-ligante, com energia de afinidade de -6.1 Kcal/mol.

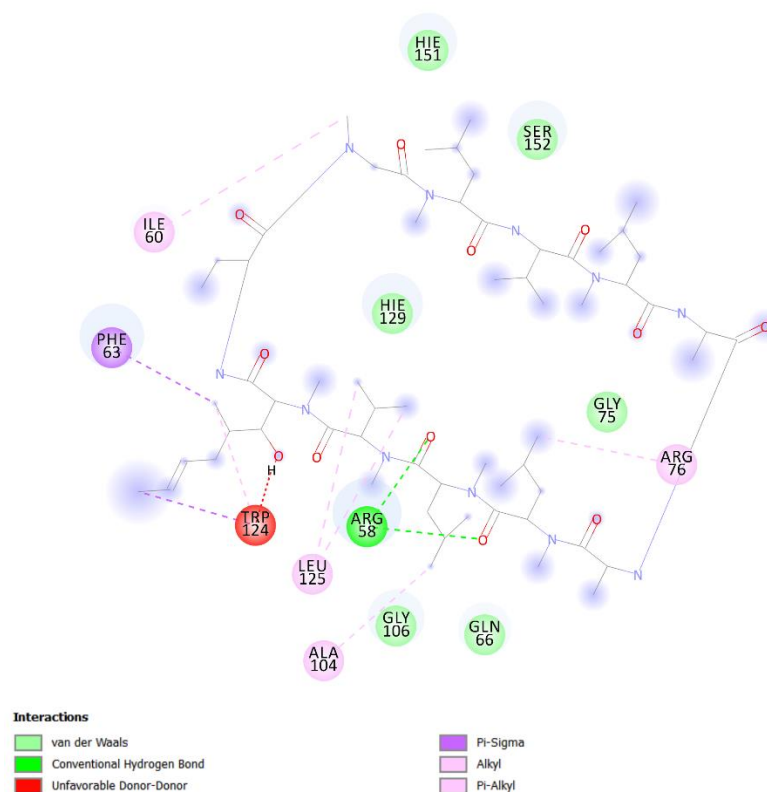


Figura 21 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e Ciclosporina A

Baseados nos mapas de interação 2D gerados pelo software Discovery Studio podemos observar que ocorreram interações com vários resíduos de aminoácidos que pertencem ao sítio ativo da proteína. A ARG 58 realizou duas ligações de hidrogênio, com dois grupamento amidas do ligante. A ARG 76 realizou uma interação hidrofóbica com um radical tercbutil, localizado em uma região de loop. Ligações do mesmo caracter hidrofóbico foi realizada com ILE 60 , LEU 125 e ALA104. A PHE 63 interagiu com um extenso radical do receptor através da ligação hidrofóbica Pi-Sigma . O TRP 124 realizou interações hidrofóbicas do tipo Pi-Alkyl,

Pi-sigma e Alkyl e também uma ligação de hidrogênio desfavorável. A GLY 106, GLN 66, GLY 75, HIE 129, SER 152 e HIE 151 realizam interação de van der Walls com o ligante.

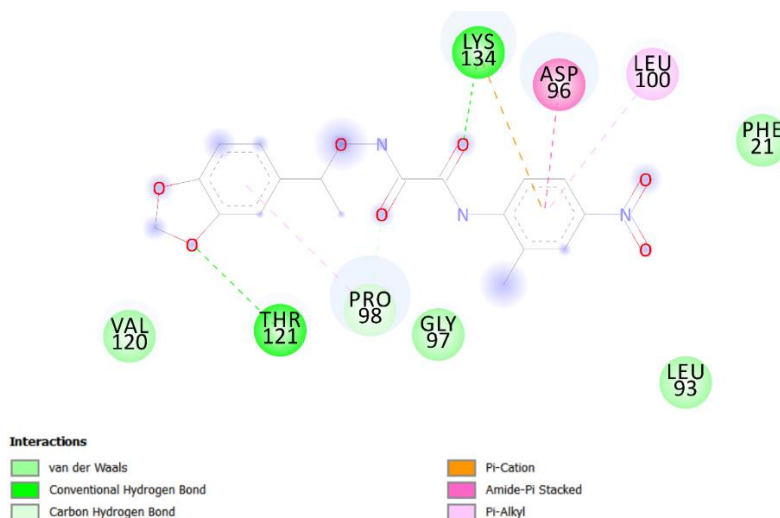


Figura 22 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e ZINC 83

A melhor interação entre a TcCYPA-ZINC 83 ocorreu na posição 1, com energia de afinidade de -4.6 Kcal/mol. As principais interações ocorreram com os resíduos polares LYS 134 realizando duas ligações, uma eletrostática Pi-cation com o anel aromático do e uma ligação de hidrogênio com um grupamento amida do ligante, outra ligação de hidrogênio ocorreu entre a THR 121 e o heteroátomo do grupamento cetona. A PRO 98 fez uma interação hidrofóbica Pi-alkyl com o benzeno que está está ligado a um heterocíclico que compoe o ligante. A leu 100 fez uma interação hidrofóbica Pi-alkyl com anel aromático, onde a ASP 96 também interagiu através de uma ligação Pi-Staked. Os resíduos PHE 21, LEU 93, GLY 97 , VAL120 fizeram interações hidrofóbicas de Van der Walls com o ligante.

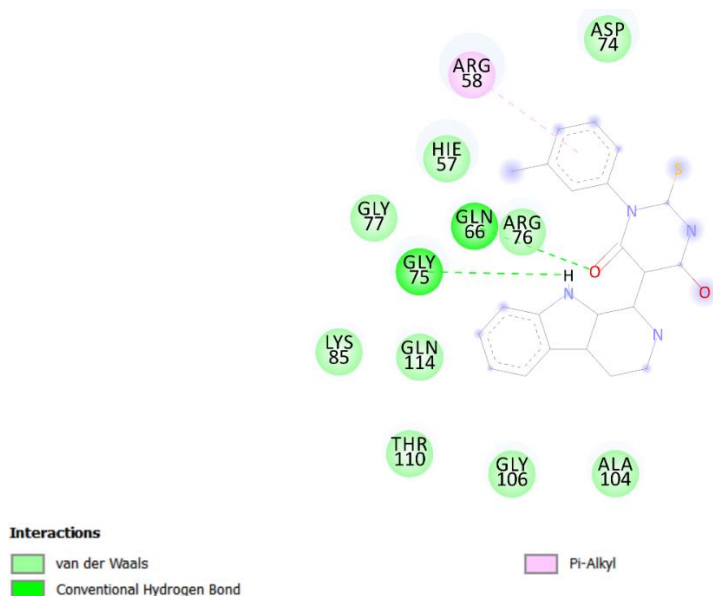


Figura 23 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e ZINC 93

A melhor interação entre o receptor-ligante ZINC93 ocorreu na posição 2, com RMSD de 23.083 Å e energia de afinidade de -6,8 Kcal/mol. Ligações de hidrogênio foram observadas entre a GLY 75 e um grupamento amina do ligante e entre a GLN 66 com grupamento amida. A ARG 58 interagiu com anel aromático, através de uma ligação hidrofóbica Pi-alkyl. A ALA 104, GLY 106, THR 110, LYS 85, GLY 77, ARG 76, HIE 57 e ASP 74 fizeram interações de van der Waals em vários pontos hidrofóbicos do ligante.

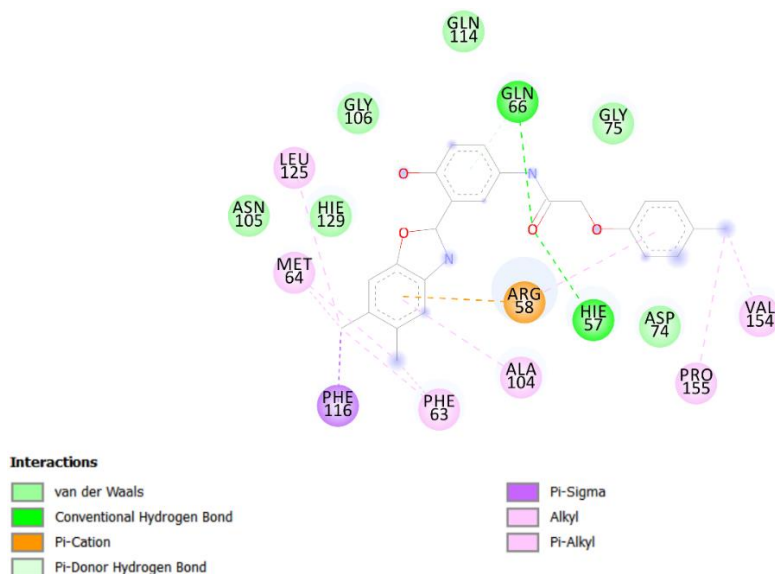


Figura 24 Mapa 2D das interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos TcCYPA e ZXJ3

Ocorreram várias interações entre o sítio ativo da TcCYPA e o ligante ZXJ 3 na posição 1, com energia de afinidade -7.4 Kcal/mol. Podemos observar duas ligações de hidrogênio com O 11 do grupamento amida do ligante, onde uma delas ocorreu com a GLN 66 e outra com HIE 57. A ARG 53 realizou duas interações com anéis aromáticos do ligante, na qual uma, foi do tipo eletrostática Pi-cation e outra hidrofóbica Pi-alkyl. Outras interações hidrofóbicas do tipo Alkyl e Pi-alkyl ocorreram entre os aminoácidos apolares VAL 154, PRO 155, ALA 104, MET 64, LEU 125 e PHE 63 com o ligante. A PHE 116 interagiu com o C 15 do ligante através de uma ligação hidrofóbica do tipo Pi-Sigma. Com os resíduos GLN 114, GLY 106, GLY 75, ASN 105, HIE 129, ASP 74 também ocorreram interações hidrofóbicas de van der Waals.

3.8 Expressão de ciclofilina A recombinante do *Moniliophthora roreri* em sistema heterólogo

A confirmação parcial da expressão MrCYPA recombinante foi dada a partir da análise em SDS-PAGE 1D de amostras das culturas de *E. coli*, da estirpe *Rosetta D3* transformadas com a respectiva ORF sintética induzidas com IPTG a 18°C e 37 °C. Na figura 9, temos a indução da MrCYPA a 37 °C, onde podemos visualizar na coluna 3, que corresponde a fração do extrato total, a banda referente a MrCYPA é nitidamente, o fato se repete na coluna 5, referente a fração insolúvel. No entanto, a fração solúvel (Figura 9, coluna 4), a expressão não é eficiente quando induzida nessa condição, quase não sendo possível a sua visualização. Na figura 10, temos a MrCYPA recombinante induzida a frio (18 °C). Podemos observar que em todas as frações houve uma boa expressão, sendo que na fração solúvel onde temos a proteína em sua conformação nativa, a banda mais evidente ocorre em 8 horas de indução com IPTG.

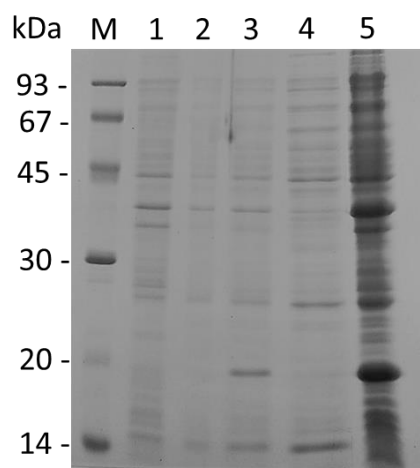


Figura 25. Análise de expressão e solubilidade ciclofilina A recombinante do *Moniliophthora roreri* induzida a 37° C. 1) pET 28a sem inserto, 2) pET 28a com inserto, sem IPTG, 3) Extrato total, 4) Fração solúvel, 5) Fração insolúvel, todos induzidos com IPTG por 4 horas.

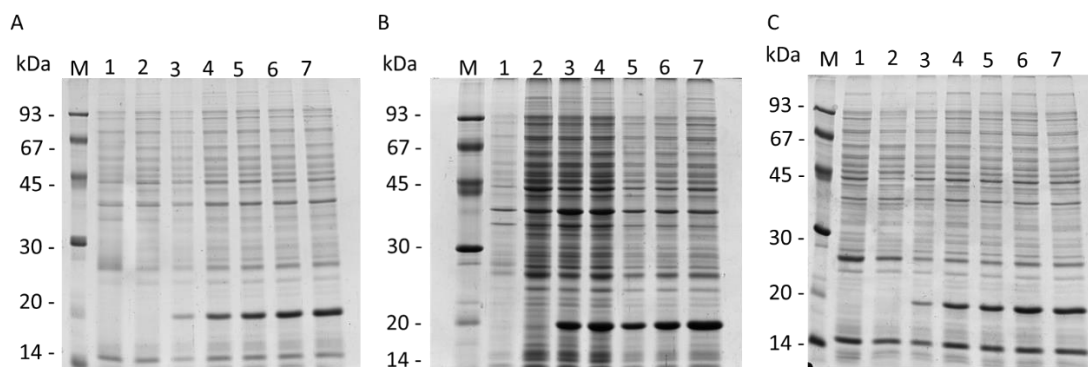


Figura 26 Análise de expressão e solubilidade da ciclofilina A recombinante do *Moniliophthora roreri* induzida a frio. A) Extrato Total, B) Fração Insolúvel e C) Fração Solúvel 1) pET 28a sem inserto, 2) pET 28a com inserto, sem IPTG, 3) Indução com IPTG com 2h, 4) Indução com IPTG com 4h, 5) Indução com IPTG com 6h, 6) Indução com IPTG com 8h, 7) Indução com IPTG com 10h.

3.9 Identificação da MrCYPA recombinante por Espectrometria de massas

A identificação dos peptídeos gerados no processo de espectrometria de massas, foi dada utilizando o MASCOT MS/MS Ion Search, o qual através de buscas no banco de dados do NCBI, identificou a sequência de aminoácidos original da MrCYPA, originada do trabalho de Meinhardt (2014), com cobertura de 24%, score de 227, massa molecular de 19.29 e ponto isoelétrico de 9.56. Todas as características correspondem com as previsões *in silico* realizadas anteriormente nesse estudo.

4 DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da ciclofilina A do fungo *Moniliophthora roreri* (MrCYPA) e predição de sua estrutura tridimensional

A elucidação *in silico* da estrutura 3D da MrCYPA por modelagem por homologia, proporcionou a observação da presença de um beta barril monomérico, formado por oito folhas beta antiparalelas, duas alfa hélices, uma em cada extremidade do barril (Monzani *et al.* 2011; Singh *et al.* 2014 ; Singhet *et al.* 2017; Martin *et al.* 2018). Com os cálculos de minimização de energia da estrutura inicial da MrCYPA, foi obtido um remodelamento dos loopings e folhas-beta 1, que pode ser visto quando comparado ao modelo não minimizado (dados suplementar). Nessas regiões que sofreram notórias alterações após a minimização, estão presentes alguns aminoácidos que compõem o sítio ativo da proteína como, ALA 101, GLY 70, considerados importantes no momento da interação. Onde Zhao *et al.* 2018 cita ALA 101 como pertencer ao sítio ativo da ciclofilina J, assim como Monzani *et al.* 2012 cita a GLY 70 como pertencer ao sítio da ciclofilina A do *Moniliophthora perniciosa*.

4.2 Estudo de novos possíveis inibidores de MrCYPA encontrados a partir da triagem virtual baseada em ligantes

A ciclosporina A é um decapeptídeo cíclico lipofílico, produzido pelo fungo *Tolycladium inflatum*. É um potente inibidor das ciclofilinas que bloqueia os sítios catalíticos PPIase (Chen *et al.*, 2015; Kumari *et al.* 2013). Em humanos tem implicações profundas em imunossupressão para transplante de órgãos (Garcia *et al.*, 2004;), uma vez que ao se ligar a ciclofilina, impede a desfosforilação do NFATc (O factor nuclear de ativação de células T), que atua na expressão de genes para a produção de IL-2 e consecutivamente na formação de linfócitos T.(Kumari *et al.* 2013)

Em trabalhos anteriores, foi comprovado a interação da ciclosporina A com ciclofilinas de fungos fitopatogênicos (Chen *et al.* 2011, Viaud *et al.* 2002). A sua atividade fungistática foi observada contra o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Monzani *et al.* 2011). Em *Magnaporthe oryzae*, a ciclosporina A inibiu severamente o crescimento vegetativo a uma concentração de 100 microgramas/ml (Viaud *et al.* 2002). Por outro lado, a sua aplicação na agricultura pode não ser adequada devido a vários problemas, tais como os efeitos nocivos da droga, dentre eles efeitos colaterais em humanos como neuro e nefrotoxicidade, assim como neoplasias malignas (Garcia *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004;). O alto peso molecular e complexidade estrutural são fatores que tornam o processo de síntese da ciclosporina A difícil

e de alto custo. Por isso, vimos a necessidade de identificar novos compostos com o mesmo potencial inibitório, porém a partir de moléculas pequenas, baratas e que tenham menos riscos em causar efeitos adversos (Simone *et al.* 2019)

De acordo com Zhao e colaboradores (2018), após estudo da estrutura tridimensional da Ciclofilina J, foi feita uma busca virtual em banco de dados de drogas com o intuito de encontrar novos inibidores .de ciclofilna Foram selecionados moléculas em potencial originados do grupo químico dos quinoxalínicos, onde foram selecionadas a partir das interações realizadas entre a ciclofilina J e a Ciclosporina.Os aminoácidos chave para a seleção foram a ARG44, GLN52, ASN92, HIS110, e TYR115 (Zhao *et al.* 2018)

O potencial biotecnológico dos novos ligantes selecionados é um fator que necessita ser ressaltado. Os derivados quinoxalínicos, segundo a teoria de Evans (1988) compõe um grupo de “estruturas privilegiadas”, onde através de modificações estruturais específicas, novos ligantes para alvos moleculares podem ser obtidos. As quinoxalinas são heterocíclicos formados pela junção de um benzeno com um anel piridina, nas quais as suas principais atividades biológicas conhecidas são antitumorais, antimicrobianas, antifúngicas, (Kotharkar e Shinde, 2006; Ishikawa *et al.*, 2012). Várias drogas comercializados no mundo possuem o anel quinoxalínicos em sua estrutura, como o antibacteriano Quinacilina, antimalárico Amodiaquina e o antiglaucoma Bromonidina. Outra característica positiva desse grupo é a sua facilidade de síntese *in vitro* (Franco *et al* 2018).

Então, com base nesse contexto, percebemos que as novas moléculas propostas por Zhao *et al.* (2018) atendiam os objetivos do nosso trabalho, e por isso nós as utilizamos como moléculas de entrada no processo de *screening* virtual baseado no ligante. O *screening* virtual é uma potente ferramenta muito utilizada na pesquisa relacionada ao desenvolvimento racional de fármacos para humanos (Lyne, 2002; Zhao *et al.* 2018; Martin *et al.* 2018). No entanto, a sua aplicação pode se dar para diversos fins (Rodrigues *et al.* 2012). Dessa forma, decidimos utilizar essa metodologia para a busca racional de moléculas com potencial inibitório para a MrCYPA. Nessa etapa, 100 ligantes em potencial foram identificados, com características físico-químicas importantes para interação com o receptor, como doadores e aceptores de hidrogênio, grupos hidrofóbicos e aromáticos, similares as moléculas de entrada

4.3 MrCYPA é expressa em sistema heterólogo

A expressão em sistema heterólogo da MrCYPA, ocorreu de maneira satisfatória, utilizando uma estirpe *escherichia coli*, Rosetta(D3) e o vetor Pet28A. Nesse experimento

observamos que MrCYPA é melhor expressa na fração solúvel quando induzida a frio, no tempo de 10 horas, com temperatura ótima entre 24 a 18°C, ao contrário acontece quando induzida a 37° C, onde no gel SDS-PAGE a banda fração solúvel se mostra quase invisível, realçando nessa condição a fração insolúvel.

4.4 Estudo de Acoplamento (*Docking*) mostrou interação entre MrCYPA e os novos possíveis inibidores ZXJ3, ZINC83, ZINC93.

Dos 122 cálculos de *docking* realizados, selecionamos o ZINC 83, ZINC 93 e ZXJ3 utilizando como critério a melhor energia de afinidade com a MrCYPA, nas quais foram de -8,2, -8,6 e -8,5 Kcal/mol respectivamente. Por sua vez, a energia de afinidade entre o inibidor clássico de ciclofilinas, a ciclosporina A, foi de -5.8 Kcal/mol. Esse resultado evidenciou que, em estudos de acoplamento molecular, a afinidade dos novos ligantes descritos acima com a MrCYPA é bem maior do que o inibidor controle. Em todos os cálculos de acoplamento realizado entre a MrCYPA e os ligantes selecionados, os resíduos ARG 53, THR 71, ASN 100, ALA 101, HIE 124 aparecem interagindo tanto com o inibidor clássico quanto com os novos ligantes. Esses resultados confirmam dados de McGowan e Hamelberg (2013), onde é descrita a dinâmica das interações com a Ciclofilina A humana e o substrato Ace-Ala-Ala-Pro-Phe-Nme. Nesse trabalho, os autores relataram que Arg55, GLN 63 e Asn102 são os resíduos do sítio ativo mais flexíveis e atuam formando uma tríade de ligações de hidrogênio, sendo pontos chave para o reconhecimento do substrato no momento da catálise da isomerização cis-trans. McGowan e Hamelberg (2013), Entre MrCYPA e ligantes, a ARG está na posição 53, na folha beta 3 e interagiu entre o oxigênio de dois grupos amida da ciclosporina A, formando uma ligação de hidrogênio bifurcada, caso relatado por outros autores (Hamelberg e McGowan 2009). Monzani e colaboradores (2011) descreveram que a ARG 53 da MpCYPA sofreu uma acentuada rotação no momento de interação com a Ciclosporina A. As interações com ZINC 93, 83 e ZXJ3 com a ARG 53 ocorreram através de ligações eletrostáticas do tipo Pi-cation. Na MrCYPA o ASN está na posição 102, em uma região de loop entre a folha beta 5 e 6, assim como a GLN está na 63, realizando ligação de hidrogênio com todos os ligantes.

Então, por essas interações terem sido repetidas com todos os inibidores, e devido as ligações de hidrogênio e Pi-cátion serem as mais fortes das não-covalentes, acreditamos que esses resíduos atuam de forma primordial para o reconhecimento e estabilidade do ligante, destacando que esses aminoácidos estão diretamente relacionados com a atividade PPIase, sendo alvos importantes para a inibir a ação da enzima (Hamelberg e McGowan, 2009).

Os aminoácidos PHE 111, PHE 58, GLN 107 e Leu 120, foram resíduos que interagiram, apenas com os novos ligantes. A PHE 58 e 111, estão bem próximos da tríade de hidrogênio ARG 53, ASN 101 e GLN 61, na qual devido a presença do benzeno em sua estrutura conferem rigidez ao sítio catalítico. Essas interações diferenciadas que ocorreram entre o receptor e os novos ligantes completam o sítio ativo, aumentando a bolsa hidrofóbica, região onde ocorre a conexão entre as moléculas. A PHE 111, PHE 58, GLN 107 no ZXJ 3 fizeram interação Van der Waals e no zinc 83 e zinc 93 fizeram ligação de hidrogênio (Figura 16).

Um fato interessante é que devido THR 121 não estar localizado próximo à região que corresponde ao sítio, ele não era citado por outros autores em fazer parte do mesmo. No entanto, uma mutação nesse aminoácido afetou drasticamente a atividade catalítica da enzima. No *docking* da MrCYPA - ZINN 83, ZXJ 3 e Ciclosporina, podemos perceber interações hidrofóbicas com o THP 119, logo acreditamos que essa característica é bem interessante para a molécula desenvolver uma atividade inibitória (Romano *et al.* 2004; McGowan e Hamelberg 2013).

4.5 Predição estrutural 3D da Ciclofilina A do *Theobroma cacao* TcCYPA e identificação da alça divergente.

Ao desenvolver o nosso trabalho achamos interessante investigar a afinidade da ciclofilina do *Theobroma cacao* pelo inibidor controle e os novos ligantes em estudo, uma vez que estamos procurando moléculas com potencial fungicida e/ou fungistáticos contra o gênero *Moniliophthora*, destacando a espécie *Moniliophthora roreri*, e também devido à alta conservação das ciclofilinas nos organismos, principalmente entre eucariotos (Simone *et al.* 2019). Em plantas as ciclofilinas estão presentes em diversas organelas celulares e em diferentes tecidos. No entanto, é no cloroplasto que ela deixa sua forma oxidada inativa, sofre uma redução com a tioredoxina restabelecendo a atividade PPIase (Romano *et al.* 2014). O aumento da expressão de ciclofilinas em plantas ocorre em situações de stress como exposição a HgCl₂, etileno, ácido siálico, mudanças de temperatura, e infecções por microrganismos, estando relacionadas ao mecanismo de defesa e tolerância ao stress (Docena, 2006; Singh *et al.* 2017).

A proteína utilizada como molde para realizar a modelagem da TcCYPA foi a ciclofilina A de *citrus sinensis* (CsCYPA), que por sua vez foi cristalografada por Campos e colaboradores (2013), na qual descreveu o sítio ativo da CsCYPA, pelo resíduos de

aminoácidos GLU 83, LYS 58, SER 49, CYS 40 , CYS 148 , GLY 79 ALA 108 ASN 109 e GLN 118. Arg-62, Glu-70, Gly-79, Phe-120 e Leu-129, todos eles demonstraram ser fundamentais para que a proteína exerça a atividade biológica, assim como também haja interação com o ligante. Seu código PDB é 4JJM e embora tenha demonstrado grande identidade e cobertura com a sequência TcCYPA, alguns aminoácidos se mostraram diferentes nessa região, mantendo apenas polaridade semelhantes

Após o processo de modelagem por homologia e dinâmica molecular da Ciclofilina A de *Theobroma cacao* (TcCYPA) foram observados na estrutura 3D a presença de um beta barril monomérico, formado por oito folhas beta antiparalelas, duas alfa hélices, uma em cada extremidade do barril. Vale ressaltar que o beta barril é uma característica clássica de ciclofilinas, onde vários trabalhos citam esse formato ao elucidar a estrutura 3D da ciclofilina por métodos experimentais (Monzani et al. 2011; Muñoz-Gutiérrez et al. 2017) Ao realizar o alinhamento estrutural entre as ciclofilinas A do *Moniliophthora rorei*, *Moniliophthora perniciosa* e o *Theobroma cacao*, identificamos na TcCYPA uma alça exclusiva rica nos aminoácidos G T G N S G K R que se inicia na posição 99 indo até ao resíduo 107 (Figura 22). Um estudo realizado por Sekhon *et al.* (2012) fizeram o alinhamento estrutural de ciclofilinas de vários organismos, relatando a presença de uma alça divergente composta dos resíduos **48K S G K P L H 54**, na Ciclofilina de *Triticum aestivum* L (Trigo) (Vasudevan *et al.*, 2012; Sekhon *et al.* 2012, Gochez *et al.* 2016).

Alguns autores inferem que a alça exclusiva de plantas é uma região de ligação a efetores, uma vez que muitos deles contêm motivos na região N-terminal necessários para ligação de proteínas hospedeiras específicas, na tentativa de burlar mecanismos moleculares de defesa da planta (White *et al.*, 2009). Um motivo de ligação a Ciclofilina foi encontrado em efetores AvrGf2 da família XopA de *Xanthomonas fuscans*. Ele consiste na sequência de aminoácidos "GPxL" e revelou papel na ligação em Ciclofilinas de *Citrus*, com contribuição para a elicitação da resistência. Uma mutação sítio-dirigida AvrGf2-A357ASL aboliu a resposta hipersensível, confirmando ainda que a ligação a Ciclofilina é importante para desencadear da via de resistência. (Gochez *et al.* 2016)

Com base em publicações anteriores (Sekhon *et al.* 2013; Gochez *et al.* 2016), observamos as Ciclofilinas em plantas poderiam também estar envolvidas com a ativação de efetores de microrganismos fitopatogênicos, induzindo um efeito contrário ao de defesa,

conferindo maior virulência e patogenicidade ao invasor (Sekhonet *et al.* 2013; Gochez *et al.* 2016).

4.6 Estudo da afinidade entre TcCYPA e novos possíveis inibidores ZXJ3, ZINC83, ZINC93

No estudo de acoplamento entre TcCYPA-ligantes podemos observar que houve interação tanto com o inibidor controle quanto com os novos ligantes. No perfil das interações se mostraram divergentes quando comparados com de MrCYPA. O ligante ZXJ 3 foi a molécula que interagiu com mais resíduos de aminoácidos correspondentes ao sítio ativo descrito por Campos *et al.* 2012, sendo eles a ARG 58, ASN 105, ALA 104, PHE 119, com energia de afinidade de -7,4 kcal/mol. A interação entre TcMCYPA com a droga controle Ciclosporina A apresentou energia de afinidade de -6.1 Kcal/mol, onde os resíduos GLY 75 e ALA, 104 foram compatíveis com descritos pertencer ao sítio ativo (Campos *et al.* 2012). A interação TcCYPA- ZINC 83 obteve energia de afinidade de -4.6 Kcal/mol, enquanto com MrCYPA-ZINC 83 foi de -8.2 Kcal/mol. As interações do ZINC 83 com TcCYPA foram exclusivas, não havendo similaridade com as interações do inibidor controle e outros novos ligantes. No *docking* com ZINC 93 a energia de afinidade de -6,8 Kcal/mol, onde os resíduos GLY 77 e ALA 104 correspondem ao sítio ativo da TcCYPA. (Campos *et al.* 2012)

A princípio, levando em consideração a possível patogenicidade e virulência das ciclofilinas em fungos, buscávamos moléculas com potencial de inibição seletivo a MrCYPA. A seletividade é um critério que deve ser examinado com cuidado devido a conservação estrutural dessa classe proteica, questionamentos dessa natureza são relatados nos trabalhos de Zhao *et al* 2018 e Simone *et al.* 2019. No entanto, a atuação ambígua das ciclofilinas de plantas onde exercem tanto funções fisiológicas, como atuando no reconhecimento de efetores de fitopatógenos, conferindo resistência a microrganismos (Sekhon *et al.* 2012; Gochez *et al.* 2016) nos levou a pensar de uma maneira extremamente precoce, a possibilidade desse fenômeno ocorrer em ciclofilinas do *Theobroma cacao*, uma vez que ao realizarmos o alinhamento 3D e múltiplo, uma alça divergente foi facilmente visualizadas, bem semelhante a alça ciclofilina *Triticum aestivum* proposta por Sekhonet. *et. al* 2013, o primeiro a relatar essa alteração em ciclofilinas de plantas.

Ousando ainda mais, quando relacionamos o possível fenômeno das ciclofilinas do *Theobroma cacao* interagindo e ativando efetores de *Moniliophthora roreri*. Sabemos que não temos estudos que sustentam essas hipóteses, no entanto nosso trabalho é pioneiro em relatar

essas vertentes entre ciclofilinas de *Theobroma* e *Moniliophthora roreri*, testes *in silico*, *in vitro* e *in vivo* são necessários para esclarecer um mecanismo.

5- CONCLUSÃO

Concluimos que as novas moléculas encontradas nesse estudo ZINC 83, ZINC 93 e ZXJ 3 possuem grande potencial fungicida e dentre elas a ZINC 83 e ZINC 93 mostrou melhor energia de afinidade no sítio da MrCYPA. Com isso, foi visto que elas se encontram aptas para prosseguirem com testes *in vitro* e *in vivo* no intuito de atuarem como novas perspectivas no controle da monília, causada por *Moniliophthora roreri*.

Continuamos a conclusão relatando que os novos inibidores em potencial ZINC 83, ZINC 93 e ZXJ 3 também interagem com a ciclofilina do *Theobroma cacao*, mas com menor afinidade. A ZINC 83 obteve a menor energia de afinidade e interagiu com aminoácidos fora do sítio ativo, sendo por esse motivo a possível melhor molécula quando pensamos no requisito seletividade.

Em suma, vimos também a necessidade em realizar mais trabalhos no intuito de entender o real papel das ciclofilinas no *Theobroma cacao*, uma vez que nesse estudo foi evidenciado a presença de uma região de alça exclusiva na TcCYPA, sendo que já foi citado em pesquisas anteriores com plantas, essa região ser um local para ativação de efetores fitopatogênicos.

REFERÊNCIAS

BAILEY.*et al.* Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. Physiological and Molecular PLANT PATHOLOGY, v. 81: 84-96. 2013.

BARBOSA*et al.* Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations. BMC GENOMICS. 2018

CAMPOS*et al.* 2013. A Redox 2-Cys Mechanism Regulates the Catalytic Activity of Divergent Cyclophilins. Plant Physiology Jul 2013, 162 (3) 1311-1323; DOI: 10.1104/pp.113.218339

CASE*et al.* 2013. AMBER 2018, University of California, San Francisco

CHENet al. 2015 Cyclophilin Jisa Novel Peptidyl ProlylIsomeraseandTargetforRepressingtheGrowthofHepatocellularCarcinoma.PLoS ONE 10(5):e0127668.doi:10.1371/journal.pone.0127666Chen *et al.* 2015;

CHEN, *et al.* CYP, a hypovirus -regulated cyclophilins, is required for virulence in the chestnut blight fungus. MOL. PLANT PATHOL. 2011

DI TOMMASO et al. 2011.T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of DNA and RNA sequences using structural information and homology extension. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39(Web Server issue):W13-7. doi: 10.1093/nar/gkr245. Epub 2011

DOCENA C. Docking and quantitative structure-activity relationship of bi-cyclic heteroaromatic pyridazinone and pyrazolone derivatives as phosphodiesterase 3A (PDE3A) inhibitors. São Paulo. 2006

EVANS, *et al.* What's in a name: Crinipellis, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? MYCOLOGIST, v. 16: 148-152. 2002.

EVANS, H.C. *et al.* Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. PLANT PATHOLOGY, v. 52: 476-485. 2003

EVANS, H.C. Invasive neotropical pathogens of tree crops. Pg. 83-112. In: WATLING, R. *et al.* (eds). TROPICAL MYCOLOGY. Vol. 2. Micromycetes. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2002.

FERNANDES F, Ansari IuH, Striker R (2010) Cyclosporine Inhibits a Direct Interaction between Cyclophilins and Hepatitis C NS5A. PLOS ONE 5(3): e9815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009815> Franco et al 2018

FRANCO M. S. 2017.Experimental and Clinical Transplantation (2004) 2: 273-279. USP.São Paulo. 2017

GARCIA, et al. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. J. Bras. Patol. Med. Lab. [online]. 2004, vol.40, n.6, pp.393-401. ISSN 1676-2444. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442004000600007>.Gallagher *et al.*, 2010;

GASTEIGER *et al.* 2005 Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server;(In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005).

GOCHEZ et al. Molecular characterization of XopAG effector AvrGf2 from *Xanthomonas fuscans* ssp. *aurantifolii* in grapefruit. *Molecular Plant Pathology* DOI: 10.1111/mpp.12408. 2016

HAMELBERG, D., and J. A. McCammon. 2009. Mechanistic insight into the role of transition-state stabilization in cyclophilin A. *J. Am. Chem. Soc.* 131:147–152.

ISHIKAWA et al. 2012 Synthesis and antimicrobial activity of 2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline derivatives. *Bioorganic chemistry*. 41-42. 1-5. 10.1016/j.bioorg.2011.12.002.

KOES E CAMACHO. 2012 ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40

Kotharkar e Shinde. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, Web Server issue. doi:10.1093/nar/gks378.2012, 2006

KUMARI et al. Cyclophilins: Proteins in search of function, *Plant Signaling & Behavior*, 8:1, e22734, DOI: 10.4161/psb.22734. (2013)

LASKOWSKI et al. 1993 *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures Manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

MARTIN et al. Structural basis of interaction between dimeric cyclophilin 1 and Myb1 transcription factor in *Trichomonas vaginalis*. *Scientific Reports*. 2018

MCGOWAN E HAMELBERG 2013. Conformational plasticity of an enzyme during catalysis: intricate coupling between cyclophilin A dynamics and substrate turnover. *Biophys J*. 2013 Jan 8;104(1):216-26. doi: 10.1016/j.bpj.2012.11.3815. Epub 2013 Jan 8

MEINHARDT et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*. 2014;15:164.2014

MELO et al. ANOLEA: a www server to assess protein structures. Proc Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 1997, 5:187-90

MICHEL *et al.* 2019, InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D351-D360. doi: 10.1093/nar/gky1100.

MONZANI *et al.* Structural Analysis of Cyclophilin and Inhibitory Activity of Cyclosporin A on Germination and Growth of *Moniliophthora perniciosa*. Pharm Anal Acta S7:001. doi:10.4172/2153-2435.S7-001. 2011

MUÑOZ-GUTIÉRREZ et al. Docking and quantitative structure-activity relationship of bi-cyclic heteroaromatic pyridazinone and pyrazolone derivatives as phosphodiesterase 3A (PDE3A) inhibitors. PLoS ONE 12(12): e0189213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189213> 2017

OLIVEIRA et al. Mutagenic and Cytotoxic Effects of Immunosuppressive Drugs on Human Lymphocyte Cultures. *Experimental and Clinical Transplantation* (2004) 2: 273-279

PÉREZ - VICENTE, 2017. *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. and *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impact, symptoms, diagnosis, epidemiology and management, Rev. Protección Veg., Vol. 33, No. 1 (enero-abril 2018), ISSN: 2224-4697

PETERSEN 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions Nature Methods, 8:785-786, 2011

PHILLIPS-MORA, W. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. PHYTOPATHOLOGY, V. 97: 1644-1647. 2007.

RAMACHANDRAN GN et al. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. J. Mol. Biol. 1963, 7:95-9

RODRIGUES *et al.* 2012. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos Rev. Virtual Quim., 2012, 4 (6), 739-776. Data de publicação na Web: 24 de dezembro de 2012
perfeito

SAMBROOK, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory

SCHRÖDINGER L.L.C (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.*

SCHWEDE. T. Protein modeling: what happened to the “protein structure gap”?
VOLUME 21, ISSUE 9, 3 SEPTEMBER 2013, PAGES 1531-1540

SEKHON *et al.* Structural and biochemical characterization of the cytosolic wheat cyclophilin TaCypA-1. *Biological Crystallography*.2012

SIEVERSet *al.* 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011 Oct 11;7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75.

SIMONE *et al.* A computationally designed binding mode flip leads to a novel class of potent tri-vector cyclophilin inhibitors. *Chem. Sci.* 10, 542.DOI: 10.1039/c8sc03831g, 2019.

SINGH,*et al.*Less studied proteins with critical roles in pathogenesis. REVIEW PHYTOPATHOLOGY. JUN 2017

TALBOT, N.J., Ebbole, D.J., and Hamer, J.E. (1993). Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5, 1575–1590.

TROTT E OLSON.Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY* 31 455-461

VIAUD *et al.*A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. *THE PLANT CELL*, VOL. 14, 917–930, APRIL 2002.

VIAUD *et al.*Cyclophilin a and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin a inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, V. 50(5): 1451-1465. 2003.

WANG,*et al.* 2017. Cyclophilin A maintains glioma-initiating cell stemness by regulating Wnt/beta-catenin signaling. *Clin. Cancer Res.* 23, 6640–6649. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17- 0774

WANG, P., and Heitman, J. (2005). The cyclophilins. *Genome Biol.* 6:226.

XUE, et al .Extracellular cyclophilin A, especially acetylated, causes pulmonary hypertension by stimulating endothelial apoptosis, redox stress, and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 1138–1146. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309212 .2017

ZHAO et al. Cyclophilin J PPIase Inhibitors Derived from 2,3-Quinoxaline-6 Amine Exhibit Antitumor Activity. *Front. Pharmacol.* 9:126. doi: 10.3389/fphar.2018.00126.2018