



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**“Propriedades Farmacológicas da Alicina (Diallyl Thiosulfinate),
Potencial Aplicação em produtos Biotecnológicos para Suplementação
Alimentar Animal.”**

JOÃO GILBERTO BERNARDI SOARES.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor EM BIOTECNOLOGIA, DO Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:

Prof Dr FERNANDO M. ARAÚJO – MOREIRA

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo nº 88882.426513/2019-01

São Carlos – São Paulo 2023

JOÃO GILBERTO BERNARDI SOARES.

Propriedades Farmacológicas da Alicina (Diallyl Thiosulfinate), Potencial Aplicação em produtos Biotecnológicos para Suplementação Alimentar Animal.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof Dr Fernando M. Araújo – Moreira

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr Fernando M. Araújo – Moreira – Presidente – PPGBiotec – UFSCar

Profa Dra Cristina Paiva De Souza – Membro – PPGBiotec – UFSCar

Prof Dr Bruno Silva Andrade-Membro – UESB

Dr Maj Med Vet Otávio Augusto Brioschi Soares – Membro – EsSEEx – HCE

Prof Dr Eng Álvaro José Boareto Mendes – Membro – IME

São Carlos-SP

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Relatório de Defesa de Tese

Candidato: João Gilberto Bernardi Soares

Aos 08/12/2023, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, a defesa de tese de doutorado sob o título: Propriedades Farmacológicas da Alicina (Diallyl Thiosulfinate), Potencial Aplicação em produtos Biotecnológicos para Suplementação Alimentar Animal, apresentada pelo candidato João Gilberto Bernardi Soares. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca	Função	Instituição	Conceito	Resultado Final
Prof. Dr. Fernando Manuel Araujo Moreira	Presidente	UFSCar	<u>A</u>	<u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa	Titular	UFSCar	<u>A</u>	
Prof. Dr. Bruno Silva Andrade	Titular	UESB	<u>A</u>	
Prof. Dr. Otávio Augusto Brioschi Soares	Titular	EsSEX	<u>A</u>	
Prof. Dr. Álvaro José Boarerto Mendes	Titular	IME	<u>A</u>	

Parecer da Comissão Julgadora*:

Após a exposição do candidato e da respectiva arguição, os membros da banca, de maneira unânime, consideram o candidato **APROVADO**.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Cláudia Regina Pastega, representante do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Fernando Manuel Araujo Moreira

Representante do PPG: Cláudia Regina Pastega

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Prof. Dr. Bruno Silva Andrade

Prof. Dr. Otávio Augusto Brioschi Soares

Prof. Dr. Álvaro José Boarerto Mendes

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Fernando Manuel Araujo Moreira, Cristina Paiva de Sousa, Bruno Silva Andrade, Otávio Augusto Brioschi Soares, Álvaro José Boarerto Mendes e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Documento assinado digitalmente
gov.br FERNANDO MANUEL ARAUJO MOREIRA
Data: 08/12/2023 15:33:0100
Verifique em <https://sica30e.itl.gov.br>

Prof. Dr. Fernando Manuel Araujo Moreira

Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e da Terra.

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Folha de Aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de
Doutorado do candidato João Gilberto Bernardi Soares, realizada em 08 /12/2023:

Prof Dr Fernando M. Araújo -Moreira – Presidente – IME-PPGBiotec – UFSCar

Profª Dra Cristina Paiva De Souza - Membro - PPGBiotec – UFSCar

Prof Dr Bruno Silva Andrade – Membro – UESB

Dr Maj Med Vet Otávio Augusto Brioschi Soares - Membro - EsSEx – HCE

Prof Dr Eng Álvaro José Boareto Mendes – Membro - IME

DEDICATÓRIA

Para aqueles, que de maneira incansável e sincera trabalham silenciosamente e desprendidos de vaidade pelo bem-estar do Cavalo, e que os humildes resultados desta labuta ajudem os futuros pesquisadores em seus trabalhos.

Presto homenagem a minha família pelo incondicional apoio, e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Prof Dr Fernando M. Araújo-Moreira pela calma e tolerância com minhas dificuldades, porém, sem jamais retirar de meu caminho os obstáculos encontrados desde a realização do meu Mestrado, e desempenhar o nobre papel de ser meu Iniciador Científico.

Ao Prof Dr Bruno Silva Andrade pelas incansáveis orientações e ensinamentos, muitas vezes sacrificando seus horários de descanso e lazer familiar, características inerentes ao verdadeiro Mestre.

Ao TC Med Vet. Rafael Rodrigues do 3º Regimento de Cavalaria de Guardas Exército Brasileiro, pelo apoio, ensinamentos e incentivo.

Ao Med Vet Luiz Otávio Amaro da Silveira Silveira, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; pelo apoio na área da Equinocultura.

AGRADECIMENTOS

Ao Supremo Arquiteto do Universo, por me acompanhar durante este trabalho e nas horas mais escuras me proporcionar mentalidade e principalmente força interior para nunca perder a direção da estrela guia e conseguir chegar até aqui.

Aos integrantes do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFSCar na pessoa de sua Diretora a Profa Dra Cristina Paiva de Souza, e os trabalhos incansáveis da Secretária do Programa, os quais me apoiaram e compreenderam os passos desta jornada.

Ao Prof Dr Bruno Silva Andrade da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Dr Maj Vet. Otávio Augusto Brioschi Soares da Escola De Saúde do Exército Brasileiro, Prof Dr Eng Álvaro José Boareto Mendes do Instituto Militar de Engenharia do Exército Brasileiro, Profa Dra Cristina Paiva de Souza da Universidade Federal de São Carlos, por terem gentilmente aceito o convite para integrar a banca de avaliação da defesa deste trabalho.

Agradecer o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo nº 88882.426513/2019-01.
This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Process nº 88882.426513/2019-01.

Bernardi Soares, João Gilberto; Propriedades Farmacológicas da Alicina (Diallyl Thiosulfinate), Potencial Aplicação em produtos Biotecnológicos para Suplementação Alimentar Animal 2023. Tese-PPGBiotec – UFSCar, São Carlos, 2023.

RESUMO

A *Babesia Caballi* e *Theileria Equi* são doenças conhecidas de parasitas do filo apicomplexa e que compartilham estratégias de invasão de células de glóbulos vermelhos. A alicina pura é uma molécula derivada do alho fresco esmagado e possui propriedades antifúngicas, antiparasitárias e antioxidantes. Desta maneira, realizamos experimentos de *docking* e dinâmica molecular com objetivo de verificar as propriedades farmacológicas da alicina para ser usada no tratamento e prevenção da *T. equi* e *B. caballi*, e observar sua permanência em complexo sob condições de temperatura, movimento, tempo, pressão e em ambiente solvatado, para tal, foram utilizadas a alicina e as proteínas PDB Id 3SRI *Plasmodium falciparum* PfRON2 com 29 aa, PDB Id 4APM AMA1/*Babesia Divergens*, e a proteína construída por homologia model_01*Babesia Caballi*, dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o ativo alicina, vários são pertencentes a sequência conservada e comum entre os integrantes do filo apicomplexa, e amplamente descritos em trabalhos anteriores, assim forneceram importantes informações sobre a dinâmica do complexo ligante-proteína. Nos experimentos de acoplamento molecular predominaram as interações com resíduos de aminoácidos apolares, com resultados de alterações na estrutura da proteína de acordo com a disposição espacial dos grupos funcionais e pela sua taxa de inserção na cavidade proteica, realçando a importância das interações não covalentes para o estudo de candidatos a fármacos. A hidrofobicidade observada nas interações proteína-ligante apresentaram a tendência de estabilização da estrutura proteica na direção de um gradiente de energia menor em relação ao ambiente de solvatação externo ao bolso hidrofóbico, onde é o local de acoplamento do ligante. Entre os resultados dos experimentos a diferença de RMSD da melhor configuração de ajuste do ligante alicina caracterizou sua afinidade pela sequência de aminoácidos da babesia. As energias de van der Waals, que representam as interações de curto alcance para moléculas em meios solvatados, e as energias eletrostáticas de longo alcance ou de coulomb, juntamente com a energia de afinidade esclareceram as interações, a topologia e o caráter energético do ligante. Com os resultados dos experimentos foi possível estabelecer a relação das propriedades anti protozoários da alicina dos resultados dos experimentos *in silico* e *in vitro*, a análise dos resultados de acoplamento e dinâmica molecular das interações ligante-proteínas permitem

apontar a alicina como um novo potencial ativo para a prevenção e tratamento da *T. equi* e *B. caballi*.

O qual oferece condições para a fabricação de um produto novo em biotecnologia, com o respectivo registro de patente, e para ser integrado a dieta alimentar de equinos.

Palavras-chave: Piroplasmose, *Babesia*, Alicina, *Babesia Caballi*, *Theileria Equi*, Acoplamento, Dinâmica Molecular, Interações, Fármacos, Equinos.

Bernardi Soares, João Gilberto; Pharmacological Properties of Allicin (Diallyl Thiosulfinate), Potential Application in Biotechnological Products for Animal Feed Supplementation 2023. Tese-PPGBiotec – UFSCar, São Carlos, 2023.

ABSTRACT

Babesia Caballi and *Theileria Equi* are known diseases of parasites of the phylum apicomplexa that share strategies for invasion of red blood cell cells. Pure allicin is a molecule derived from crushed fresh garlic and has antifungal, antiparasitic, and antioxidant properties. In this way, we carried out docking and molecular dynamics experiments in order to verify the pharmacological properties of allicin to be used in the treatment and prevention of *T. equi* and *B. caballi*, and to verify its permanence in complex under conditions of temperature, movement, time, pressure and solvated environment, for this, allicin and the proteins PDB Id 3SRI *Plasmodium falciparum* PfRON2 with 29 aa, PDB Id 4APM AMA1/*Babesia Divergens*, and the protein constructed by homology model_01*Babesia Caballi*, Of the amino acid residues that interacted with the active allicin, several belong to the conserved and common sequence among the members of the phylum apicomplexan and have been extensively described in previous works, thus providing important information on the dynamics of the ligand-protein complex. In the molecular docking experiments, interactions with nonpolar amino acid residues predominated, with results of changes in the protein structure according to the spatial arrangement of the functional groups and their insertion rate in the protein cavity, highlighting the importance of noncovalent interactions for the study of drug candidates. The hydrophobicity observed in the protein-ligand interactions showed the tendency of stabilization of the protein structure in the direction of a lower energy gradient about the solvation environment external to the hydrophobic pocket, where the ligand coupling site is. Among the results of the experiments, the RMSD difference from the best adjustment configuration of the allicin ligand characterized its affinity for the amino acid sequence of babesia. The van der Waals energies, which represent the short-range interactions for molecules in a solvated medium, and the long-range electrostatic or Coulomb energies, along with the affinity energy, topology and energetic character of the ligand. With the results of the experiments, it was possible to establish the relationship of the anti-protozoan properties of allicin from the results of the *in silico* and *in vitro experiments*, the analysis of the docking results and molecular dynamics of the ligand-

protein interactions allowed to point out allicin as a new active potential for the prevention and treatment of *Babesia Caballi* and *Theileria Equi*.

Which offers conditions for the manufacture of a new product in biotechnology, with the respective patent registration, to be integrated into the diet of horses.

Keywords: *Piroplasmosis, Babesia, Allicin, Babesia Caballi, Theileria Equi, Docking, Molecular Dynamics, Interactions, Drugs, Horses.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação do filo apicomplexa - Classificação taxonômica dos protozoários da piroplasmose. Fonte: (BACKX NORONHA MADEIRA, 2007)	2
Figura 2 – <i>Babesia Caballi</i> - esfregaços de sangue equino, um eritrócito no centro contém dois grandes merozoítos intracitoplásmicos azulados alongados em forma de pera, ou células filhas (seta), típicos de <i>B. caballi</i> , (Manchas de - Grunwald-Giemsa) Fonte: (WISE et al., 2013).	3
Figura 3 - <i>Theileria Equi</i> – esfregaços de sangue equino, poucos eritrócitos contém pequenos merozoítos intracitoplasmáticos azulados de <i>T. equi</i> , posicionados numa formação típica de "cruz de malta" por quatro merozoítos agrupados (seta), (Manchas de - <i>Grunwald-Giemsa</i>), Fonte: (WISE et al., 2013).	4
Figura 4 – Manifestação clínica, características e medicamentos existentes para o tratamento da <i>B. caballi</i> e <i>T. equi</i> . Figura elaborada pelo autor.	4
Figura 5 – Ciclo de vida de <i>T. equi</i> no vetor carrapato e cavalo (a). (b) Desenvolvimento de <i>B. caballi</i> no vetor carrapato e cavalo. Abreviaturas: PBMCs (células mononucleares do sangue periférico); RBCs (Hemácias, glóbulos vermelhos). Fonte: (SCOLES; UETI, 2015)	5
Figura 6 - Estrutura do parasita do filo apicomplexa. Fonte: (TONKIN, 2014).	6
Figura 7 - Adesão do parasita à membrana da célula hospedeira pelo polo apical. Fonte: (VOMMARO; ATTIAS; DE SOUZA, 2014).	7
Figura 8 - Sequência de imagens em microscopia eletrônica de varredura da interação e desenvolvimento de <i>Toxoplasma gondi</i> em diferentes células de mamíferos. Fonte: (VOMMARO; ATTIAS; DE SOUZA, 2014)	8
Figura 9 - Interações AMA1/Ron2 - Modelos alternativos da interação RON2-AMA1 no MJ. (A) com o domínio TgRON2 C-terminal exposto dentro do hospedeiro/célula; (B) com o domínio C-terminal do TgRON2 exposto externamente Fonte: (LAMARQUE et al., 2011).	10
Figura 10 - Estrutura cristalográfica da Proteína PBD Id 4APM AMA1/Babesia Divergens em amarelo destaque dos sítios ativos. Figura obtida no aplicativo <i>DS Visualizer 2.0</i>	10
Figura 11 – Propriedades químicas e biológicas da alicina Fonte: (BORLINGHAUS et al., 2014).	13
Figura 12 - Atuação da alicina no DNA.RNA e Proteínas. Fonte: (BORLINGHAUS et al., 2014).	15

Figura 13 - Lâmina de esfregaço sanguíneo de cultura <i>In Vitro</i> de parasitas de <i>B. caballi</i> e <i>T. equi</i> . Barra de escala 10 μm . Fonte: (SALAMA et al., 2014).....	16
Figura 14- Frequência de distribuição das interações não covalentes mais comuns observadas em Proteína-Ligante extraídas do PDB (<i>Protein Data Bank</i>) Figura obtida através do site: https://www.cambridgemedchemconsulting.com/	17
Figura 15 - Ligação de Hidrogênio - Descritores geométricos de uma ligação de hidrogênio (HB): d_1 – distância da ligação D-H; d_2 – distância da ligação de hidrogênio (H-A); d_3 – distância D-A; Φ – ângulo entre D-H e H-A. H = átomo de hidrogênio; A – átomo acceptor da ligação de hidrogênio; D – átomo doador do hidrogênio para a ligação de hidrogênio. Raios de van der Waals de cada átomo representados em sobra cinzenta. Fonte: (SILVA.RUI, 2019).....	18
Figura 16 - Modelos de Interação Enzima- Substrato. Fonte: (PEDRO, 2022).	19
Figura 17- Dinâmica molecular. Fonte: (FILHO, 2022).	22
Figura 18 - Plataformas de banco de dados, servidores, programas e aplicativos usados nos experimentos. Figura elaborada pelo autor.....	24
Figura 19 - Visualização do Ligante Alicina (estrutura de Lewis), pares de elétrons isolados nos átomos de enxofre e oxigênio. Figura obtida através do código <i>Smiles</i> no site https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ , e desenho no aplicativo <i>Marvin Sketch 22.22</i>	26
Figura 20 - Estimativa Qualitativa de Alinhamento Molecular, GMQE (<i>Global Model Quality Estimate</i>) é uma estimativa de qualidade que combina propriedades do alinhamento do modelo de destino e da estrutura modelo. Figura obtida através do site swissmodel.com	28
Figura 21 - Alinhamento de sequências, um asterisco (*) significa que as sequências são idênticas naquela posição; dois pontos (:) indicam substituições conservativas (grupo da mesma cor); um ponto final (.) refere-se a substituições semiconservativas (formas semelhantes). Figura obtida através do site <i>T-COFFEE</i>	28
Figura 22 - RMSD de 0.16 Å (angstroms) no alinhamento de estruturas de aminoácidos das proteínas model_01 e PDB Id 4APM <i>Babesia divergens</i> , Figura obtida através do aplicativo <i>Pymol</i>	29
Figura 23 - Visualização de interações 3D de acoplamento molecular do ligante alicina com PfRON2 (Cys 2049, Leu 2050), interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), linhas pontilhadas indicam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	33

Figura 24 - Visualização das interações em 2D do Ligante alicina com PfRON2. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	33
Figura 25 - Superfície de hidrofobicidade do complexo alicina com PfRON2, as regiões mais positivas (marrons) representam a alta hidrofobicidade, e as negativas (azuis) as regiões de baixa hidrofobicidade, o rótulo numérico está em Kcal/mol, os números acima das linhas tracejadas representam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	34
Figura 26 - Visualização de interações 3D de acoplamento molecular do ligante alicina com <i>B. divergens</i> /AMA1, interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), interações Pi-sulfur (linhas pontilhadas laranja) linhas pontilhadas também indicam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	37
Figura 27 - Visualização das interações em 2D do ligante alicina com <i>B. divergens</i> /AMA1. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	37
Figura 28 - Superfície de hidrofobicidade do complexo alicina com <i>Babesia divergens</i> /AMA1, as regiões mais positivas (marrons) representam a alta hidrofobicidade, e as negativas (azuis) as regiões de baixa hidrofobicidade, o rótulo numérico está em Kcal/mol, os números acima das linhas tracejadas representam as distancias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	38
Figura 29 - Visualização de interações 3D de acoplamento molecular do ligante alicina com a proteína model_01 <i>Babesia Caballi</i> , interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), interações Pi-sulfur (linhas pontilhadas laranja) linhas pontilhadas também indicam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida no aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	41
Figura 30 - Visualização de interações 2D de acoplamento molecular do ligante alicina com proteína model_01 <i>Babesia Caballi</i> , interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), interações pi-sulfur (linhas pontilhadas laranja) linhas pontilhadas também indicam as distâncias das interações em Angstroms. Figura obtida no aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	41
Figura 31 - Superfície de hidrofobicidade do complexo alicina com model_01 <i>Babesia Caballi</i> , as regiões mais positivas (marrons) representam a alta hidrofobicidade, e as negativas (azuis) as regiões de baixa hidrofobicidade, o rótulo numérico está em	

	Kcal/mol, os números acima das linhas tracejadas representam as distancias das interações em angstroms. Figura obtida no aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	42
Figura 32 -	Complexo PfAMA1-RON2 (3SRI), posicionamento do ligante alicina com o complexo PfAMA1-RON2 (3SRI) dentro do bolso de interação. A alicina aparece em magenta, enquanto a proteína AMA1 e o peptídeo RON2 aparecem em verde e cinza, respectivamente. Figura obtida através do aplicativo <i>DS-Visualizer Biovia</i>	43
Figura 33 -	Mapa de interações do complexo alicina/PDB 3SRI <i>Plasmodium falciparum</i> AMA1 em complexo com 29 aa PfRON2. Figura obtida através do aplicativo <i>LigPlotPlus</i>	44
Figura 34 -	Gráfico de estabilidade do RMSD do ligante alicina em interação com o complexo PfAMA1-RON2. Figura obtida através do programa <i>Grace</i>	45
Figura 35 -	Gráfico de estabilidade de energia de curto alcance do ligante alicina em interação com o complexo PfAMA1-RON2. Figura obtida através do programa <i>Grace</i>	45
Figura 36 -	Gráfico de flutuação de aminoácidos do ligante alicina em interação com o complexo PfAMA1-RON2. Figura obtida através do programa <i>Grace</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos Fármacos mais usados contra a Piroplasmose e sua ação.....	9
Tabela 2 - Resíduos conservados de aminoácidos que formam a superfície dos bolsões apicais, importantes na interação com RON2 para a formação da junção móvel, os resíduos com equivalente composição estão horizontalmente alinhados, (-) inexistência de resíduo de aminoácido. Figura obtida pelo autor. Fonte: (TONKIN et al., 2013).....	11
Tabela 3 - Resultados do <i>redocking</i> com a proteína PDB Id 3SRI Pf RON2, que teve como base a rodada 14.log da mesma proteína com a alicina – Figura obtida através do programa <i>DockThor</i>	25
Tabela 4 - Parâmetros usados no acoplamento do complexo alicina/PfRON2.....	31
Tabela 5 - Rodadas de Acoplamento.....	32
Tabela 6 - Interações da alicina com PfRON2 rodada 14.log.....	32
Tabela 7 - Parâmetros usados no Acoplamento do complexo alicina - 4APM-AMA1.....	35
Tabela 8 - Rodadas de Acoplamento.....	36
Tabela 9 - Interações da alicina com Bd/AMA1 rodada 12.log.....	36
Tabela 10 - Parâmetros usados no Acoplamento do complexo alicina - proteína <i>model_01Babesia Caballi</i>	39
Tabela 11 - Três melhores Rodadas no Acoplamento do complexo alicina - Proteína <i>model_01Babesia Caballi</i>	40
Tabela 12 - Interações da alicina em complexo com a proteína <i>model_01Babesia Caballi</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa aminoácido

Å Ångström

AMA1 Antígeno merozoite apical 1 (do inglês, *Apical Merozoite Antigen 1*)

Bd *Babesia divergens*

DM Dinâmica molecular

DMSO Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA Ácido desoxirribonucleico

ELISA (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

ERE Espécie reativa de enxofre

fs femtossegundo

GOLD Genetic Optimization of Ligand Docking

GPI Glicofosfato inositol

HB Ligação de hidrogênio (do inglês, *Hydrogen Bond*)

IFAT teste de imunofluorescência de anticorpos

JM junção móvel

K Kelvin

Kg Quilograma

Kcal/mol Quilocal por mols

LP Par isolado de elétrons (do inglês, *Lone Pair*)

MMFF94S Merck molecular force field 94S

M Molaridade

μM Micromol

MIC Concentração Mínima Inibitória (do inglês, *Minimal Inhibitory Concentration*)

MIC₅₀ Concentração mínima que inibe o crescimento de 50% da colônia de microrganismos

ms milissegundos

ns nanossegundo

NCI Interações não-covalentes (do inglês, *Non-Covalent Interactions*)

Nc *Neospora caninum*

NVE número constante de partículas, volume e energia

NPT número constante de partículas, pressão e temperatura

NVT número constante de partículas, volume e temperatura

μg/mL Microgramas por mililitro

μM Micromol

PBD Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank*)

PCR Reação da cadeia de polimerase (do inglês, *polymerase reaction chain*)

PDB ID Código identificador da estrutura no PDB

Pf *Plasmodium falciparum*

PH Potencial hidrogeniônico

PKA Cologarítimo da constante de ionização do ácido

PME Malha de Partículas Ewald (do inglês, *Particle Mesh Ewald*)

PBMCs células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *periferic blood monuclears cells*)

RBCs Hemácias, glóbulos vermelhos, (do inglês, *red blood cells*)

RMSD Raiz quadrada do desvio quadrático médio (do inglês, *Root Mean Square Deviation*)

RMSF Raiz quadrada da flutuação quadrática média (do inglês, *Root Mean Square Fluctuation*)

RNA Ácido ribonucleico

RON2 Proteína pescoço de roptria 2 (do inglês, *Rophtry Neck Protein 2*)

SARM *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Tg *Toxoplasma gondi*

TIP3P Água tipo três pontos, com parâmetros de carga para os três átomos

vdW vandervals

Ala Alanina

Arg Arginina

Asn Asparagina

Asp Aspartato

Cys Cisteina

Gln Glutamina

Glu Glutamato

Gly Glicina

His Histidina

Ile Isoleucina

Leu Leucina

Lys Lisina

Met Metionina

Phe Fenilalanina

Pro prolina

Ser Serina

Thr Treonina

Trp Triptofano

Tyr Tirosina

Val Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	2
3	JUSTIFICATIVA.....	23
4	OBJETIVOS.....	23
	4.1 Objetivos Gerais.....	23
	4.2 Objetivos Específicos.....	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
	5.1 Recursos Computacionais.....	24
	5.2 Redocking.....	24
	5.3 Obtenção do Ligante e Características.....	26
	5.4 Obtenção da Proteína.....	26
	5.5 Preparação do Sistema para o Acoplamento Molecular.....	27
	5.6 Construção de Proteína por Homologia.....	27
	5.7 Preparação do Sistema para Dinâmica Molecular.....	29
6	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
	6.1 Acoplamento Molecular.....	31
	6.1.1 Acoplamento do Ligante Alicina com <i>P. falciparum</i> RON2, PBD Id 3SRI. 31	
	6.1.2 Acoplamento do Ligante alicina com AMA1/ <i>Babesia Divergens</i> , PDB Id 4APM.	35
	6.1.3 Acoplamento do Ligante alicina com a proteína model_01 <i>Babesia Caballi</i> 39	
	6.2 Simulação de Dinâmica Molecular.....	43
7	CONCLUSÕES.....	47
8	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

A Piroplasmose é uma doença parasitária intra-eritrocitária transmitida por carrapatos de cavalos, o piroplasma pequeno de cavalos, conhecido há muito tempo como babesia equi, é associado com febre, anemia hemolítica e hemoglobinúria, perda de desempenho atlético e pode levar à morte, causada por *Babesia Caballi* ou *Theileria Equi* (FONSECA, 2012).

B. caballi e *T. equi* são apresentados tanto em regiões temperadas como tropicais, quatorze espécies de carrapatos ixodeos dos gêneros Dermacentor, Amblyomma cajennense (carrapato estrela) e Rhipicephalus foram identificadas mundialmente como vetores de *B. caballi* o primeiro, e os dois últimos associados à *T. equi*.

O diagnóstico da babesiosis conta com diferentes testes sorológicos tais como: ELISA-ensaio imunoenzimático e o teste de imunofluorescência de anticorpos, também a identificação do parasito pelo método microscópico, e os métodos moleculares como a PCR (*single round PCR, multiplex PCR e real time PCR*) (PITEL et al., 2010). O filo apicomplexa abriga mais de cinco mil espécies de protozoários parasitas, muitos dos quais causam séria morbidade e mortalidade em humanos e animais em todo o mundo.

A Babesiose é uma das doenças mais prevalentes em infecções de animais de vida livre, particularmente bovinos, enquanto neospora é um importante patógeno veterinário causando aborto prematuro em bovinos e doenças neurológicas fatais e defeitos em cães. Apesar da diversidade de hospedeiros e resultados de doenças, uma característica única de todos apicomplexas é seu estilo de vida intracelular obrigatório (VULLIEZ-LE NORMAND et al., 2012).

Assim, considerando a importância da doença no meio equestre, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de esclarecer as propriedades farmacológicas da alicina, através de experimentos e análises a nível molecular em proteínas invasoras de eritrócitos, das seguintes patologias: *Babesia Caballi* e *Theileria Equi*. Caracterizando suas interações entre ligante e proteína para posteriormente propor a criação de um novo produto biotecnológico à base de alicina, para que seja acrescentado à dieta alimentar de equinos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O período de incubação da piroplasmose equina associada a *T. equi* é de 12 a 19 dias e 10 a 30 dias quando causado por *B. caballi*, os sinais clínicos da piroplasmose equina são muitas vezes inespecíficos, e a doença pode ser facilmente confundida com outras condições hemolíticas semelhantes apresentando febre, anemia e icterícia, *T. equi* tende a causar doença mais grave do que *B. caballi*. A piroplasmose pode ocorrer de maneira pré-aguda, aguda, subaguda e formas crônicas, as taxas documentadas de letalidade variam de 10% a 50%, a maioria dos animais em áreas endêmicas sobrevivem à infecção.

Alguns dos apicomplexos (Fig.1) mais prevalentes são plasmodium, toxoplasma, babesia, e neospora, agentes etiológicos da malária, toxoplasmose, babesiose e neosporose, respectivamente. Mais de 250 milhões de casos de malária todos os anos resulta em pelo menos 1 milhão de mortes de seres humanos, e até um terço da população mundial de pessoas está cronicamente infectada com toxoplasma (PAULO; GRUBER, [s.d.]).

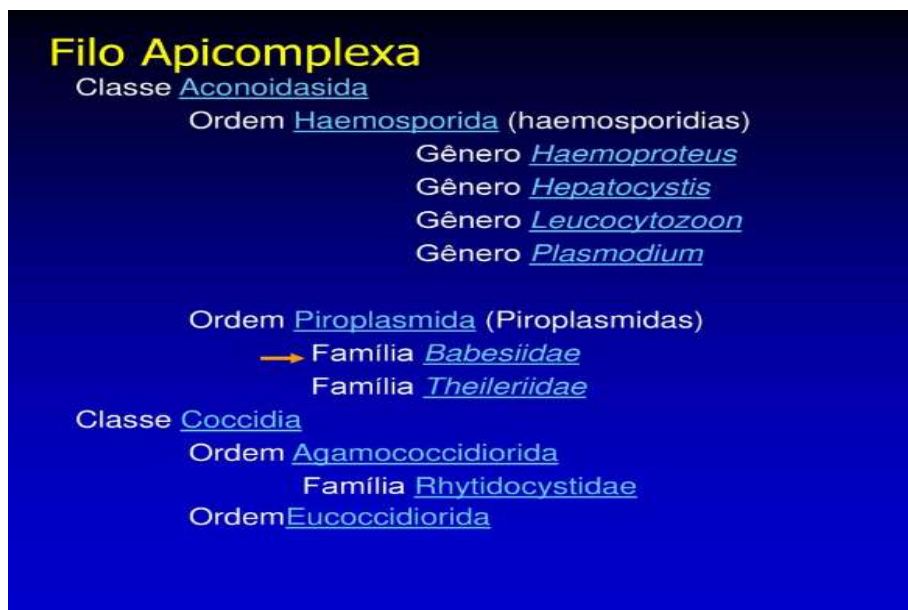


Figura 1 - Classificação do filo apicomplexa - Classificação taxonômica dos protozoários da piroplasmose. Fonte: (BACKX NORONHA MADEIRA, 2007)

Devido ser resistente à ação física e química, este agente o qual não sobrevive fora de seu hospedeiro, só pode ser transmitido através do vetor carrapato, portanto, parâmetros associados à resistência a ações físicas e químicas (temperatura, desinfetantes químicos e sobrevivência ambiental) não são significativos no seu combate. Esta doença é transmitida por carrapatos de

equídeos e sua presença requer um artrópode como vetor competente. Os animais infectados podem permanecer portadores desses parasitas sanguíneos por longos períodos e agir como fontes de infecção para outros carrapatos. A introdução de animais transportadores em áreas onde os vetores de carrapatos são prevalentes podem levar a uma disseminação epizootica da doença, seus hospedeiros são os cavalos, mulas, burros e zebras. Estudos sobre a possibilidade de transmissão transplacentária dos agentes da piroplasmose comprovaram que potros nascidos de cinco éguas positivas, apresentaram também esfregaços positivos para *Theileria equi*, contudo não foi possível comprovar a mesma situação para *B. caballi* (LISBOA, 2008).

Os esporozoítos de babesia invadem os glóbulos vermelhos e se transformam em trofozoítos que crescem e dividem-se em dois merozoítos redondos (Fig.02), ovais ou em forma de pera que por sua vez são capazes de infectar novos glóbulos vermelhos, e o processo de divisão é então repetido sucessivamente.

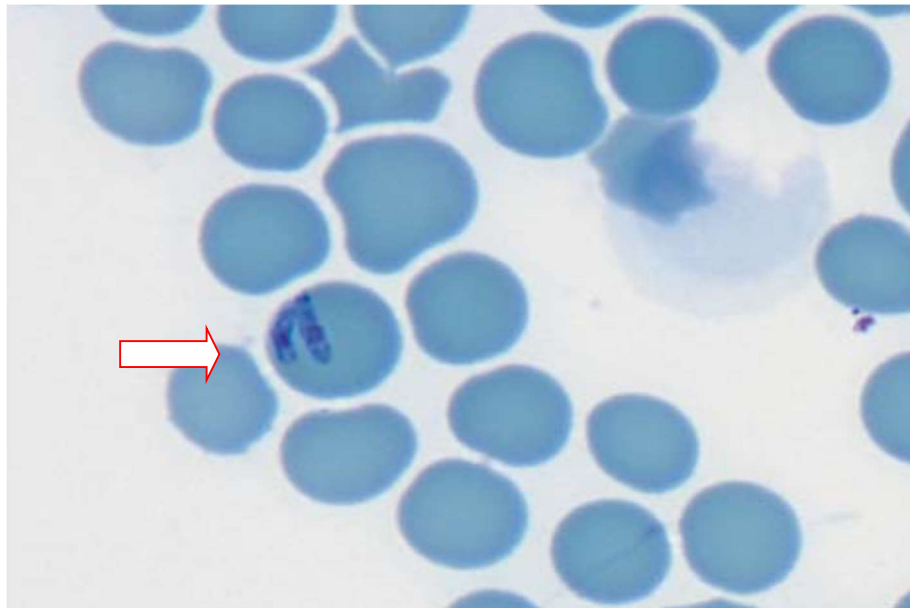


Figura 2 – *Babesia Caballi* - esfregaços de sangue equino, um eritrócito no centro contém dois grandes merozoítos intracitoplásmicos azulados alongados em forma de pera, ou células filhas (seta), típicos de *B. caballi*, (Manchas de - Grunwald-Giemsa) Fonte: (WISE et al., 2013).

Desta maneira, os esporozoítos de *T. equi* são inoculados em cavalos através de uma picada de carrapato e invadem os linfócitos, as formas intralinfocíticas desenvolvem-se e eventualmente formam esquizontes semelhantes a *babesia*; merozoítos liberados a partir desses esquizontes invadem os glóbulos vermelhos, se transformam em trofozoítos que crescem e se dividem em quatro merozoítos em forma de pera ("cruz maltesa") (Fig.3).

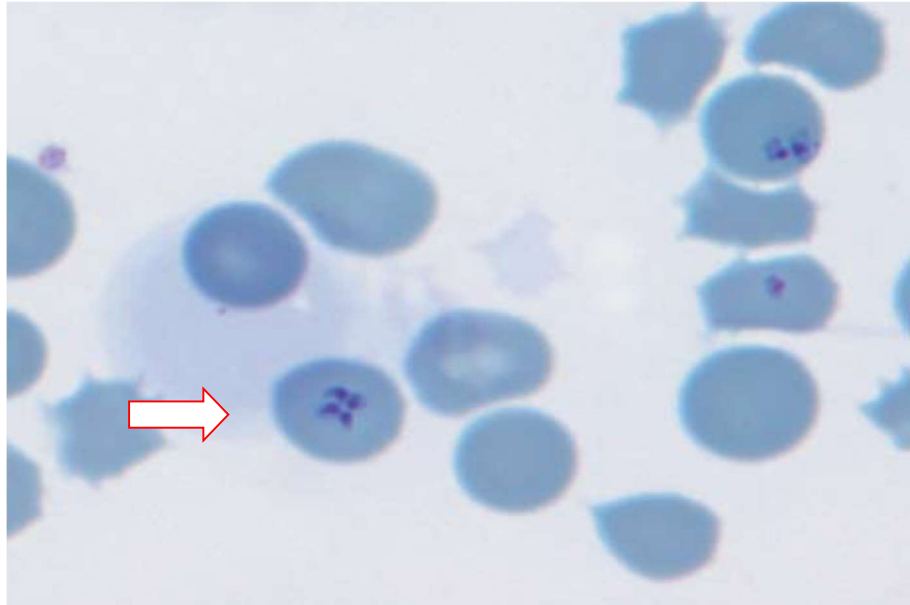


Figura 3 - *Theileria Equi* – esfregaços de sangue equino, poucos eritrócitos contêm pequenos merozóitos intracitoplasmáticos azulados de *T. equi*, posicionados numa formação típica de "cruz de malta" por quatro merozóitos agrupados (seta), (Manchas de - *Grunwald-Giemsa*), Fonte: (WISE et al., 2013).

A piroplasmose (Fig.4) causa inúmeras perdas econômicas com a perda de desempenho dos cavalos, seu diagnóstico, tratamento e medicação são fatores imprescindíveis para sua erradicação, é classificada como zoonose e uma ameaça para a saúde do componente humano utilizado em atividades hípcas (TARSO et al., 2005).

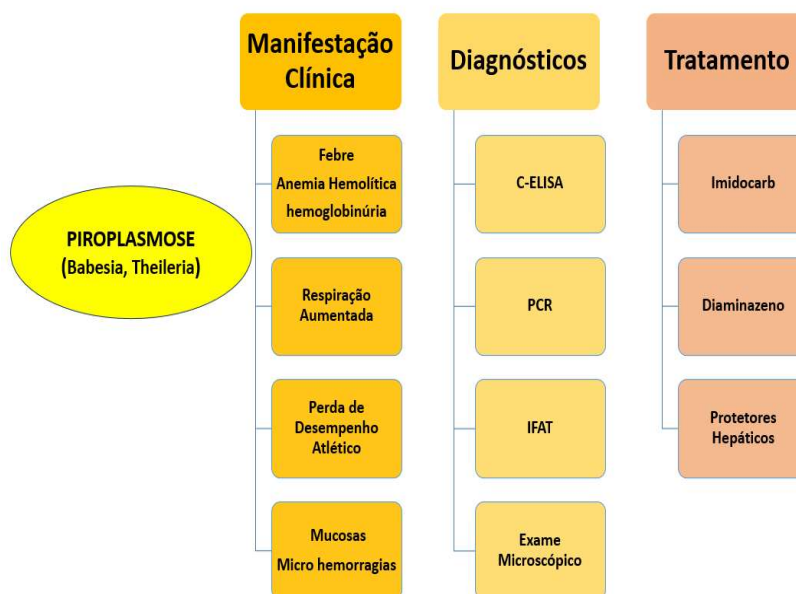


Figura 4 – Manifestação clínica, características e medicamentos existentes para o tratamento da *B. caballi* e *T. equi*. Figura elaborada pelo autor.

Sendo assim, a exportação de cavalos de países onde a doença é endêmica enfrenta problemas, pois a maioria dos países exige exames de piroplasmose para a entrada de animais, ao contrário do Brasil. Cavalos atletas têm sido cada vez mais exportados, tanto para venda, quanto para participação em competições e, nestes casos, é comum serem impedidos de entrar em outros países.

A prevenção da babesiose consiste numa medida importante, principalmente em regiões endêmicas, entretanto, não é um procedimento fácil e de rápido resultado. A principal forma de erradicação desses carrapatos é a aspersão de carrapaticidas periodicamente, com a finalidade de interromper o ciclo de vida (Fig.5) até que a incidência de casos seja menor (J.G. BERNARDI SOARES; F. M. ARAÚJO - MOREIRA, 2023).

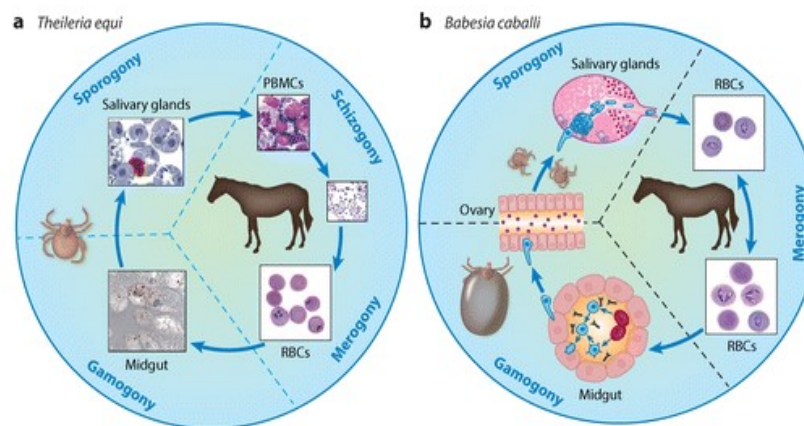


Figura 5 – Ciclo de vida de *T. equi* no vetor carrapato e cavalo (a). (b) Desenvolvimento de *B. caballi* no vetor carrapato e cavalo. Abreviaturas: PBMCs (células mononucleares do sangue periférico); RBCs (Hemácias, glóbulos vermelhos). Fonte: (SCOLES; UETI, 2015) .

As babesioses são consideradas endêmicas em 90% de todo o mundo, com apenas o Canadá, Estados Unidos, Austrália, Japão, Inglaterra e Irlanda a não serem considerados endemicamente afetados (RICHTER, 2017).

A localização do parasita da *babesia* (Fig.6) na sua forma periférica é nos eritrócitos dos vasos sanguíneos, chamada de alta parasitemia, causando hemoglobinúria e anemia hemolítica.

Já na forma viscerotrópica os eritrócitos infectados adentram aos capilares de diferentes órgãos: fígado, baço e cérebro, temos a chamada baixa parasitemia associada a formação de trombos frequentemente associados à forma cerebral, os trofozoítos medem 2,5µm a 5,0 µm.

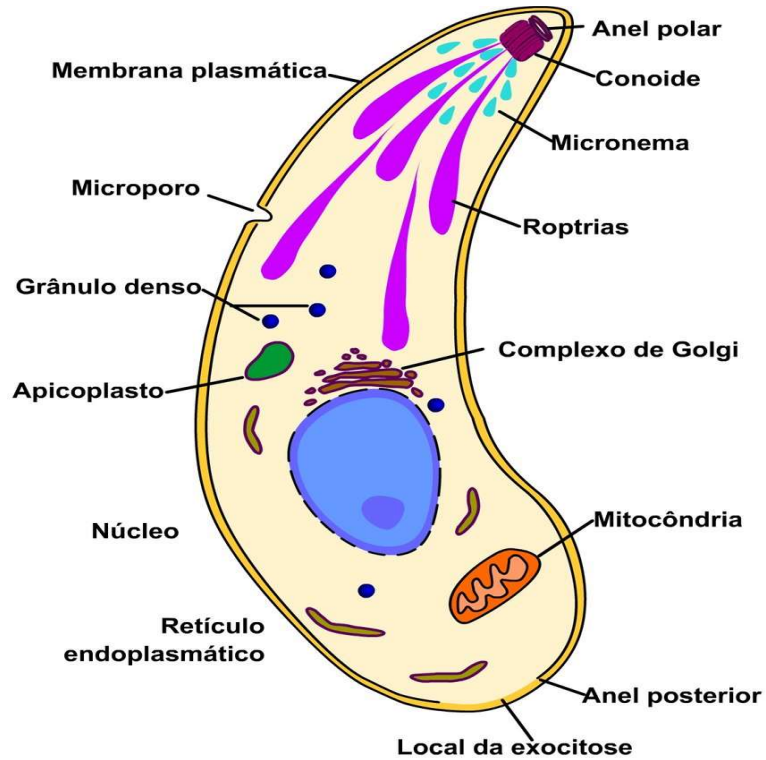


Figura 6 - Estrutura do parasita do filo apicomplexa. Fonte: (TONKIN, 2014).

Esses organismos (Fig.7) são chamados de apicomplexas porque os estágios móveis, infecciosos portam um complexo apical anterior que se prende ou que penetra no interior da célula hospedeira.

Este complexo apical, é bem desenvolvido porque consiste em um conoide anterior, em um ou dois anéis polares, em duas ou vinte estruturas glandulares na forma de garrafas (roptrias), além de numerosos túbulos derivados da membrana do complexo de golgi (micronemas). O conóide está aberto em ambas as extremidades e também é envolvido pelos anéis polares que se conectam com microtúbulos subpeliculares. Os micronemas possuem enzimas que são utilizadas para penetrar na célula hospedeira, porém as funções dos outros componentes celulares ainda não estão bem claras para a ciência. Os apicomplexos tem flagelos que ocorrem nos seus microgametas, mas são carentes de cílios e pseudópodes (VOMMARO; ATTIAS; DE SOUZA, 2014).

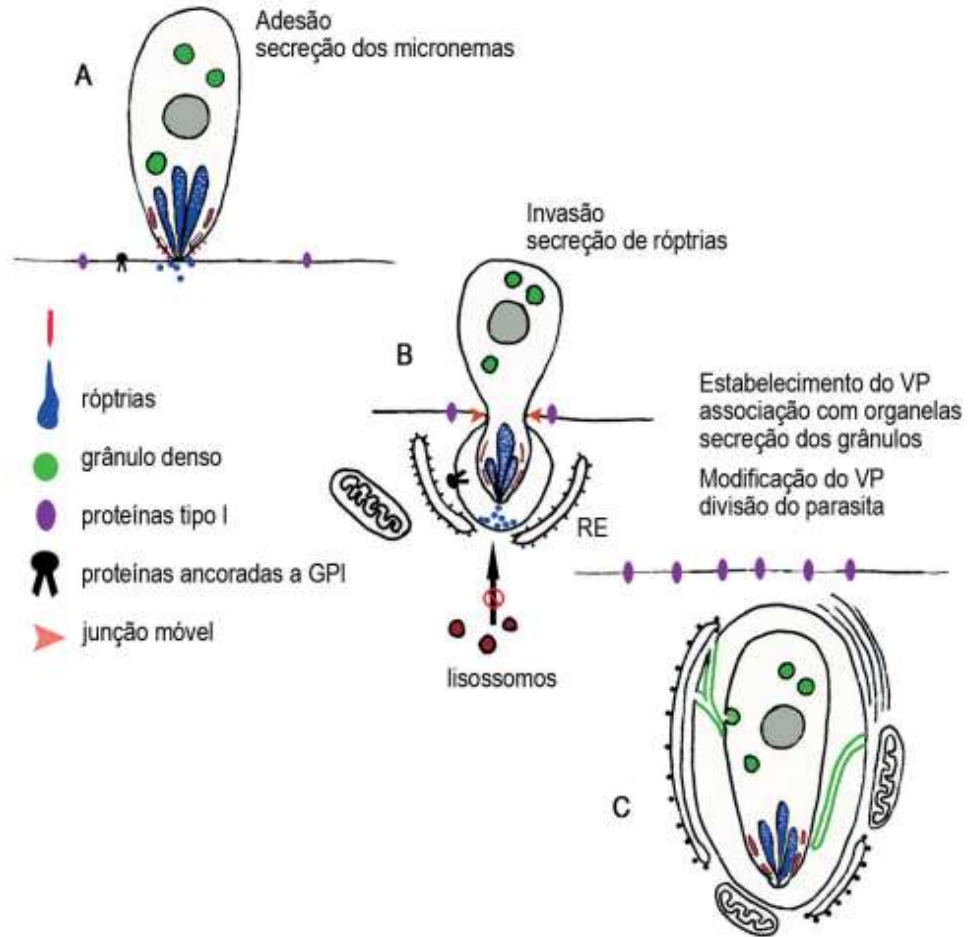


Figura 7 - Adesão do parasita à membrana da célula hospedeira pelo polo apical. Fonte: (VOMMARO; ATTIAS; DE SOUZA, 2014).

A atuação do parasita ocorre também em várias células de mamíferos (Fig.8). Entrada (A) Taquizoíta com o conoide protuberante (seta) aderido a uma célula em cultivo. (B) a (F) Aspectos da invasão da célula hospedeira. (B) A porção apical do parasita já não é visível. Expansões filiformes da membrana da célula hospedeira envolvem o parasita progressivamente, engolfando-o (setas). (C) Dois parasitas sendo internalizados por um macrófago através de expansões tubulares (setas). Em pelo menos um deles, o conoide, é visível (cabeça de seta), indicando que a invasão não é ativa neste caso. (D) Taquizoíta com metade do corpo celular já dentro da célula hospedeira. O estreitamento do corpo celular no ponto de passagem pela junção móvel (setas) confere ao parasita a forma de ampulheta. (E) Parasita quase completamente internalizado por uma célula fagocítica onde as expansões filiformes da membrana envolvem a porção ainda exterior do parasita (seta). (F) Toxoplasma penetrando uma célula epitelial em cultura. O estrangulamento na região da junção móvel é nítido (setas). Barras: 1 μ m.(VOMMARO; ATTIAS; DE SOUZA, 2014)

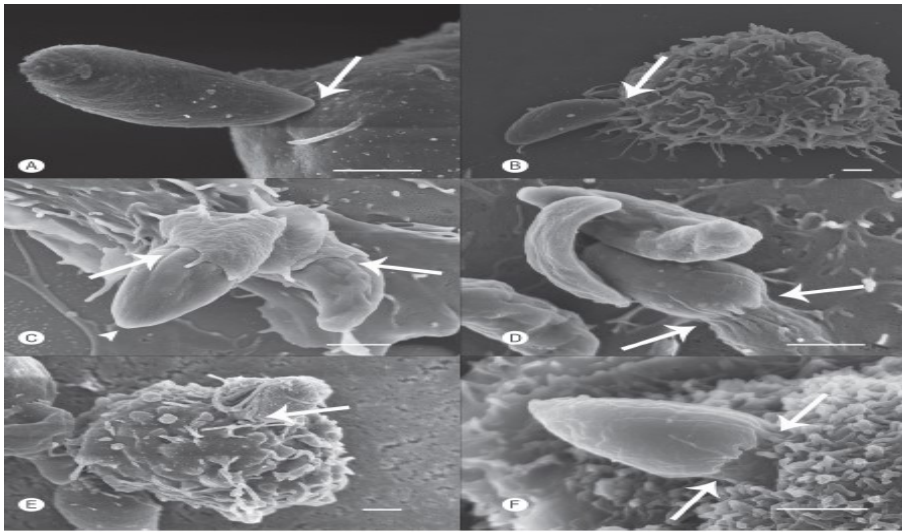






Figura 8 - Sequência de imagens em microscopia eletrônica de varredura da interação e desenvolvimento de *Toxoplasma gondi* em diferentes células de mamíferos, barras de escala: 1 μm . Fonte: (VOMMARO; ATTIAS; DE SOUZA, 2014)

O tratamento da babesiose se baseia no uso de uma babesicida e terapia de suporte. As drogas babesicida mais utilizadas em todas as espécies são o dipropionato de imidocarb e o diminazeno (Tab. 1); como a terapia de suporte usa-se terapia fluida, transfusão sanguínea e tetraciclina, quando há coinfeção com anaplasma ou ehrlichia. O mais recomendado em uso no mercado é o dipropionato (um derivado carbanilide) (BATIHA et al., 2020) deve ser administrado a uma dosagem de 2 mg / kg de peso corporal por 2 dias em casos de infecção *B. caballi*, e numa dosagem de 4 mg / kg de peso corporal em quatro dosagens no prazo de 72 horas em casos de infecção por *T. equi* (FRITZ, 2010).

Tabela 1 - Descrição dos Fármacos mais usados contra a Piroplasmose e sua ação.

Família	Fármacos	Mecanismo de Ação em Piroplasmose
Antiparasitários		DIMINAZINE B12 Atua a nível de DNA no núcleo paralisando o parasita para posterior fagocitação pelo sistema imune
Antiparasitários		IMIZOL Ação da carbanilida na glicólise do parasita
Antiparasitários		IMIDOCARB Atua na síntese de ácidos nucleicos provocando desnaturação do DNA
hematoprotetor		HEP VET Recuperação Metabólica

Consequentemente, esses parasitas engenhosos desenvolveram mecanismos altamente sofisticados para invadir uma ampla gama de células hospedeiras. A invasão das células hospedeiras pelos parasitas apicomplexos intracelulares é um processo obrigatório, incluindo plasmodium (malária) e toxoplasma (toxoplasmose), e requer um mecanismo passo a passo único entre as interações patógeno-hospedeiro conhecidas. Um passo fundamental é a formação do complexo junção móvel (JM), uma constrição circunferencial entre a ponta apical do parasita e a célula hospedeira na membrana, que atravessa em direção posterior, para envolver o parasita em um vacúolo protetor essencial para a sobrevivência intracelular. A montagem da JM propõe que a proteína *Rophtry Neck Protein 2* (RON2) seja secretada na célula hospedeira e integrada na membrana (Fig. 9), onde serve como o receptor para o antígeno de membrana apical 1

(AMA1) na superfície do parasita, portanto a interação AMA1-RON2 é um alvo eficaz para inibir a invasão pelo parasita apicomplexa (MONTERO et al., 2009).

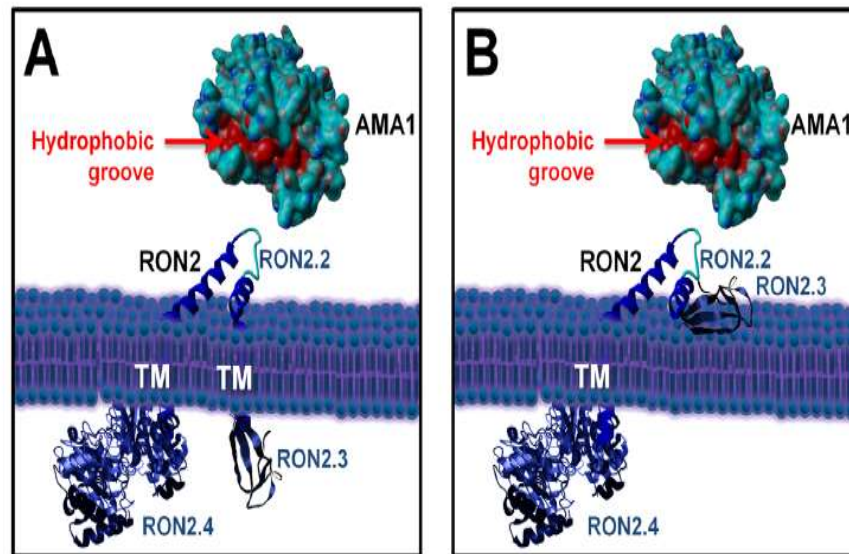


Figura 9 - Interações AMA1/Ron2 - Modelos alternativos da interação RON2-AMA1 no MJ. (A) com o domínio TgRON2 C-terminal exposto dentro do hospedeiro/célula; (B) com o domínio C-terminal do TgRON2 exposto externamente Fonte: (LAMARQUE et al., 2011).

Portanto, o modelo de montagem da JM (junção móvel) propõe que a proteína 2 (RON2) é secretada na célula hospedeira e integrada na membrana onde serve como receptor do antígeno de membrana apical 1 (AMA1) (Fig.10) na superfície do parasita, e que a interação AMA1-RON2 é um alvo efetivo para inibir a invasão de parasitas do filo apicomplexa.

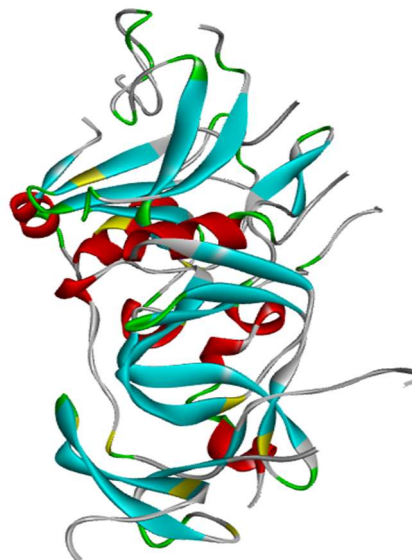


Figura 10 - Estrutura cristalográfica da Proteína PDB Id 4APM AMA1/Babesia Divergens em amarelo destaque dos sítios ativos. Figura obtida no aplicativo *DS Visualizer 2.0*.

Recentes avanços na caracterização da AMA1 dos parasitas apicomplexos *Babesia divergens* (BdAMA1) e *Neospora caninum* (NcAMA1) por cristalografia de raios x. oferecem informações sobre o sulco superficial de ligação de RON2 no domínio apical AMA1, que mostra evidências claras de coevolução receptor-ligante e hiper variabilidade proximal do domínio da membrana, que no plasmodium é responsável pela ligação direta aos eritrócitos (LAMARQUE et al., 2011).

Incorporando a análise estrutural de BdAMA1 e NcAMA1 com estruturas e complexos AMA1 existentes foram capazes de definir bolsões de resíduos conservados no sulco apical AMA1 que poderiam ser direcionadas para o desenho de fármacos (Tab.2) (TONKIN et al., 2013).

Estes resíduos formadores dos bolsões de AMA1 são extremamente importantes, pois fazem interação com RON2 para posterior formação da junção móvel e invasão do eritrócito.

Tabela 2 - Resíduos conservados de aminoácidos que formam a superfície dos bolsões apicais, importantes na interação com RON2 para a formação da junção móvel, os resíduos com equivalente composição estão horizontalmente alinhados, (-) inexistência de resíduo de aminoácido. Figura obtida pelo autor. Fonte: (TONKIN et al., 2013).

<i>Tg</i> AMA1	<i>Nc</i> AMA1	<i>Bd</i> AMA1	<i>Pf</i> AMA1	<i>Pv</i> AMA1
Bolsão 1				
Val 105	Val 104	Val 126	Val 137	Val 82
Tyr 110	Tyr 104	His 131	Tyr 142	Tyr 87
Ala 203	Ala 197	Pro 225	Pro 226	-
Tyr 213	Tyr 207	Tyr 233	Tyr 234	Tyr 179
Tyr 215	Tyr 209	Tyr 235	Tyr 236	His 181
Bolsão 2				
Val 142	Ile 136	Ile 157	Val 169	Val 114
Pro 143	Pro 137	Ser 158	Ala 170	Ala 115
Tyr 230	Ser 224	Phe 250	Tyr 251	Tyr 196
Bolsão 3				
Leu 161	Met 155	Phe 169	Phe 183	Phe 128
Phe 163	Phe 157	Pro 170	Thr 186	Ala 131
Thr 165	Thr 159	-	Phe 188	His 134
Ile 171	Ile 165	Leu 195	Met 190	Ile 135
Thr 201	Thr 195	Ile 223	Met 224	Phe 169
Met 204	Met 198	Ala 226	Asp 227	-

Tyr 215	Tyr 209	Tyr 235	Tyr 236	His 181
Ile 228	Ile 222	Ile 248	Ile 249	Met 194

A ligação do peptídeo RON2 ao bolsão hidrofóbico de AMA1 é necessária para desencadear a formação da junção móvel. A junção fornece uma âncora firme para o parasita se puxar para dentro do eritrócito usando seu motor de actina-miosina. Ao contrário das outras etapas da invasão que usam proteínas funcionalmente redundantes, há apenas um AMA1 e RON2 no plasmodium e não há vias alternativas. Além disso, a região correspondente ao peptídeo RON2 e os resíduos-chave no bolsão hidrofóbico de AMA1 está a Phe169 que é necessária para a ligação RON2, este resíduo é conservado entre todos os organismos isolados de *P. falciparum* e *B. divergens* isso indica uma restrição funcional que governa uma etapa essencial na invasão e representa um novo alvo que pode ser potencialmente explorado para a terapia antimalárica.

As ligações de hidrogênio desempenham um importante papel nas interações Proteína-ligante AMA1-RON2, bem como a ligação dissulfeto presente.

Estudos anteriores identificaram uma ligação dissulfeto com 13 resíduos de aminoácidos em RON2 (Cys, Trp, Tyr, Tyr, Arg, Met, Ser, Pro, Pro, Met, Glu, Ile, Cys), sendo que a ligação dissulfeto de RON2 está voltada para o centro da fenda hidrofóbica de AMA1 que foi identificada como o principal ponto de acesso para ligação de moléculas pequenas. A ligação dissulfeto altamente conservada entre Cys2037 e Cys2049 ajuda a estabilizar a estrutura antiparalela *b-hairpin* do polipeptídeo (VULLIEZ-LE NORMAND et al., 2012).

A alicina (dialiltiosulfinato) é uma molécula de defesa do alho (*Allium Sativum L.*) com uma ampla gama de atividades biológicas. A alicina é produzida após dano tecidual do aminoácido não proteínogênico aliina (sulfóxido de S-alilcisteína) em uma reação que é catalisada pela enzima alinase.

A alicina é uma espécie reativa de enxofre (ERE) com propriedades oxidantes, e é capaz de oxidar tióis em células, e também resíduos de glutathiona e cisteína em proteínas. Um conjunto de glutathiona mais oxidado leva a um maior potencial redox celular (Fig.11).

A oxidação de tióis proteicos pode levar a alterações na estrutura da proteína, por exemplo, através da formação de ligações dissulfeto, acionado por redox as mudanças estruturais nas proteínas podem levar à perda ou ganho de função. Tais efeitos já são conhecidos pela proteína vegetal NPR1, que é uma proteína chave na imunidade desencadeada por patógenos em leveduras (*S. cerevisiae*) (BORLINGHAUS et al., 2014).

Sendo um tiosulfinato, a alicina é um enxofre reativo (EER) e sofre uma reação redox com grupos tiol em glutathiona e proteínas que é considerado essencial para sua atividade

biológica. A alicina é fisiologicamente ativa em células microbianas, vegetais e de mamíferos. De maneira dependente da dose, a alicina pode inibir a proliferação de bactérias e fungos que matam células imediatamente, incluindo resistência a antibióticos e cepas como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (SARM). Além disso, em linhas celulares de mamíferos, incluindo células cancerígenas, a alicina induz a morte celular e inibe a proliferação (BORLINGHAUS et al., 2014).

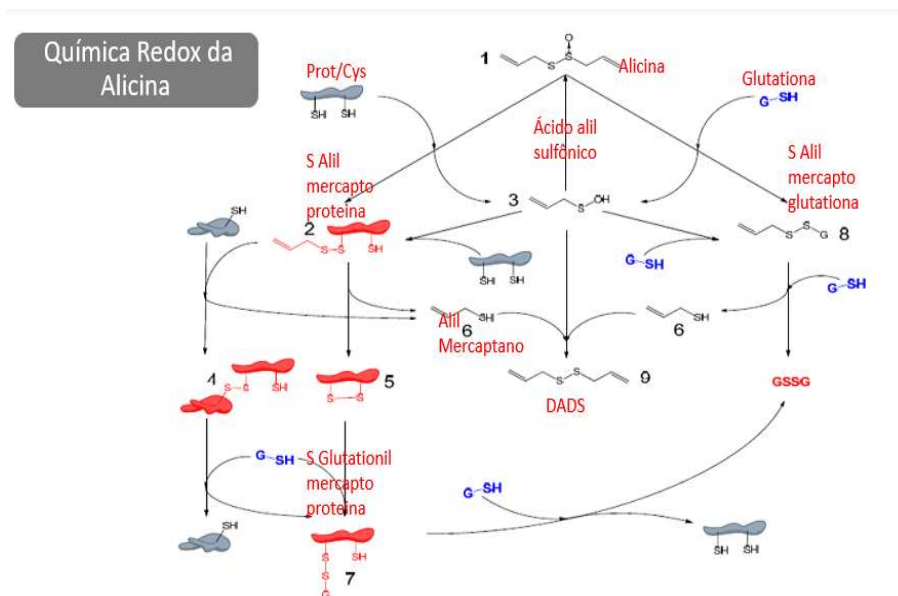


Figura 11 – Propriedades químicas e biológicas da alicina Fonte: (BORLINGHAUS et al., 2014).

Quando a alicina entra em contato com uma bicamada lipídica, como uma membrana celular, ela pode interagir com os lipídios de várias maneiras:

Em primeiro lugar, a alicina é um composto hidrofóbico, o que significa que é solúvel em solventes apolares, como lipídios, como resultado, a alicina pode particionar-se na região hidrofóbica da bicamada lipídica. Uma vez dentro da bicamada, a alicina pode interromper a organização dos lipídios e causar alterações na fluidez e permeabilidade da membrana.

Em segundo lugar, a alicina pode interagir com os grupos de cabeça polar dos lipídios e o átomo de enxofre na alicina pode formar ligações de hidrogênio com os grupos polares dos lipídios, como os grupos fosfato dos fosfolipídios, e resíduos de aminoácidos polares, essa interação também pode afetar a organização e fluidez da membrana.

Além desses efeitos, a alicina demonstrou induzir danos à membrana e lise em células bacterianas. Acredita-se que isso seja devido à capacidade da alicina de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos oxidativos aos lipídios e proteínas na membrana (LOI et al., 2019). As propriedades antimicrobianas da alicina foram sugeridas devido à sua interferência específica com as enzimas que contêm sulfidril.

As cisteíno proteases são proteínas presentes nos diferentes organismos e possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo, nos patógenos agem no desequilíbrio das funções biológicas do hospedeiro (regulação bioquímica e fisiológica), e estão envolvidas em várias doenças e por esta razão são alvos de grande interesse (SANTOS, 2007).

O presente relato apresenta evidências do efeito inibitório que a alicina pura tem sobre a capacidade de inativar trofozoítos amebianos que destroem as monocamadas de células renais de hamster, e na inativação das várias cisteína proteases, enzimas que demonstraram serem contribuintes importantes para a virulência amebiana e para a degradação de partículas de alimentos dentro dos vacúolos amebianos (ANKRI et al., 1997).

Em geral, a interação da alicina com a bicamada lipídica é complexa e multifacetada, envolvendo interações hidrofóbicas e polares e danos oxidativos. Essas interações podem ter uma série de efeitos sobre a membrana, incluindo fluidez, permeabilidade e alterações de integridade. Uma vez que a alicina rompe a membrana, pode causar vazamento de conteúdo celular, o que leva à morte celular. Este mecanismo de ação não se limita a um tipo particular de organismo e é eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como outros tipos de organismos, como protozoários.

Em resumo, a capacidade da alicina de romper membranas é devido à sua interação com a bicamada lipídica, que causa alterações na estrutura e fluidez da membrana, levando a danos na membrana e morte celular. Esse mecanismo de ação faz da alicina um potente agente antimicrobiano com atividade de amplo espectro.

A nível de DNA e RNA (Fig. 12) a alicina interfere no enovelamento das proteínas que contêm resíduos de enxofre, alterando sua estrutura e por consequência sua função (BORLINGHAUS et al., 2014).

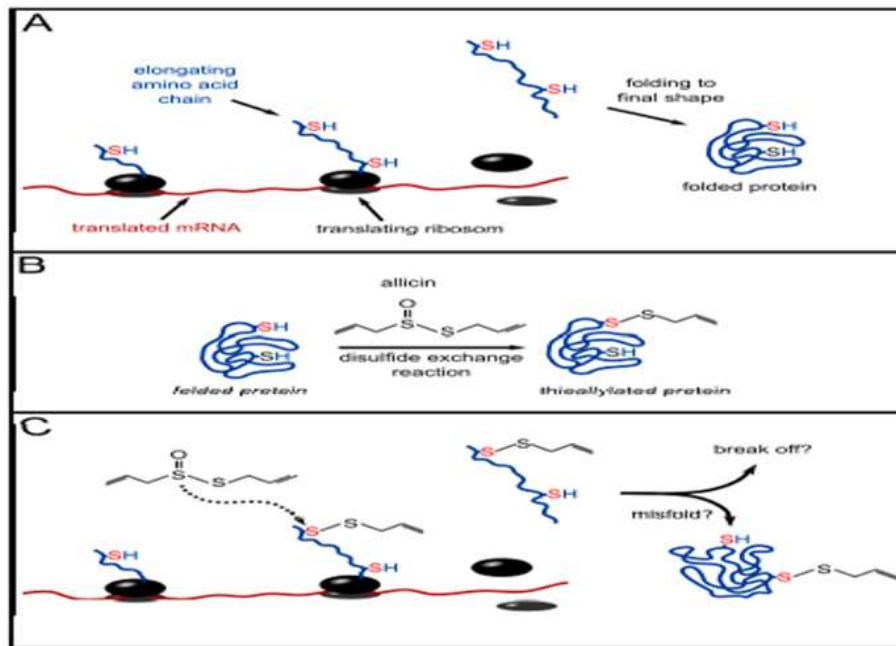


Figura 12 - Atuação da alicina no DNA.RNA e Proteínas. Fonte: (BORLINGHAUS et al., 2014).

A alicina é um ingrediente ativo do alho que tem atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiprotozoária.

Segundo Salama et All 2014, a alicina foi testada como um potente inibidor contra o crescimento in vitro de parasitas da babesia em bovinos e equinos e o crescimento in vivo de babesia microti em um modelo de camundongo. O crescimento in vitro de babesia bovis, babesia bigemina, *B. caballi* ou *T. equi* foi inibida pela alicina, com os valores de IC50: de 818, 675, 470 e 742 μM , respectivamente. Além disso, a alicina inibiu significativamente ($P < 0,001$) invasão de *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi* e *T. equi* no eritrócito hospedeiro.

A alicina foi documentada no início como um agente terapêutico contra uma ampla gama de doenças infecciosas tendo como alvo a patogênica cisteína protease, pois são essenciais para os processos de invasão e mediam a clivagem de proteínas de micronemas (SALAMA et al., 2014).

Os valores de IC50 de alicina para os parasitas da babesia foram menores do que os do metronidazol contra *B. gibsoni*, *B. bovis* e *B. bigemina*.

Portanto, os potenciais efeitos inibitórios da alicina sobre merozoítos livres foram avaliados em um ensaio de invasão, a alicina inibiu significativamente o eritrócito do hospedeiro de parasitas em taxas de 59 % a 75 %. Consistentemente, a alicina com uma concentração de 50 μM inibiu a invasão de esporozoítos de Plasmodium em hepatócitos hospedeiros.

Em estudos de (SALAMA et al., 2014), testes de viabilidade subsequentes não mostraram recrescimento de parasitas em concentrações de alicina de 4.000 μM para *B. bovis* e *B. caballi*, 2,000 μM para *B. bigemina*, e 5.000 μM para *T. equi*.

Babesia tratada com alicina mostrou alterações morfológicas, incluindo formas degenerativas ou pontilhadas em contraste com parasitas controles não tratados.

Pré-tratamento de altas concentrações de alicina com bovinos e hemácias equinas não apresentaram diferença no padrão de crescimento de hemácias pré-tratadas com alicina quando comparadas com DMSO ou não pré-tratadas, isso indica que a alicina não tem efeito hemolítico nas hemácias bovinas ou equinas.

Experimentos *In Vitro* com parasitas de *Babesia* tratados com alicina, no terceiro dia do experimento. *B. caballi*: a. controle b. 100 μ M de alicina; *T. equi*: c. controle d. 50 μ M de alicina; as culturas tratadas apresentam um alto número de parasitas degenerados. (Fig. 13)

Fonte: (SALAMA et al., 2014).

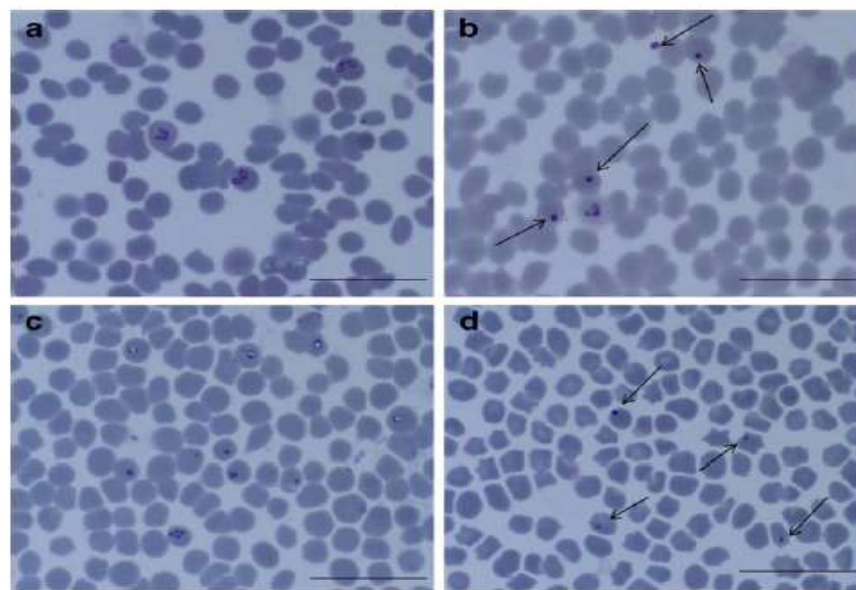


Figura 13 - Lâmina de esfregaço sanguíneo de cultura *In Vitro* de parasitas de *B. caballi* e *T. equi*. Barra de escala 10 μ m. Fonte: (SALAMA et al., 2014).

As interações não covalentes, também conhecidas como interações fracas, desempenham um papel fundamental em vários processos biológicos, químicos e físicos (Fig.14). Ao contrário das ligações covalentes, que envolvem o compartilhamento de elétrons entre átomos, as interações não covalentes surgem de forças eletrostáticas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e outras forças relativamente mais fracas e também incluem a presença de metais e íons. Essas interações são essenciais para manter a estrutura, estabilidade e funcionalidade de moléculas e materiais.

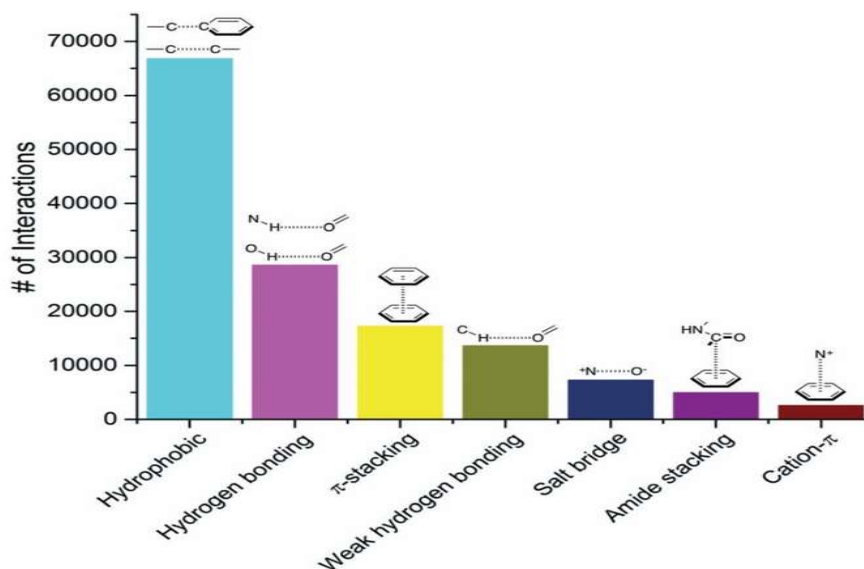


Figura 14- Frequência de distribuição das interações não covalentes mais comuns observadas em Proteína-Ligante extraídas do PDB (*Protein Data Bank*) Figura obtida através do site: <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/>

Entretanto, as interações não-covalentes correspondem a regiões entre átomos próximos no espaço onde as nuvens eletrônicas interagem, a distâncias inferiores à soma dos raios de van der Waals, mas superiores à soma dos raios covalentes dos átomos (ou sistemas π interagindo (SILVA.RUI, 2019).

As interações não covalentes contribuem coletivamente para o dobramento de proteínas, a ligação de enzimas a substratos, a automontagem de estruturas supramoleculares e muitos outros fenômenos biológicos e químicos. Compreender essas interações é essencial para campos como biologia molecular, *design* de medicamentos, ciência de materiais e nanotecnologia.

Cientificamente a química medicinal define que o evento de reconhecimento molecular é aquele em que uma molécula hospedeira é capaz de formar um complexo com uma molécula hóspede, e assim tal evento é geralmente categorizado como química supramolecular. Qualquer processo de reconhecimento molecular ocorre através de uma série de interações entre as duas moléculas, ou seja, proteína (= receptor) e ligante (DAVIS; TEAGUE, 1999).

Uma variedade de ligantes interagem com proteínas em muitos processos biológicos; complementaridade de forma, forças eletrostáticas e hidrofóbicas são os principais fatores que governam essas interações.

Sendo assim, as interações entre um ligante e uma biomolécula são de natureza eletrostática e chamadas de interações não-covalentes, em abordagem da mecânica clássica podem ser caracterizadas por uma função potencial entre duas entidades carregadas ou com

dipolo. Algumas, como as ligações de hidrogênio, são interações direcionais, facilitando a sua determinação e o cálculo da respectiva energia (ERMONDI; CARON, 2006).

Uma ligação de hidrogênio (HB, do inglês *Hydrogen Bond*) corresponde à associação entre um par de elétrons não-ligados de um átomo eletronegativo e um átomo de hidrogênio (Fig.15), que se encontra covalentemente ligado a outro átomo relativamente eletronegativo (IUPAC, 1997). A energia de ligação numa HB é tipicamente inferior a 25,0 kcal/mol (SILVA.RUI, 2019).

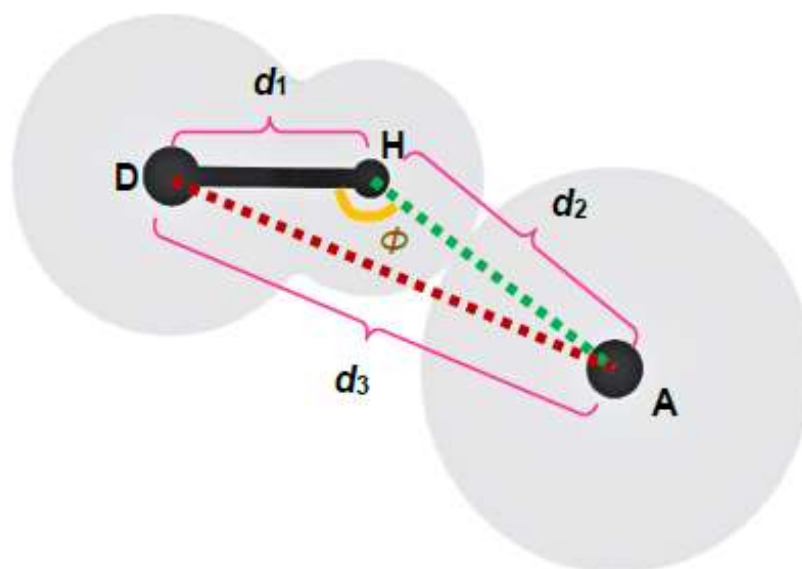


Figura 15 - Ligação de Hidrogênio - Descritores geométricos de uma ligação de hidrogênio (HB): d_1 – distância da ligação D-H; d_2 – distância da ligação de hidrogênio (H-A); d_3 – distância D-A; Φ – ângulo entre D-H e H-A. H = átomo de hidrogênio; A – átomo aceitador da ligação de hidrogênio; D – átomo doador do hidrogênio para a ligação de hidrogênio. Raios de van der Waals de cada átomo representados em sobra cinzenta. Fonte: (SILVA.RUI, 2019).

Em 1894, Emil Fischer escreveu: "Para usar uma imagem, eu gostaria de dizer que enzima e glicosídeos têm que caber uns aos outros como uma fechadura e chave, a fim de exercer um efeito químico um no outro." Naquela época, a visão predominante era a de que as enzimas eram carboidratos e nada se sabia sobre o sítio ativo.

O poderoso modelo de Fischer explicou as observações experimentais produzidas por pesquisadores na época e a teoria permaneceu aceita por 60 anos. Novas Técnicas experimentais permitiram aos pesquisadores sondarem mais a ação enzimática de perto, surgiram várias observações experimentais que não se encaixavam com o modelo 'fechadura e chave'.

Em prosseguimento, outros trabalhos na década de 1930, de J.B.S. Haldane, desenvolveram a ideia de que a catálise da enzima estava confinada a uma pequena região chamada sítio ativo. Ele sugeriu que a maior parte da enzima não tinha outra finalidade senão

manter os grupos de sítios ativos na posição correta. Foi também nessa época que os cientistas descobriram que todas as enzimas eram proteínas e que eram responsáveis por todas as substâncias químicas reações dentro das células.

Mais tarde, no final da década de 1950, o bioquímico, chamado Daniel Koshland, começou a pensar que o modelo 'Fechadura e Chave'(Fig.16) exigia algumas modificações. Ele percebeu que a observação da inibição não competitiva não se coadunava com a teoria existente.

Segundo Koshland, como poderia uma molécula que se liga a um local longe do local ativo interferir na ligação do substrato?

Sendo assim, ele propôs uma nova teoria – o modelo de "ajuste induzido"(Fig.16). Seu modelo previu que a ação enzimática requer a orientação precisa dos grupos catalíticos no site ativo. Quando o substrato se liga, provoca uma mudança perceptível na posição tridimensional dos aminoácidos no sítio ativo. Isso traz os grupos catalíticos na posição necessária para que a catálise ocorra. Um não-substrato a molécula, mesmo que pudesse se ligar, não traria a necessária mudança na forma da enzima (KOSHLAND, 1994).



Figura 16 - Modelos de Interação Enzima- Substrato. Fonte: (PEDRO, 2022).

Embora, contudo, inicialmente, Koshland teve dificuldade para publicar as suas ideias em periódicos científicos. Mais tarde, com mais evidências experimentais outros cientistas gradualmente viram o poder explicativo da teoria e o apoio às observações que vieram de seus experimentos. As evidências foram inicialmente indiretas; por exemplo: certos produtos químicos, conhecidos por não se ligarem ao sítio ativo, alteraram a ligação e a catálise do substrato.

Porém a evidência direta da flexibilidade das enzimas teve que esperar o refinamento de uma nova técnica experimental – A cristalografia de raio -x em proteínas.

Em 1957, Kendrew usou cristalografia de raios x para produzir o primeiro modelo de baixa resolução de uma proteína, a mioglobina. Como esta nova tecnologia melhorou, permitiu que os cientistas medissem os movimentos muito pequenos de grupos químicos no sítio ativo. Com a pesquisa se tornando mais técnica, envolvendo conhecimentos especializados de ramos outrora separados da ciência, a colaboração entre químicos, biólogos, matemáticos, físicos e engenheiros foi essencial (KENDREW, 1963).

A metodologia de acoplamento molecular com seus vários programas de uso, são mundialmente empregados, e visam prever os modos de ligação e afinidades de pequenas moléculas dentro do sítio de ligação de alvos de receptores específicos, e é atualmente usado como uma ferramenta computacional padrão no desenho de drogas para otimização de compostos e em estudos de triagem virtual para encontrar novas moléculas biologicamente ativas. As ferramentas básicas de uma metodologia de acoplamento molecular inclui um algoritmo de busca e uma função de pontuação de energia para gerar e avaliar o ligante e suas poses (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Desta forma, o acoplamento molecular consiste em três objetivos principais conectados: previsão de pose, triagem virtual e estimativa de afinidade de ligação. Uma metodologia de docagem bem-sucedida deve ser capaz de prever corretamente a pose do ligante nativo dentro do local de ligação do receptor (ou seja, para encontrar a geometria do ligante experimentalmente dentro de um certo limite de tolerância) e interações moleculares físico-químicas associadas.

No acoplamento molecular, algoritmos de busca são usados para explorar a disposição e uso de energia livre para encontrar as melhores poses de ligantes. Se a termodinâmica do sistema, ou seja, a entalpia e entropia, é corretamente modelada pela função de energia, o mínimo global do panorama energético corresponderá a conformação receptor-ligante experimental, ou seja, o modo nativo de ligação e os mínimos locais corresponderão aos modos de ligação alternativos.

Três estratégias principais em relação à flexibilidade de proteínas e ligantes são empregados por métodos de ancoragem: (1) a proteína é considerado rígida, e apenas os graus de liberdade translacional e rotacional do ligante são explorados (ou seja, o ligante é considerado como um corpo rígido sem graus de liberdade internos), (2) a proteína é considerada rígida e todos os graus de liberdade do ligante são exploradas (ou seja, translacional, rotacional conformacional), e (3) a proteína é considerada totalmente ou parcialmente flexível, e todos os graus de liberdade do ligante também são investigados.

A maioria dos algoritmos considera a proteína como uma entidade rígida, enquanto o ligante é considerado flexível, ou seja, as ligações sp^3 são capazes de girar, mas os comprimentos e os ângulos de ligação são mantidos fixos.

Os algoritmos de busca são usados para selecionar os complexos em que um composto tem maior afinidade de ligação por um determinado sítio de uma biomolécula. Existem três diferentes algoritmos usados em acoplamento molecular: algoritmos de busca sistemática; métodos estocásticos; e abordagens de simulação.

Na busca sistemática, os ligantes são desconstruídos e o acoplamento é realizado por fragmentos, que são acrescentados em etapas sequenciais, começando pelas porções mais rígidas. Nos métodos estocásticos, o ligante completo é posicionado no sítio de ligação e são aplicadas mudanças torcionais à pose (designação dada ao conjunto de posição, conformação e orientação de um ligante) inicial, resultando numa nova pose, o composto testado deverá sofrer alterações torcionais numa etapa seguinte, e assim, sucessivamente, em busca do melhoramento das interações com a biomolécula. Um exemplo deste tipo de algoritmo são os algoritmos genéticos, onde o acoplamento começa com uma população de poses, que recebem uma pontuação (score) de uma função de fitness. Em seguida, os modos de ligação menos favoráveis são substituídos por novas poses, geradas por operadores computacionais. E assim, sucessivamente, em busca do encaixe mais favorável do ligante no sítio, isto é, o complexo de mais baixa energia (SILVA.RUI, 2019).

Portanto para validar os protocolos usados em um processo de acoplamento molecular se utiliza um procedimento chamado *redocking*, o qual é feito sobre uma estrutura já conhecida e a validação do protocolo de acoplamento se dá através do RMSD (raiz quadrada do desvio quadrático médio) entre a sobreposição da pose dos ligantes no complexo, ou seja: retira-se o ligante do complexo e novamente o processo de acoplamento é realizado, quanto menor é o RMSD mais validado será o processo, geralmente é aceito um desvio em torno de 2 Å (angstroms).

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica computacional usada para estudar o comportamento de átomos e moléculas (Fig.17) ao longo do tempo, ela simula o movimento de partículas em um sistema resolvendo as equações de movimento de Newton numericamente. As simulações de DM fornecem informações valiosas sobre várias propriedades e comportamentos de nível molecular e atômico (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008), seguem abaixo algumas das principais características e aspectos das simulações de dinâmica molecular.

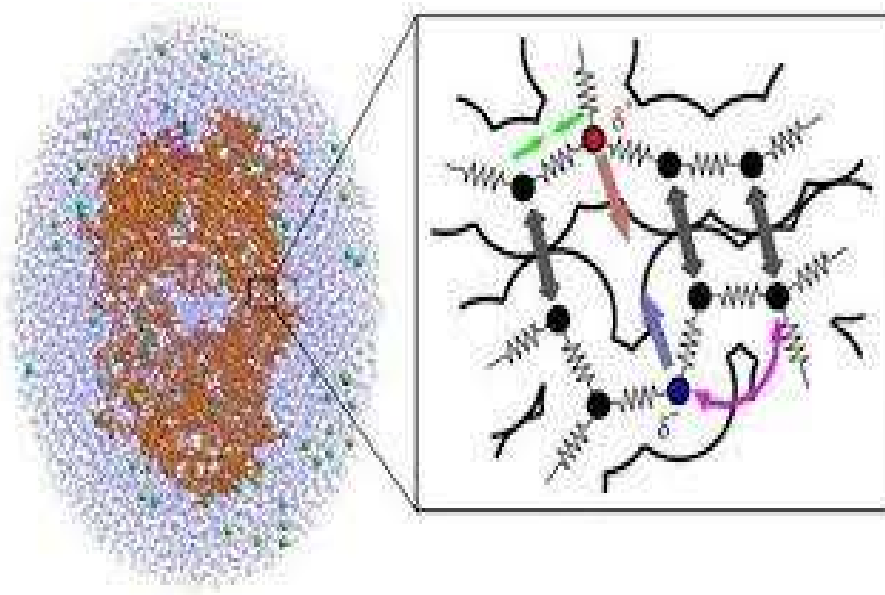


Figura 17- Dinâmica molecular. Fonte: (FILHO, 2022).

As simulações de DM podem cobrir uma ampla gama de escalas de tempo, de femtossegundo (fs, 10^{-15} segundos) a milissegundos (ms, 10^{-3} segundos) ou até mais. A escolha da escala de tempo depende do sistema a ser estudado e dos recursos computacionais disponíveis, geralmente são incorporados termostatos e barostatos para controlar a temperatura e a pressão dentro do sistema, permitindo que os pesquisadores explorem várias condições termodinâmicas.

Campos de força são usados para descrever as interações entre átomos e moléculas, e normalmente incluem termos para interações ligadas (potenciais ligados) como ligações, ângulos e diedros, bem como interações não ligadas (potenciais não ligados) como forças de van der Waals e interações eletrostáticas.

Começam com uma configuração inicial de átomos e moléculas. Esta configuração pode ser baseada em dados experimentais ou gerada através de vários métodos, incluindo modelagem molecular ou configurações aleatórias, algoritmos de integração numérica, como o algoritmo de Verlet ou o método *leapfrog*, são usados para calcular as posições e velocidades das partículas em cada passo de tempo. Esses algoritmos garantem a propagação precisa do sistema ao longo do tempo.

Geralmente usam condições periódicas de contorno, que permitem que uma pequena célula de simulação represente um sistema maior. Isso evita efeitos de borda e imita um sistema infinito, tornando computacionalmente viável simular grandes sistemas.

Diferentes tipos de conjuntos são usados em simulações DM para descrever as condições termodinâmicas. Os conjuntos mais comuns são os conjuntos NVE (número constante de partículas, volume e energia), NVT (número constante de partículas, volume e temperatura) e NPT (número constante de partículas, pressão e temperatura).

Em geral, as simulações de dinâmica molecular são uma ferramenta poderosa para obter *insights* sobre o comportamento dinâmico de moléculas e materiais, permitindo que os pesquisadores entendam e prevejam suas propriedades e comportamentos em nível atômico e molecular (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

É crescente o uso de compostos de origem natural para a fabricação de fármacos.

Testar suas propriedades e esclarecer sua forma de atuação é de suma importância para o seu emprego efetivo e o aproveitamento de suas propriedades farmacológicas.

A Piroplasmose é uma ameaça real, e causa perdas na área da saúde humana e prejuízos financeiros e sanitários ao agronegócio.

Portanto, empregar os recursos de bioinformática para o melhor entendimento das interações proteína-ligante, é necessário, tendo como instrumento as estratégias de acoplamento e dinâmica molecular na busca de novos fármacos com a finalidade de erradicar as patologias tais como: *Babesia Caballi* e *Theileria Equi*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Caracterizar as interações não covalentes da alicina com proteínas de protozoários do filo apicomplexa, visando entender seu desempenho como candidato a fármaco, e propor a implementação de um produto biotecnológico a ser usado no tratamento e prevenção de afecções causadas por *B. caballi*, *T. equi* e verminoses em equinos.

4.2 Objetivos Específicos

Esclarecer as propriedades farmacológicas da alicina, através de experimentos e análises a nível molecular em proteínas invasoras de eritrócitos, das seguintes patologias: *T. equi* e *B. caballi* caracterizando suas interações entre ligante e proteína.

Aplicar as técnicas de acoplamento e dinâmica molecular com a finalidade de analisar os padrões de interação no bolso hidrofóbico proteína-ligante, e caracterizar os resíduos de aminoácidos envolvidos bem como as alterações na topologia de ajuste do ligante com a proteína..

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Recursos Computacionais

Para o Acoplamento Molecular foi usado o programa DockThor- *Docking program* (versão 2.0) (<https://dockthor.lncc.br/v2/>)(GUEDES; KREMPSEK; DARDENNE, 2017); para a visualização e cálculos de RMSD os programas :BIOVIA Discovery studio®, Dassault Systems (versão 2021);PYMOL- *Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC*, (Versão 2.0); (com licença acadêmica), Marvin Sketch 22.22, foi usado para desenhar, exibir e caracterizar estruturas químicas, Marvin 22.22, Chemaxon (<https://www.chemaxon.com>), Avogadro: uma ferramenta de arranjo e visualização, construtor molecular de código aberto, Versão 1XX <http://avogadro.cc/>. (Fig. 18).

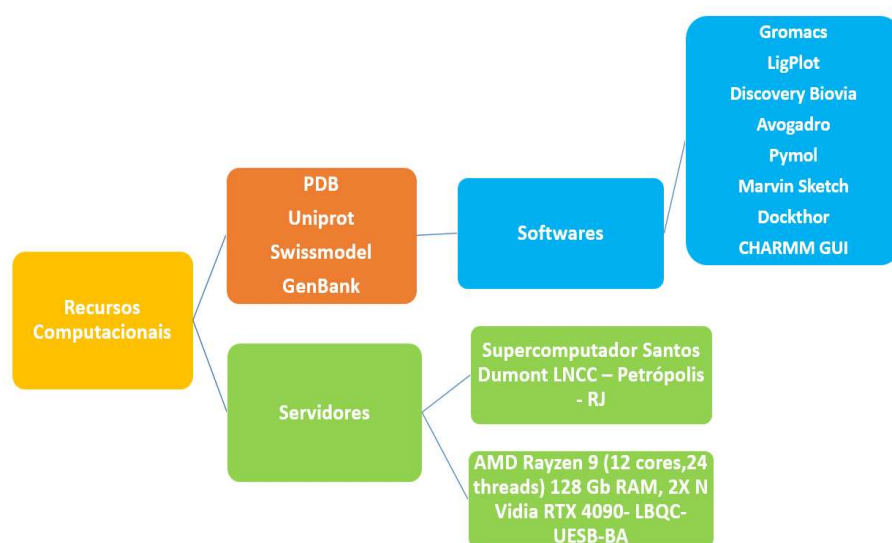


Figura 18 - Plataformas de banco de dados, servidores, programas e aplicativos usados nos experimentos. Figura elaborada pelo autor.

5.2 Redocking

Foi realizado *redocking* com a proteína PBD Id 3SRI PfRON2 – *Crystal Structure*, para validação de uso do protocolo. Neste processo, o acoplamento foi realizado com o ligante Alicina utilizado na rodada 14.log (Tab.3), *acoplamento* na proteína PfRON2. Após o processo, o RMSD foi compatível com o experimento modelo do *redocking*. O ligante foi removido através do programa BIOVIA *Discovery Studio*®, *Dassault Systems* (versão 2021), e as coordenadas e os parâmetros utilizados foram os da Tabela 4.

Afinidade ΔG (Kcal/mol) é usada para classificar diferentes ligantes em experimentos de triagem virtual considerando a posição de energia superior de cada composto (de acordo com a energia total). T. energia ΔH (Kcal/mol) – É usado para classificar diferentes modos de ligação do mesmo composto. VDW Energia (Kcal/mol) - É uma interação dependente da distância entre átomos ou moléculas. Força de Coulomb / Energia Eletrostática (C) - A lei da atração e repulsão

eletrostática, ou Lei de Coulomb, descreve a força exercida sobre um objeto carregado Rotores – Número de ângulos de rotação dos ligantes. RMSD (Å) -RMSD é a sigla para *Root Mean Square Deviation* que significa a raiz quadrada do desvio quadrático médio, ele deve ser calculado entre estruturas que possuem sobreposição (tridimensionalmente alinhadas) e logo estão no mesmo sistema de coordenadas.

Tabela 3 - Resultados do *redocking* com a proteína PDB Id 3SRI Pf RON2, que teve como base a rodada 14.log da mesma proteína com a alicina – Figura obtida através do programa *DockThor*.

② Analyze your docking results:

Analyze
Download
Delete Job

Table 3D View

Rank	File ID	Compound	Affinity	Total Energy	vdW Energy	Elec. Energy	RMSD
1	3d2b7fa53b	ligand 1	-6.805	-7.982	-8.677	-8.518	2.077
		run 19	-6.805	-7.982	-8.677	-8.518	2.077
		run 15	-6.337	-7.835	-0.578	-16.830	13.645
		run 24	-6.724	-7.437	-8.407	-8.033	0.000

As estratégias empregadas neste trabalho foram que a proteína é considerada rígida, todos os graus de liberdade do ligante são explorados (i.e. translacional, rotacional e conformacional), e os algoritmos de busca foram os métodos estocásticos, alterando aleatoriamente todos os graus de liberdade do ligante a cada passo, gerando uma grande diversidade de soluções (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003).

As funções de pontuação em funções baseadas em campo de força são derivadas de um campo de força clássico e consistem em uma soma de termos de energia ((HALGREN; NACHBAR, 1996).

Este tipo de função de pontuação geralmente considera as energias de interação proteína-ligante (termos não ligados) e a energia interna do ligante (termos ligados e não ligados).

Exemplos de programas de acoplamento que implementaram funções de pontuação baseadas em campo de força (SANTOS et al., 2020) incluem GOLD (VERDONK et al., 2003), Auto Dock (MORRIS et al., 1998) e DockThor ((MORRIS et al., 1998) que implementa termos diedros e não ligados usando o campo de força MMFF94S (GUEDES et al., 2021)

Os resultados do *Redocking* (Tab.3) e do RMSD de 2,077 Å obtido em referência com a pose do ligante, indica que o protocolo e os parâmetros empregados para esta validação estão dentro dos requisitos dos processos de *acoplamento* molecular.

5.3 Obtenção do Ligante e Características

O código *SMILES* canônico e a estrutura da molécula de alicina (C=CCSS(=O)CC=C) (Fig.19) foram obtidos da base de dados *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os detalhes da alicina foram carregados no servidor web *SWISS-ADME* (<http://www.swissadme.ch/>) e *SWISS Target Prediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) para toda a caracterização físico-química, teste de verossimilhança de drogas e identificação do alvo da alicina (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

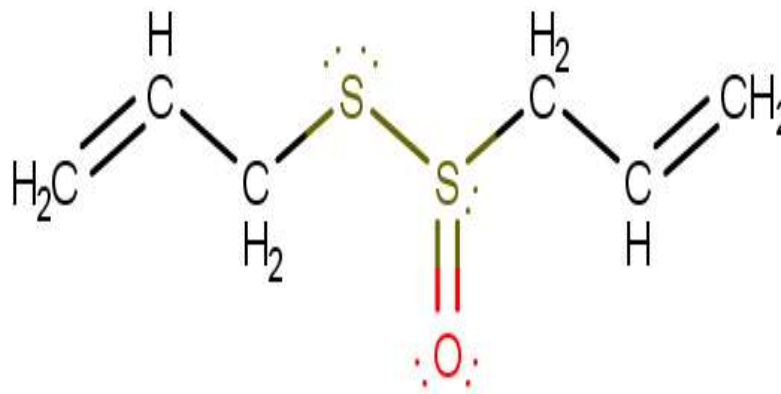


Figura 19 - Visualização do Ligante Alicina (estrutura de Lewis), pares de elétrons isolados nos átomos de enxofre e oxigênio. Figura obtida através do código *Smiles* no site <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, e desenho no aplicativo *Marvin Sketch 22.22*.

5.4 Obtenção da Proteína

Para aquelas proteínas cuja estrutura cristalina tridimensional PDB entrada 3SRI, de *Plasmodium Falciparum* AMA1 (antígeno merozoíto apical) em complexo com 39 aa peptídeo PfRON2 (complexo de proteínas do pescoço de roptria de *plasmodium falciparum*), classificação de invasão celular. O *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) forneceu as estruturas proteicas necessárias para os estudos empíricos atuais. A malária, doença endêmica em muitas regiões tropicais e subtropicais, é causada pela infecção do eritrócito pelo parasita apicomplexa no *plasmodium*. Como na *babesia* e *theileria*, o antígeno de membrana apical 1 (AMA1) e o complexo *Protein Rhoptry Neck* (RON2), desempenham um papel

fundamental na invasão celular. A proteína AMA1, presente na superfície do parasita, liga-se firmemente ao componente RON2 do complexo proteico RON, que é inserido na membrana eritrocitária durante a invasão. O bloqueio da interação AMA1-RON2 com anticorpos ou peptídeos inibe a invasão, reforçando sua importância no ciclo de vida do plasmodium e como alvo para estratégias terapêuticas.(NORMAND et al., 2017).

5.5 Preparação do Sistema para o Acoplamento Molecular

Com as estruturas tridimensionais de ligantes e proteínas, experimentos de acoplamento molecular foram realizados em busca de um complexo proteína-ligante. Para a realização desses experimentos, utilizou-se o *software DockThor (Genetic Optimization of Ligand Docking)* (GUEDES; KREMPSER; DARDENNE, 2017) foi utilizada na versão 2.0, que utiliza um algoritmo genético na busca do melhor encaixe do ligante no sítio de ligação, e utiliza o *Merck Molecular Force Field 94S-MMFF94S*, (HALGREN, 2000).

O programa DockThor, desenvolvido pelo grupo GMMSB/LNCC (Molecular Modeling Group in Biological Systems / Laboratório Nacional de Ciência da Computação - Brasil), tem obtido resultados promissores em estudos comparativos com outros programas de acoplamento bem estabelecidos para a predição de modos experimentais de ligação, considerando diversos alvos moleculares e classes químicas de ligantes (GUEDES; KREMPSER; DARDENNE, 2017).

5.6 Construção de Proteína por Homologia

Também foram feitos experimentos com a proteína PBD 4APM de *Babesia Divergens*, por motivo de ser a com mais dados disponíveis e sua estrutura estar cristalizada, as regiões de acoplamento foram escolhidas de acordo com os aminoácidos mais conservados e participantes das interações de reconhecimento do patógeno e devido a estrutura cristalizada da *T. equi* e *B. caballi* não estarem disponíveis nos bancos de dados.

Escore global do QMEANDisCo, (Fig.20) é o escore médio por resíduo, a estimativa de erro fornecida é baseada nos escores globais do QMEANDisCo estimados para um grande conjunto de modelos e representa a diferença quadrática média raiz (ou seja, desvio padrão). Fonte:(WATERHOUSE et al., 2018).

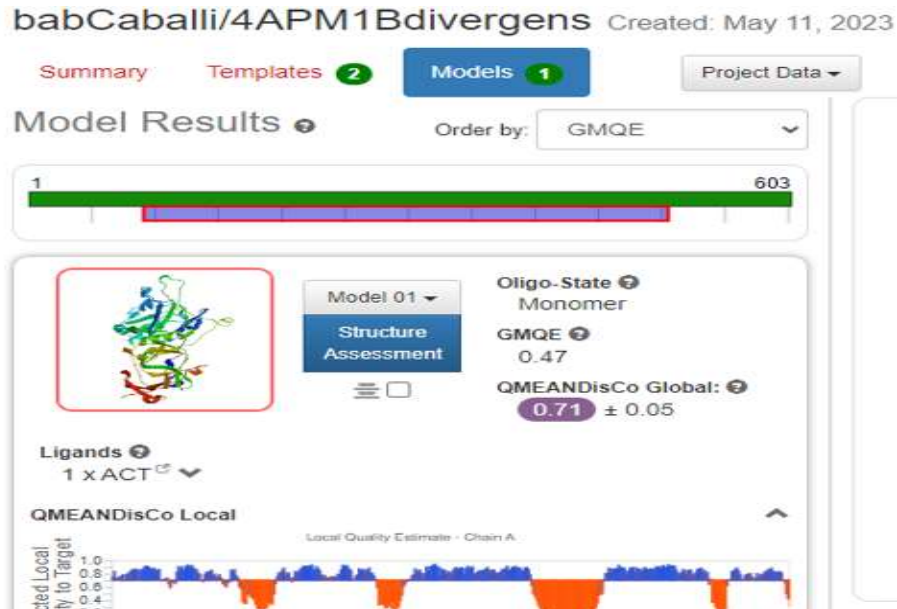


Figura 20 - Estimativa Qualitativa de Alinhamento Molecular, GMQE (*Global Model Quality Estimate*) é uma estimativa de qualidade que combina propriedades do alinhamento do modelo de destino e da estrutura modelo. Figura obtida através do *site swissmodel.com*

Desta maneira, foi realizada a montagem de uma proteína por homologia (Fig.19) tendo como esqueleto a proteína PDB Id 4APM *Babesia Divergens* e a sequência de aminoácidos da *Babesia Caballi* GenBank: GIX62373.1 do "transcrito_id: BcabD6B2_18080.t1", com o uso do banco de dados *Swiss Model* (WATERHOUSE et al., 2018).

Para tal, foi feito um alinhamento global (Fig. 21) das sequências no aplicativo T-Coffee version_11:00 Cedric-Notredame (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000).

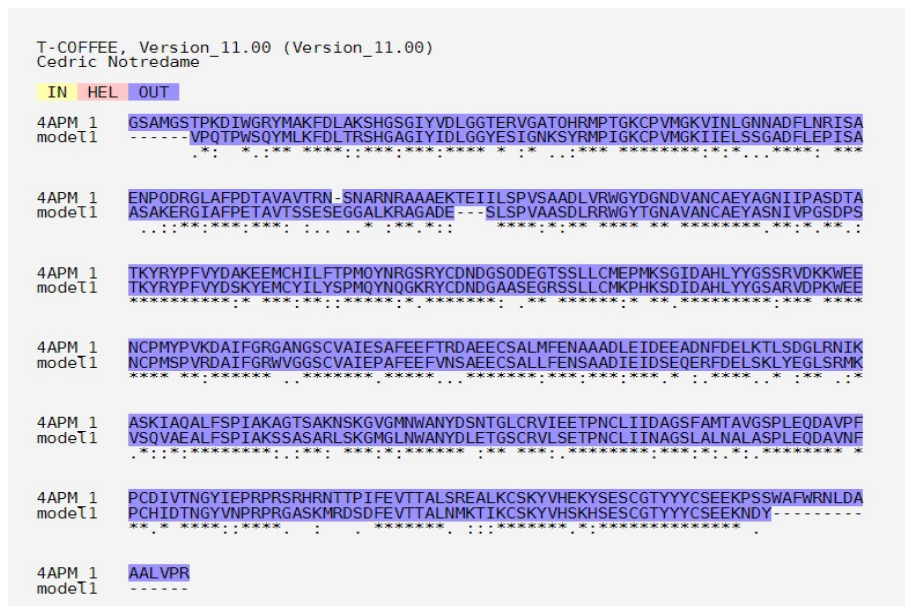


Figura 21 - Alinhamento de sequências, um asterisco (*) significa que as sequências são idênticas naquela posição; dois pontos (:) indicam substituições conservativas (grupo da mesma

cor); um ponto final (.) refere-se a substituições semiconservativas (formas semelhantes). Figura obtida através do site *T-COFFEE*.

Logo após a construção da Proteína denominada *model_01 Babesia Caballi* e juntamente com a proteína da *Babesia divergens* foi feito um alinhamento da sequência de aminoácidos no programa *PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC* (“Pymol”, 2023) onde também foi obtido o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre as proteínas que foi de 0.16 Å (angstroms)(Fig.22).

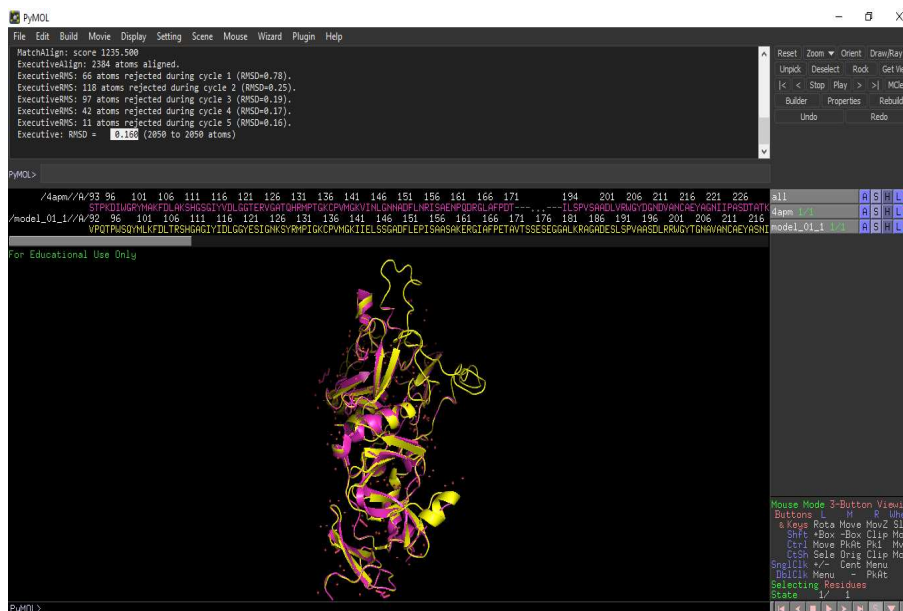


Figura 22 - RMSD de 0.16 Å (angstroms) no alinhamento de estruturas de aminoácidos das proteínas *model_01* e PDB Id 4APM *Babesia divergens*, Figura obtida através do aplicativo *Pymol*.

5.7 Preparação do Sistema para Dinâmica Molecular

As estruturas receptoras e o ligante foram pré-processados no programa *Marvin Sketch 22.22*, após a verificação não foram encontrados problemas em valores, carga, estrutura de geometria, ou estado de protonação (PKA) não há micro espécies, e o método de tautomerização busca a distribuição tautômero dominante considerando o efeito do PH em um PH de 7,4. encontrar um tautômero dominante com um número máximo de 1000 estruturas. No *software Avogadro* foram adicionados os átomos de hidrogênio, realizada a parametrização dos MMFF94s, a otimização de energia e a busca de confôrmeros.

Todos os complexos proteína-ligante foram inicialmente preparados usando a ferramenta CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>) (SUNHWAN JO, 2008) para ajustar os estados de protonação de aminoácidos em PH 7,2 e seus nomes de átomos. Os candidatos a ligantes foram preparados usando o programa *Avogadro 1.2.0* (HANWELL et al., 2012), para adição de hidrogênios e salvos no formato mol2, assim como foi utilizada a ferramenta *CGenFF*

(<https://cgenff.umaryland.edu/>) para parametrização do ligante e geração dos *arquivos str*. Cada complexo foi submetido ao módulo *gmx* do pacote *GROMACS 2023* para geração dos arquivos de coordenadas e topologia usando o campo de força *CHARMM36*(K. VANOMMESLAEGHE AND A. D. MACKERELL JR, 2012) e o modelo de água *TIP3P*.

Nas etapas seguintes, os complexos foram solvatados e neutralizados, seguidos de um cálculo de minimização de energia com 5,0000 passos e usando um tratamento do tipo *PME coulomb*, com 1,2 Å para ambos os raios de corte de *Coulomb* e *Van der Waals*.

A interação dos ligantes foi restrita aos átomos não-hidrogênio antes das etapas de equilíbrio, e os grupos de acoplamento de temperatura para proteína-ligante e água e íons foram criados. Além disso, cada complexo foi submetido a uma dinâmica de equilíbrio para estabilização de volume (*NVT*) com esquema de *Verlet*, 1,2 Å para raio de corte de *coulomb* e *Van der Waals*, para 1 nanossegundo (ns), seguido de uma dinâmica de estabilização de pressão isotrópica (*NPT*) com esquema de *Verlet*, 1,2 Å para raio de corte de *coulomb* e *Van der Waals*, para 1 ns.

Uma dinâmica final de produção de 100 ns usando volume e pressão constantes, e temperatura de 300 K, para avaliação da estabilidade do complexo proteína-ligante. As mesmas etapas descritas acima, excluindo o ligante, foram realizadas para cada proteína em sua forma de *APO* (Parte proteica de uma proteína sem sua parte funcional não proteica).

Em seguida, gráficos de flutuação de aminoácidos (*RMSF*) foram gerados para comparação com seus respectivos sítios ativos nos complexos proteína-ligante.

Além disso, gráficos *RMSD* (raiz quadrada do desvio quadrático médio) foram gerados para avaliar as mudanças de ligantes dentro do sítio ativo da proteína durante a dinâmica de produção, bem como *RMSF* de aminoácidos, números de ligações de hidrogênio (*HB*) e gráficos de energia de *Coulomb* e *Lenard-Jones*. Todos os gráficos foram gerados no formato *xvg* e lidos no programa *Grace* (<https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>).

6 RESULTADO E DISCUSSÃO

6.1 Acoplamento Molecular

6.1.1 Acoplamento do Ligante Alicina com *P. falciparum* RON2, PBD Id 3SRI.

As poses obtidas em todas as rodadas do algoritmo são agrupadas pelo programa *DT Statistic* e classificadas de acordo com a energia total (denominada *T. Energy*) do campo de força MMFF94S, que é composto pelas interações intermoleculares e intramoleculares de acordo com os potenciais eletrostático e VdW e a energia torcional do ligante. Para cada rodada do algoritmo, apenas os líderes mais bem classificados de cada cluster serão usados para a análise final de clusterização, o processo de acoplamento foi realizado como os parâmetros padrão Dockthor.

Uma posição média, entre as Cys 2037 e Cys 2049, foi levada a efeito como local de medida das coordenadas translacionais (Tab.4) para o acoplamento molecular da alicina com PfRON2.

De acordo com a metodologia anteriormente descrita e protocolos de acoplamento Molecular foram realizados com o ativo alicina e a proteína PDB Id 3SRI *Plasmodium falciparum* PfRON2 com 29 aa, obtida através do banco de dados PDB (Protein Data Bank).

Tabela 4 - Parâmetros usados no acoplamento do complexo alicina/PfRON2

PARÂMETROS DA GRADE	PARÂMETROS DO ALGORITMO GENÉTICO
Centro x = 12.00	Número de validações = 1000000
Centro y = 5.00	Tamanho da População = 750
Centro z = -9.00	Número de Rodadas = 24
Tamanho Total x = 20	Semente da rodada #1 = -1985
Tamanho Total y = 20	Data de Submissão = 2023-08-23 20:04:02
Tamanho Total z = 20	Nome do Trabalho= test1_64e69062b2b34
Discretização = 0.25	ID= Dock@Dock.CBRISKJ54N

As melhores três rodadas do ligante alicina que fazem parte da Tabela.5, e o significado de seus descritores são citados abaixo:

Afinidade /(Kcal/mol) ou score- é usada para classificar diferentes ligantes em experimentos de triagem virtual considerando a posição de energia superior de cada composto (de acordo com a energia total).

Energia total /(Kcal/mol) – É usado para classificar diferentes modos de ligação do mesmo composto (poses).

VDW Energia (Kcal/mol) - É uma interação dependente da distância entre átomos ou moléculas.

Força de coulomb / energia eletrostática (C) - A lei da atração e repulsão eletrostática, ou Lei de Coulomb, descreve a força exercida sobre um objeto carregado,

Rotações– Número de ângulos de rotação dos ligantes.

RMSD (Å) -RMSD é a sigla para *Root Mean Square Deviation* que significa a raiz quadrada do desvio quadrático médio, ele deve ser calculado entre estruturas que possuem sobreposição (tridimensionalmente alinhadas) e logo estão no mesmo sistema de coordenadas.

Tabela 5 - Rodadas de Acoplamento

Arquivo	Modelo	Afinidade	Energia Total	VDW	Coulomb	Rotações	RMSD
ligand_18c2f215a2_1_run_14. log	1	-6.362	-8.053	-3.005	-14.437	5	0.000
ligand_18c2f215a2_1_run_22. log	1	-6.248	-7.845	1.830	-18.935	5	5.173
ligand_18c2f215a2_1_ru24.log	2	-6.804	-7.776	-8.678	-8.350	5	14.975

Tabela 6 - Interações da alicina com PfrON2 rodada 14.log

Nome	XYZ	Distancia(Å)	Categoria	De	Para
:LIG2:H - B:Leu 2050:O	6,840000 -2,001500 -8,346000	1,610450	Ligação De Hidrogênio	:LIG2:H H-Donor	B:LEU2050:O H-Acceptor
B:Leu 2050:HN - :LIG2:O	6,824500 -0,338500 -7,124500	2,698734	Ligação De Hidrogênio	B:LEU2050:HN H-Donor	:LIG2:O H-Acceptor
:LIG2:C - B:Leu 2050	6,380375 -2,748125 -5,101000	5,122939	Hidrofóbica Alkyl	:LIG2:C Alkyl	B:LEU2050 Alkyl
:LIG2:C - B:Cys 2049	6,326750 2,299000 -11,051500	4,443551	Hidrofóbica Alkyl	:LIG2:C	B:CYS2049

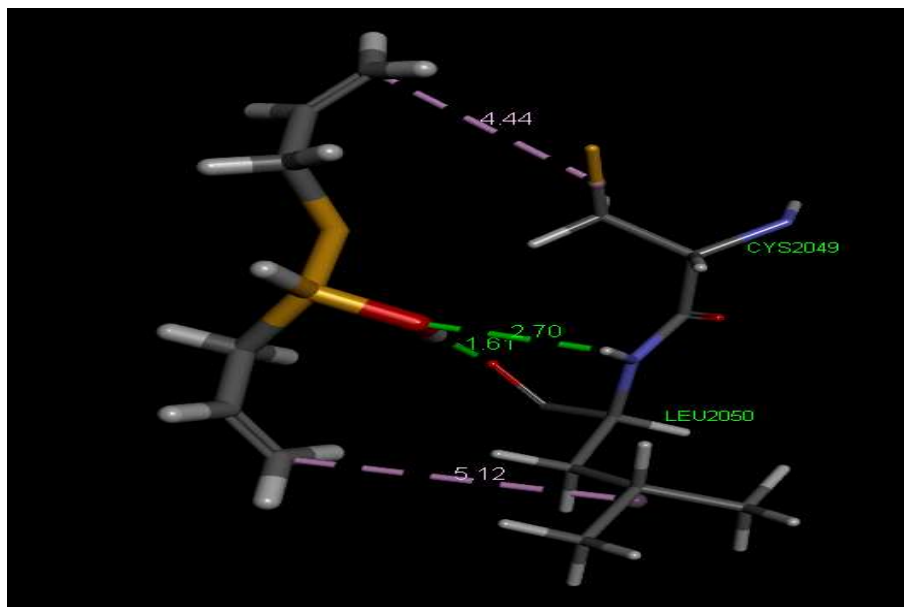


Figura 23 - Visualização de interações 3D de acoplamento molecular do ligante alicina com PfRON2 (Cys 2049, Leu 2050), interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), linhas pontilhadas indicam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

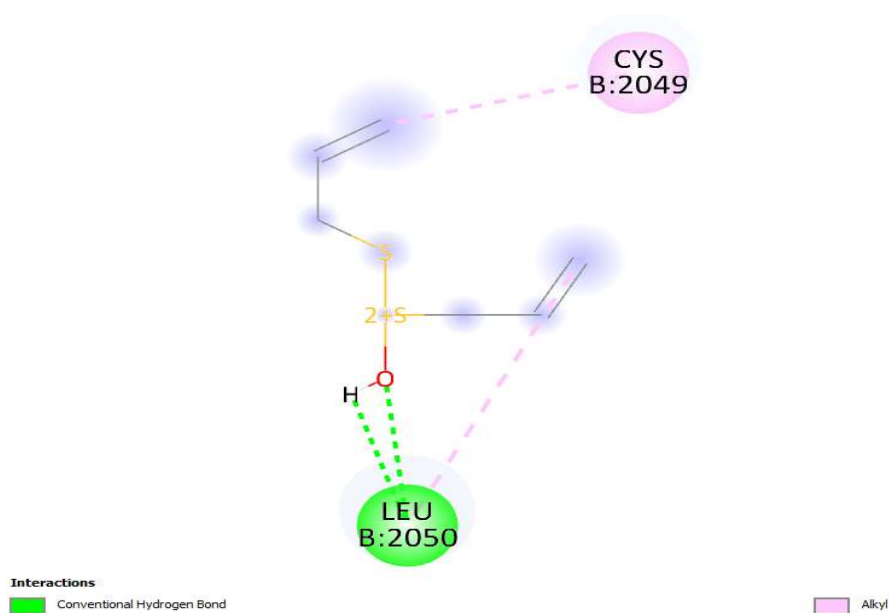


Figura 24 - Visualização das interações em 2D do Ligante alicina com PfRON2. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

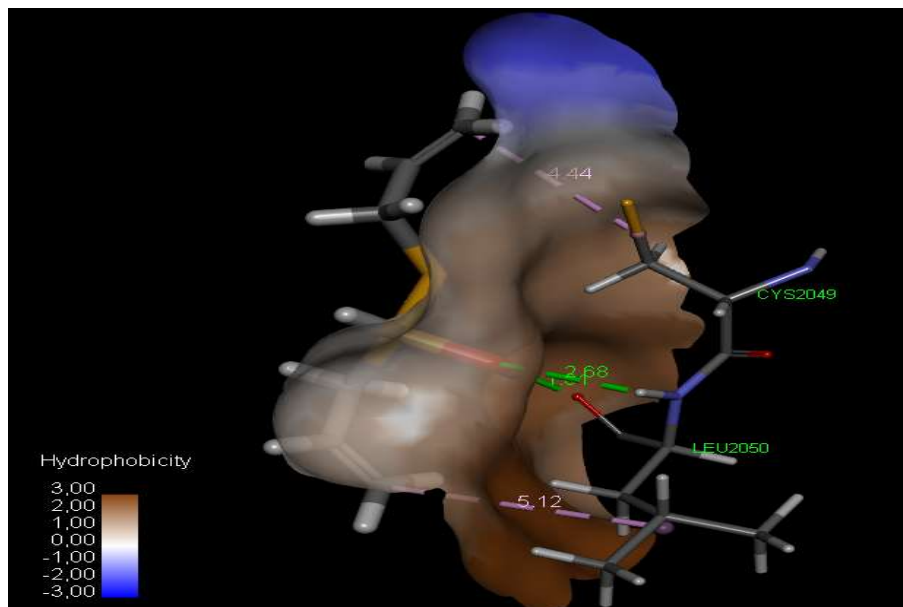


Figura 25 - Superfície de hidrofobicidade do complexo alicina com PfRON2, as regiões mais positivas (marrons) representam a alta hidrofobicidade, e as negativas (azuis) as regiões de baixa hidrofobicidade, o rótulo numérico está em Kcal/mol, os números acima das linhas tracejadas representam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

No método *in silico*, estudos de acoplamento molecular foram realizados para conhecer o mecanismo de ação da alicina no complexo com /PfRON2 (Tabelas 5,6).

A localização dos aminoácidos que interagiram com o ligante alicina, que são a cisteína 2049 e leucina 2050 (Fig.24), ambas pertencentes a sequência conservada e comum entre os integrantes do filo apicomplexa, cuja região central foi usada como direção de coordenadas translacionais para acoplamento do ligante alicina.

Quanto a polaridade a cisteína é polar e leucina apolar, característica notadamente revelada pela disposição espacial dos grupos funcionais e pela sua taxa de inserção na cavidade proteica (Fig. 25), a cisteína 2049 tem fundamental importância por fazer parte da ligação dissulfeto vital para a estrutura secundária e terciária da proteína. As ligações de hidrogênio com a Leu 2050 apresentam as menores distâncias de interação e maior profundidade de inserção no pacote hidrofóbico, no Carboxi - terminal as interações com o ligante são favoráveis ao caráter hidrossolúvel da região molecular, por outro lado, no amino - terminal, as interações mostram o caráter hidrofóbico dominante das interações com o ligante alicina, visto na interação B:Leu24:HN/:LIG2:O (Tab.6).

Devido à eletronegatividade quase semelhante dos grupos alquila de carbono e hidrogênio são resíduos apolares, que afetam as condições lipossolúveis.

A superfície hidrofóbica do complexo alicina/ PfRON2 (Fig.25), aponta a tendência de a Leu 2050 apolar estar localizada na região mais hidrofóbica e a Cys 2049 polar em uma região intermediária, a hidrofobicidade de uma superfície ideal é determinada por sua energia livre de superfície (*Surface Free Energy/ SFE*).

A alicina é um composto hidrofóbico, o que significa que é solúvel em solventes apolares, como lipídios, a curvatura do ligante na sua porção enxofre mostra que a alicina pode se acomodar na região hidrofóbica da bicamada lipídica, participando ativamente de duas ligações de hidrogênio no interior da cavidade com a Leu 2050.

6.1.2 Acoplamento do Ligante alicina com AMA1/*Babesia Divergens*, PDB Id 4APM.

As poses obtidas em todas as rodadas do algoritmo são agrupadas pelo programa *DT Statistic* e classificadas de acordo com a energia total (denominada *T. Energy*) do campo de força MMFF94S, que é composto pelas interações intermoleculares e intramoleculares de acordo com os potenciais eletrostático e VdW e a energia torcional do ligante. Para cada rodada do algoritmo, apenas os líderes melhor classificados de cada cluster serão usados para a análise final de clusterização, o processo de acoplamento foi realizado como os parâmetros padrão dockthor.

De acordo com a metodologia anteriormente descrita e protocolos de *acoplamento* molecular foi feito o acoplamento com o ativo alicina e a proteína AMA1 de *Babesia Divergens*, obtida através do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) a estrutura cristalizada da proteína PDB Id 4APM de *Babesia Divergens*, as coordenadas translacionais (Tab.7) tiveram como referência o resíduo de aminoácido de Phe 169, por fazer parte do bolsão hidrofóbico de acoplamento de Ron2.

Tabela 7 - Parâmetros usados no Acoplamento do complexo alicina - 4APM-AMA1

PARÂMETROS DA GRADE	PARÂMETROS DO ALGORITMO GENÉTICO
Centro x = -11.55	Número de validações = 1000000
Centro y = 52.74	Tamanho da População = 750
Centro z = -25.63	Número de Rodadas = 24
Tamanho Total x = 20	Semente da rodada #1 = -1985
Tamanho Total y = 20	Data de Submissão = 2023-08-07 19:36:33
Tamanho Total z = 20	Nome do Trabalho = phe169bad_64d171f16ba12
Discretização = 0.25	ID= Dock@Dock.CBRHJQG45

Tabela 8 - Rodadas de Acoplamento

Arquivo	Modelo	Afinidade	Energia Total	VDW	Coulomb	Rotações	RMSD
ligand_d53cf88c41_1_run_12.log	1	-6.991	-8.161	-10.914	-6.238	5	0.000
ligand_d53cf88c41_1_run_23.log	2	-7.063	-7.956	-11.185	-6.372	5	5.521
ligand_d53cf88c41_1_run_24.log	3	-7.121	-7.831	-10.967	-6.257	5	5.305

Tabela 9 - Interações da alicina com Bd/AMA1 rodada 12.log

Nome	XYZ	Distancia(Å)	Categoria	De	Para
:LIG2:H A:Ile 224:O	-6,953000 50,948500 -33,532500	1,794673	Ligação De Hidrogênio	:LIG2:H-H Doador	A:ILE224:OH-Acceptor
A:Ala 226:HN - :LIG2:S	-6,079500 53,376000 -31,912000	2,622133	Ligação De Hidrogênio	A:ALA226:HN-HDonor	:LIG2:S-HAcceptor
:LIG2:S - A:Tyr 235	-6,470750 51,555000 -29,004833	5,283094	Pi-Sulfur	:LIG2:S Sulfur	A:TYR235 Pi-Orbitals
:LIG2:S - A:Phe 169	-8,727083 52,498333 -29,056000	5,412112	Pi-Sulfur	:LIG2:S Sulfur	A:PHE169 Pi-Orbitals
:LIG2:S - A:Phe 169	-9,596583 52,369333 -29,549500	5,427482	Pi-Sulfur	:LIG2:S Sulfur	A:PHE169 Pi-Orbitals
:LIG2:C - A:Leu 195	-12,208875 53,068750 -33,082875	4,611496	Hidrofóbica Alkyl	:LIG2:C Alkyl	A:LEU195 Alkyl

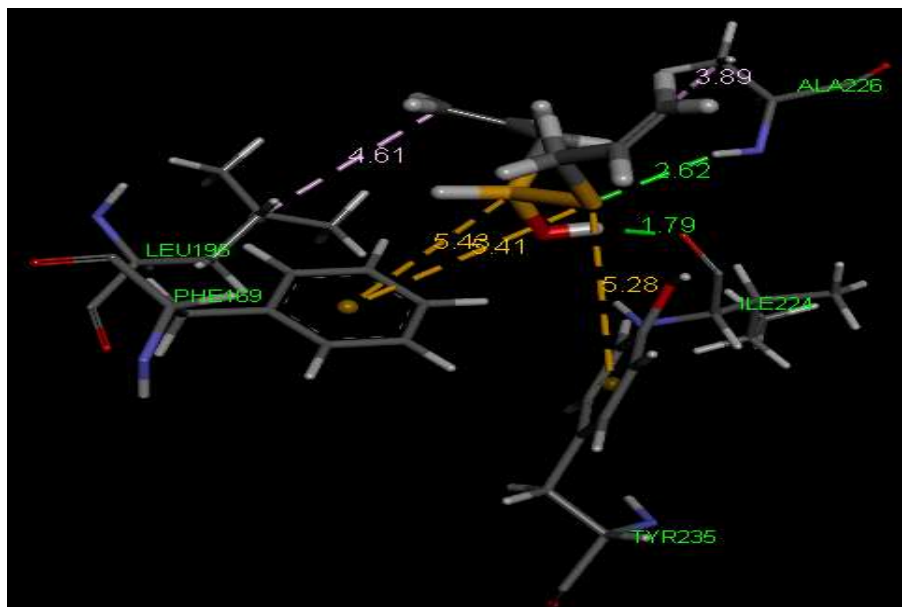


Figura 26 - Visualização de interações 3D de acoplamento molecular do ligante alicina com *B. divergens* /AMA1, interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), interações Pi-sulfur (linhas pontilhadas laranja) linhas pontilhadas também indicam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

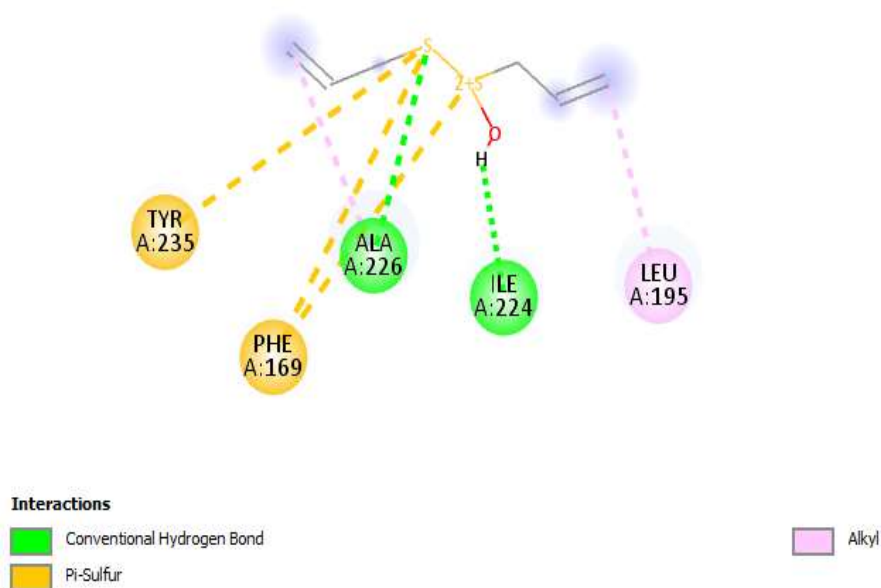


Figura 27 - Visualização das interações em 2D do ligante alicina com *B. divergens* /AMA1. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

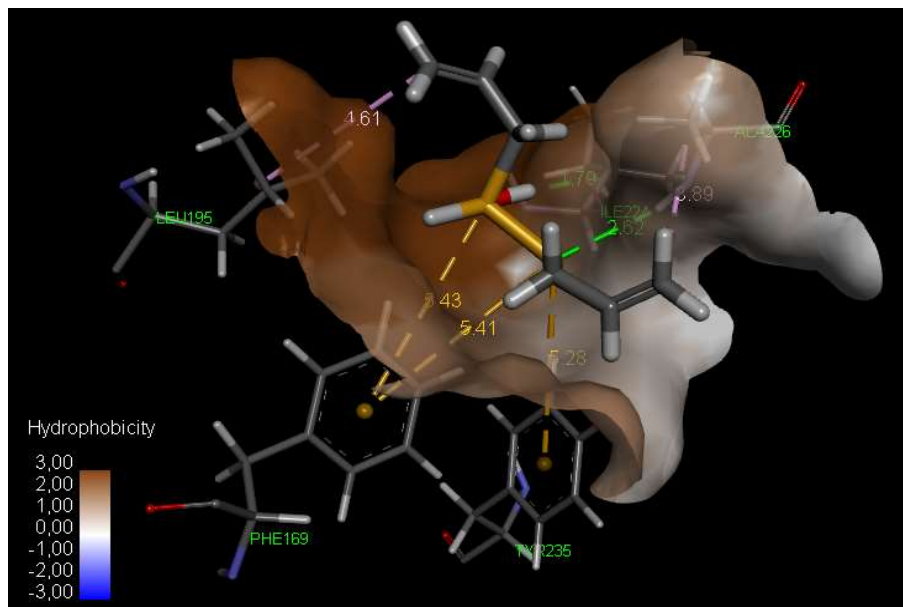


Figura 28 - Superfície de hidrofobicidade do complexo alicina com *Babesia divergens*/AMA1, as regiões mais positivas (marrons) representam a alta hidrofobicidade, e as negativas (azuis) as regiões de baixa hidrofobicidade, o rótulo numérico está em Kcal/mol, os números acima das linhas tracejadas representam as distancias das interações em angstroms. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

No método *in silico*, estudos de acoplamento molecular foram realizados para conhecer o mecanismo de ação da alicina complexada com /AMA1/*Babesia divergens* (Tabelas 8,9).

Os aminoácidos que interagiram com o ligante alicina: Phe169, Tyr235, Ala226, Ile224, Leu195 são integrantes do bolsão catalítico da proteína, foram amplamente elucidados em trabalhos anteriores (Tab.2) são comuns a alguns integrantes do filo Apicomplexa; a localização da Phe169 foi usada como direção de coordenadas translacionais para acoplamento do ligante.

Quanto a polaridade a Phe169, Ala226, Leu195 e Ile224 possuem cadeias laterais apolares, característica notadamente revelada pela disposição espacial dos grupos funcionais e pela sua posição de inserção na cavidade proteica (Fig.26) a Tyr235 por possuir cadeia lateral polar encontra-se em uma região mais externa, e mais exposta ao solvente, em relação aos demais resíduos de aminoácidos. As ligações de hidrogênio com a Ala226 e Ile224 apresentam as menores distancias de interação portanto as de maior magnitude de atração, apesar de estarem em uma região de menor hidrofobicidade e favorecida exposição ao solvente.

Os resíduos que possuem anel aromático têm suas interações classificadas como Pi-sulfur pelo mapa de interações 2D obtido no mapa de interações do aplicativo *Discovery Studio Visualizer* a Tyr235 apresenta interação Pi-sulfur do tipo deslocamento em paralelo, já a Phe169 apresenta interação Pi-sulfur em forma de T (Fig.26).

A superfície hidrofóbica do complexo alicina/ *Babesia divergens*-AMA1, obtida no mapa de interações do aplicativo *Discovery Studio Visualizer* (Fig.28), aponta a tendência de Phe169,

Ala226, Leu195 e Ile224 apolares estarem localizados na região mais hidrofóbica e a Tyr235 polar em uma região intermediária, a hidrofobicidade de uma superfície ideal é determinada por sua energia livre de superfície (*Surface Free Energy/ SFE*).

6.1.3 Acoplamento do Ligante alicina com a proteína model_01Babesia Caballi

As poses obtidas em todas as rodadas do algoritmo são agrupadas pelo programa *DT Statistic* e classificadas de acordo com a energia total (denominada *T. Energy*) do campo de força MMFF94S, que é composto pelas interações intermoleculares e intramoleculares de acordo com os potenciais eletrostático e VdW e a energia torcional do ligante. Para cada rodada do algoritmo, apenas os líderes melhor classificados de cada *cluster* serão usados para a análise final de clusterização, o processo de acoplamento foi realizado como os parâmetros padrão dockthor.

De acordo com a metodologia anteriormente descrita e protocolos de *acoplamento* molecular, foi feito o acoplamento com o ativo alicina e a proteína Modelo_01Babesia Caballi, construída através de homologia com a proteína PDB Id 4APM Babesia divergens e a sequência de aminoácidos da *Babesia Caballi GenBank: GIX62373.1* do "transcrito_id: BcabD6B2_18080.t1", com o uso do Banco de dados *Swiss Model* (WATERHOUSE et al., 2018), as coordenadas translacionais (Tab.10) foram as mesmas do experimento com PDB Id 4APM/ AMA1, que tiveram como referência o resíduo de Phe 169, por fazer parte do bolsão hidrofóbico de acoplamento de *Babesia Divergens/ RON2* (Tab.2).

Tabela 10 - Parâmetros usados no Acoplamento do complexo alicina - proteína model_01Babesia Caballi.

PARÂMETROS DA GRADE	PARÂMETROS DO ALGORITMO GENÉTICO
Centro x = -11.55	Número de validações = 1000000
Centro y = 52.74	Tamanho da População = 750
Centro z = -25.63	Número de Rodadas = 24
Tamanho Total x = 20	Semente da rodada #1 = -1985
Tamanho Total y = 20	Data de Submissão = 2023-09-24 08:42:42
Tamanho Total z = 20	Nome do Trabalho = model_01Bd_651020b2d5ef6
Discretização = 0.25	ID = Dock@Dock.CBRLGZTBF5

Tabela 11 - Três melhores Rodadas no Acoplamento do complexo alicina - Proteína model_01*Babesia Caballi*.

Arquivo	Modelo	Afinidade	Energia Total	VDW	Coulomb	Rotações	RMSD
ligand_4cf3155f1 5_1_run_8.log	1	-7.175	-9.610	-10.503	-8.729	5	0.000
ligand_4cf3155f1 5_1_run_2.log	4	-7.118	-8.949	-10.886	-7.439	5	2.182
ligand_4cf3155f1 5_1_run_16.log	6	-7.505	-8.073	-13.402	-4.177	5	3.245

Tabela 12 - Interações da alicina em complexo com a proteína model_01*Babesia Caballi*.

Nome	XYZ	Distância(Å)	Categoria	De	Para
A:Tyr 140:HH - LIG2:O	-4,318500 53,297000 -26,664500	1,875840	Ligação De Hidrogênio	A:TYR140:HH Doador	LIG2:O Aceptor
LIG2:H - A:Tyr 155:O	-5,112000 52,991500 -24,190500	2,099631	Ligação De Hidrogênio	LIG2:HH Doador	A:TYR155:O Aceptor
A:Tyr155- LIG2:C	-4,688000 54,920500 -21,767667	5,152717	Hidrofóbica Pi-Alkyl	A:TYR155	LIG2:C
LIG2:C - A:Val 81	-8,192000 57,324167 -30,734500	4,412876	Hidrofóbica	LIG2:C	A:VAL81
LIG2:C - A:Pro 77	-10,096167 57,109000 -27,014000	4,159553	Hidrofóbica Alkyl	LIG2:C	A:PRO77

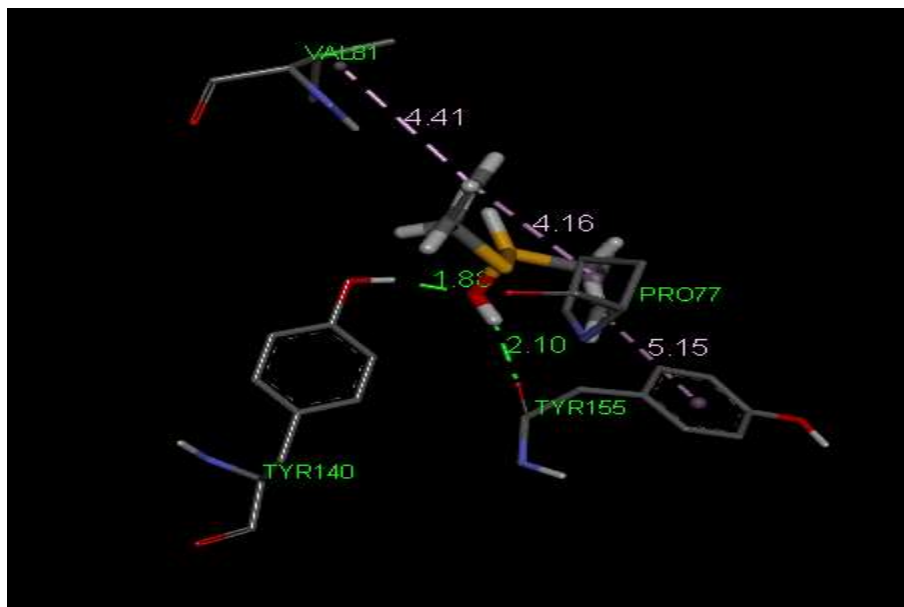


Figura 29 - Visualização de interações 3D de acoplamento molecular do ligante alicina com a proteína model_01Babesia Caballi, interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), interações Pi-sulfur (linhas pontilhadas laranja) linhas pontilhadas também indicam as distâncias das interações em angstroms. Figura obtida no aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

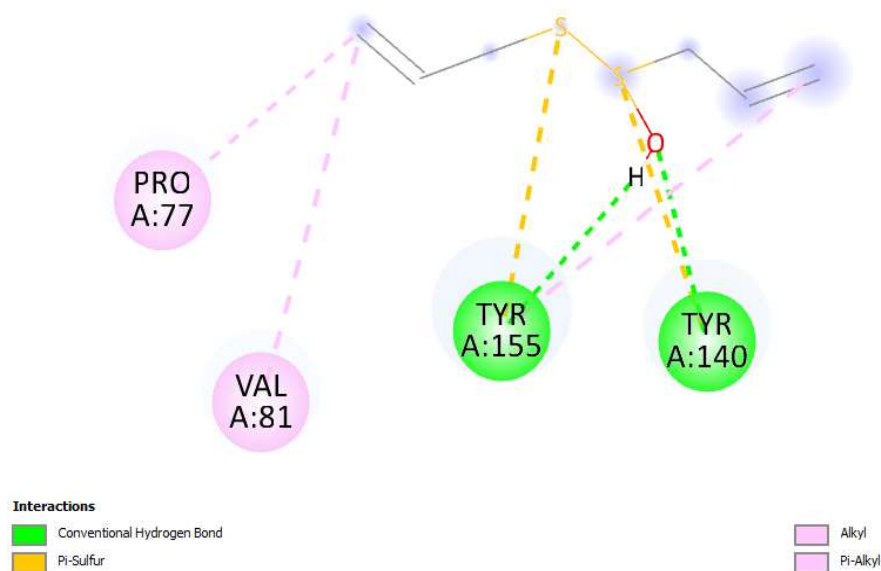


Figura 30 - Visualização de interações 2D de acoplamento molecular do ligante alicina com proteína model_01Babesia Caballi, interações de ligações de hidrogênio (linha pontilhada verde), interações alquila (linhas pontilhadas roxas), interações pi-sulfur (linhas pontilhadas laranja) linhas pontilhadas também indicam as distâncias das interações em Angstroms. Figura obtida no aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

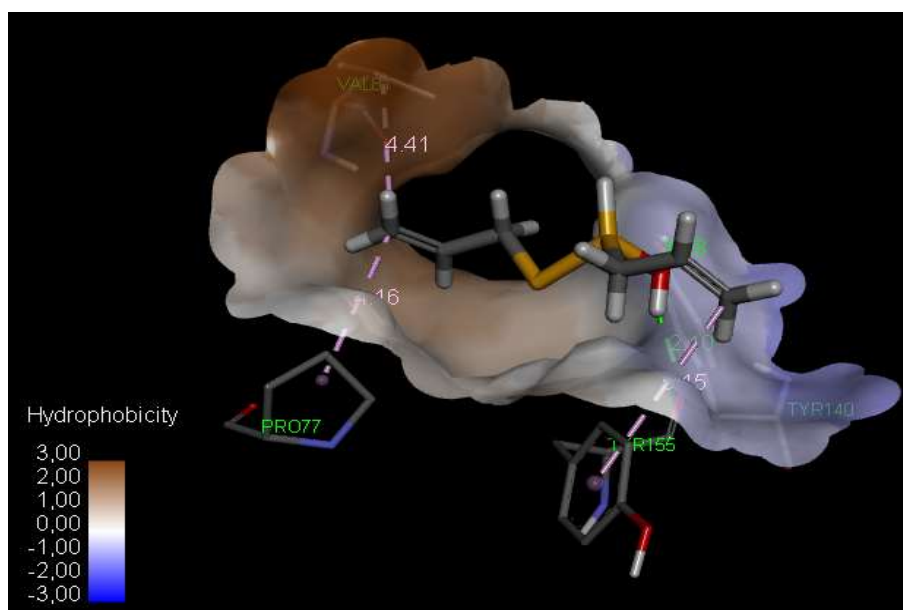


Figura 31 - Superfície de hidrofobicidade do complexo alicina com model_01Babesia Caballi, as regiões mais positivas (marrons) representam a alta hidrofobicidade, e as negativas (azuis) as regiões de baixa hidrofobicidade, o rótulo numérico está em Kcal/mol, os números acima das linhas tracejadas representam as distancias das interações em angstroms. Figura obtida no aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

No método *in silico*, estudos de acoplamento molecular foram realizados para conhecer o mecanismo de ação da alicina em complexo com model_01Babesia Caballi (Tabelas 11,12).

Os aminoácidos que interagiram com o ligante alicina: Pro77, Tyr155, Tyr140, Val81, as coordenadas translacionais (Tab.10) foram as mesmas do experimento com PBD Id 4APM/AMA1, que tiveram como referência o resíduo de Phe 169, por fazer parte do bolsão hidrofóbico de acoplamento de babesia divergens/RON2.

De acordo com o mapa de interações (Fig.31) a Pro77 e Val81 possuem cadeias laterais apolares, característica notadamente revelada pela disposição espacial dos grupos funcionais, a Val81 encontra-se na região mais hidrofóbica (Fig.29) a Tyr140 e Tyr155 encontram-se na disposição com seus átomos de oxigênio voltados para o ligante alicina e na região menos hidrofóbica.

A Tyr155 por possuir anel aromático e estar em uma área de cavidade realiza uma interação classificada como pi-sulfur (Fig.28), e também realiza uma interação hidrofóbica, o que revela a importância deste resíduo na estabilidade das proteínas.

De acordo com o RMSD dos três melhores ligantes resultantes do experimento (Tab.11), sendo que o ligante da segunda rodada de testes com RMSD de 2.182 Å e realiza as interações

com os mesmos resíduos de aminoácidos com exceção da ligação Pi Alkyl com a Tyr155 (Fig.29).

A superfície hidrofóbica do complexo alicina/ model_01Babesia Caballi (Fig.31), aponta a tendência de Pro77 e Val81 apolares estarem localizados na região mais hidrofóbica e a Tyr140 e Tyr155 polares em uma região intermediária, a hidrofobicidade de uma superfície ideal é determinada por sua energia livre de superfície (*Surface Free Energy/ SFE*).

6.2 Simulação de Dinâmica Molecular

Apesar da energia de afinidade ter se mostrado em torno de -2 Kcal/Mol, o mapa de interação (Fig.33) para esse complexo mostrou que possivelmente há a formação de ligações covalentes entre o ligante com a proteína PfAMA1 através dos aminoácidos Met224 e Asn225 descritos no mapa de interações (Fig.32). Além disso é possível observar que o peptídeo PfRON2 ajuda a estabilizar a interação desse ligante através de uma ligação de hidrogênio com o aminoácido Thr2039 que é um resíduo polar.

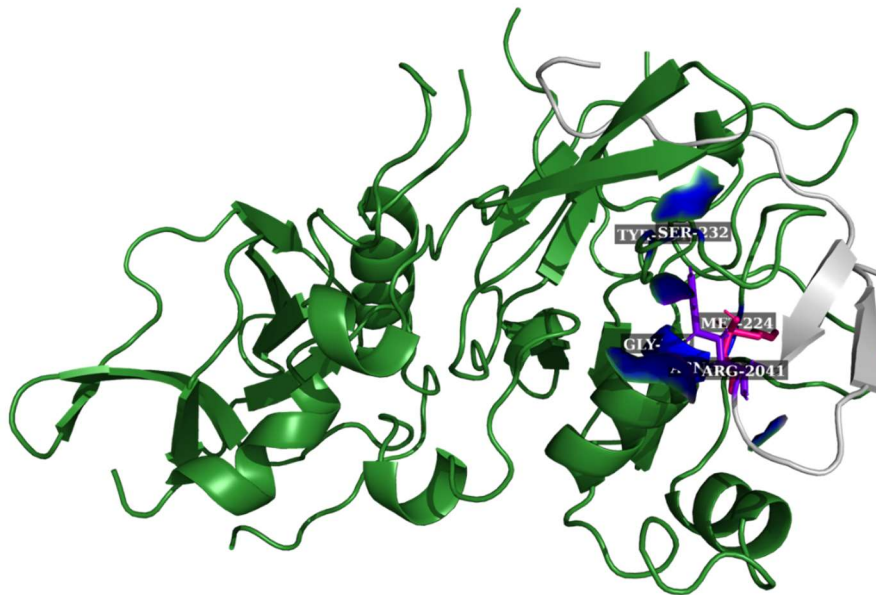


Figura 32 - Complexo PfAMA1-RON2 (3SRI), posicionamento do ligante alicina com o complexo PfAMA1-RON2 (3SRI) dentro do bolso de interação. A alicina aparece em magenta, enquanto a proteína AMA1 e o peptídeo RON2 aparecem em verde e cinza, respectivamente. Figura obtida através do aplicativo *DS-Visualizer Biovia*.

Segundo o mapa de interações (Fig.33) os resíduos de aminoácidos Phe 183 e Met 224 resíduos apolares todos da cadeia A, por suas características hidrofílicas estão posicionados em regiões mais internas do bolsão hidrofóbico.

O ligante alicina com sua parte hidrofóbica realiza ligações covalentes com seus átomos de enxofre e o resíduo Met 224/A o qual é apolar e localiza-se no bolsão hidrofóbico (Fig. 32).

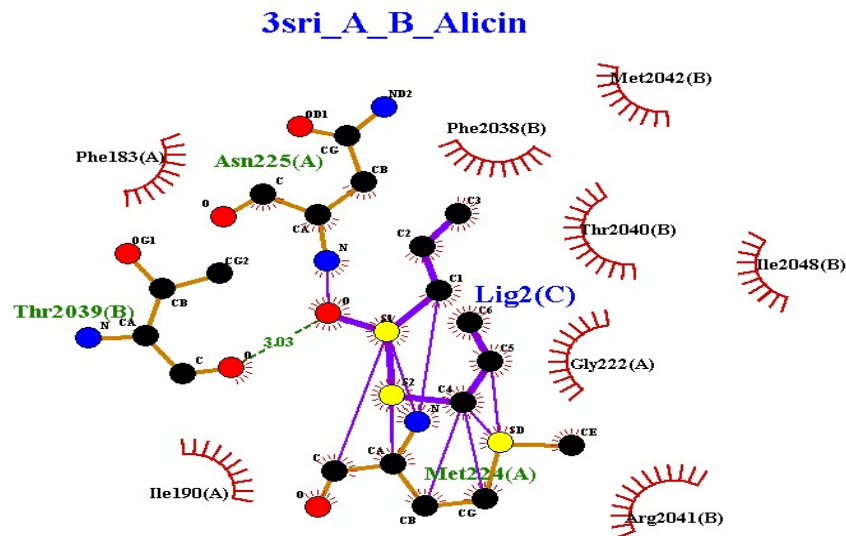


Figura 33 - Mapa de interações do complexo alicina/PDB 3SRI *Plasmodium falciparum* AMA1 em complexo com 29 aa PfRON2. Figura obtida através do aplicativo *LigPlotPlus*.

As simulações de dinâmica molecular foram utilizadas para verificar até que ponto a interação entre PfAMA1 e PfRON2 poderia ser afetada pela presença do ligante em questão. Neste caso foi possível verificar que o ligante permanece estável dentro do complexo, com um desvio quadrático médio (RMSD) em torno de 2 Å (0,2 nm) até os 65 nanossegundos (ns) de simulação. Após esse tempo, o ligante tem uma alteração de posição abrupta, atingindo mais de 13 Å (1,3 nm) de desvio e se estabilizando em 12 Å, o que indica que este deixou de interagir com o complexo e saiu do bolsão de interação AMA1-RON2 e possivelmente esteja acoplado à cadeia “A” onde realiza a maioria de interações eletrostáticas e ligações covalentes e assim impeça o acoplamento do complexo AMA1/Ron 2, o que dá condições de estabelecimento da Junção Móvel e posterior invasão do eritrócito (Fig. 34).

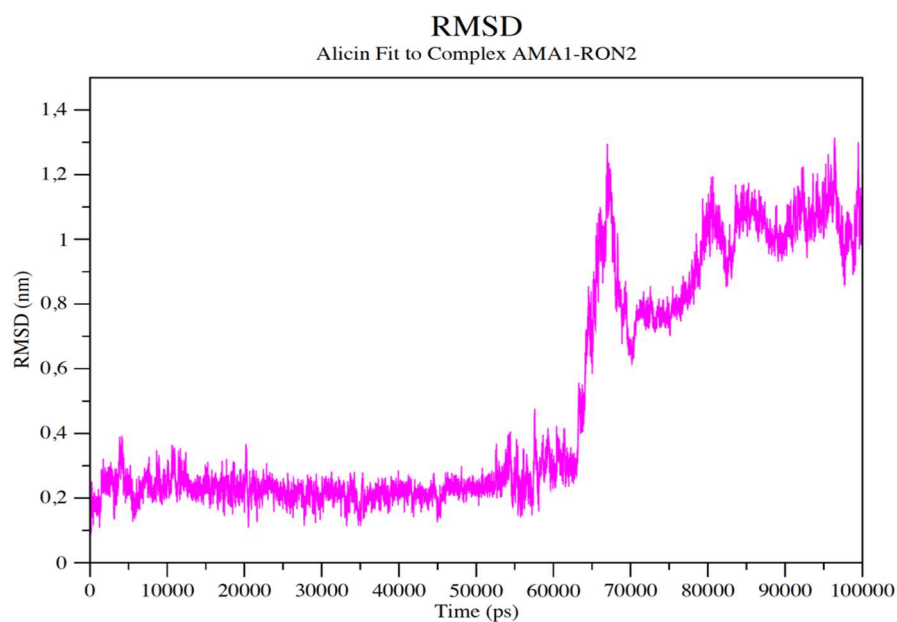


Figura 34 - Gráfico de estabilidade do RMSD do ligante alicina em interação com o complexo PfAMA1-RON2. Figura obtida através do programa *Grace*.

O gráfico de energia de curto alcance apresenta uma estabilização após os 15000(ps) chegando a -150 (KJ/mol) e se estabiliza até os 6000(ps) que indica que após este deixou de interagir com o complexo e saiu do bolsão de interação AMA1-RON2, aos 95000(ps) a energia demonstra um retorno a estabilidade e possivelmente esteja acoplado à cadeia “A” onde realiza a maioria de interações eletrostáticas e ligações covalentes e assim impeça o acoplamento do complexo AMA1/Ron 2, o que dá condições de estabelecimento da Junção Móvel e posterior invasão do eritrócito (Fig. 35).

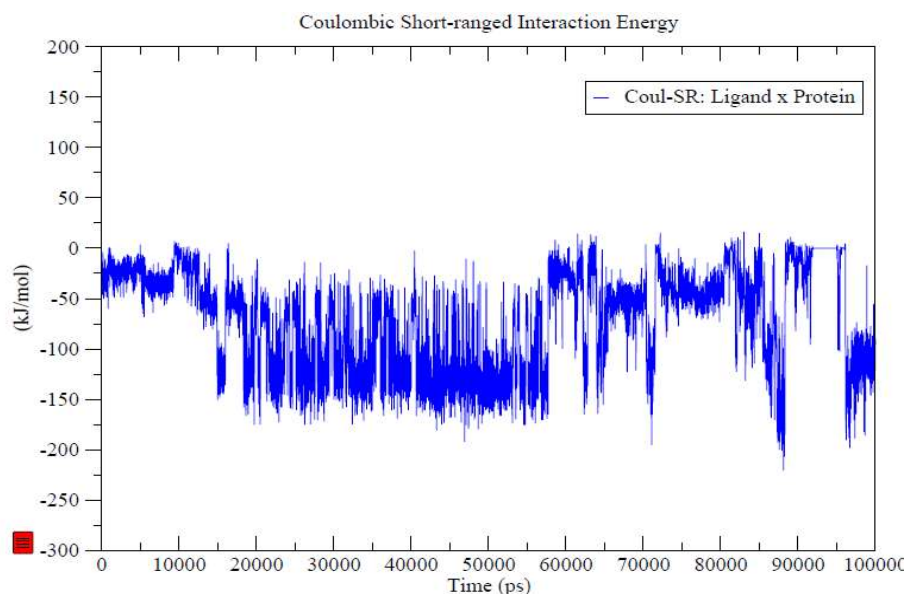


Figura 35 - Gráfico de estabilidade de energia de curto alcance do ligante alicina em interação com o complexo PfAMA1-RON2. Figura obtida através do programa *Grace*.

Apesar das oscilações no RMSD apresenta estabilidade de interação até 90000 (os) e retorna após 95000 (os), conclui-se que não há uma variação significativa nas interações com os tipos de resíduos de aminoácidos em função da flutuação apresentada (Fig. 36).

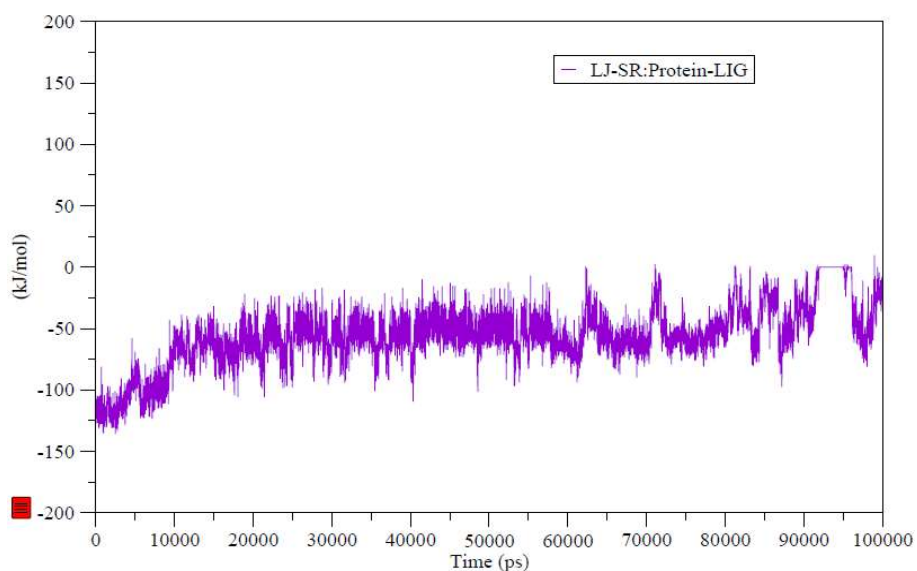


Figura 36 - Gráfico de flutuação de aminoácidos do ligante alicina em interação com o complexo PfAMA1-RON2. Figura obtida através do programa *Grace*.

7 CONCLUSÕES

A *T. equi* e *B. caballi* são doenças conhecidas de parasitas do filo apicomplexa e que compartilham estratégias de invasão de células de glóbulos vermelhos. São reconhecidamente importantes para a saúde humana e animal; logo os esforços para prevenção e erradicação destas doenças são objetivos de pesquisas em diversas áreas, dentre elas a biotecnologia. Na busca de novos fármacos, os recursos de bioinformática são de importância fundamental e podem contribuir para esclarecer as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos complexos alicina com proteínas de parasitas apicomplexos, diminuindo assim em grande parte os custos envolvidos no processo.

Para tal, este trabalho se dedicou em caracterizar uma molécula com atividade antiparasitária contra *T. equi* e *B. caballi*, e realizar experimentos para sua aplicação como fármaco integrante da dieta de equinos.

Os experimentos de acoplamento molecular da alicina com as proteínas PDB Id 3SRI plasmodium falciparum PfRON2 com 29 aa, AMA1/*Babesia Divergens*, PDB Id 4APM e model_01 *Babesia Caballi* foram analisados através das interações não covalentes com o ligante alicina. A partir daí então foi possível observar a organização espacial dos complexos, e através da polaridade de seus resíduos e suas interações, localizar as regiões mais importantes e que contribuem na influência de modificação estrutural da proteína em questão.

Dos resíduos de aminoácidos que interagiram com o ligante alicina, vários são pertencentes a sequências conservadas e comuns entre os integrantes do filo apicomplexa, e amplamente descritos em trabalhos anteriores, são essenciais para alvos moleculares e alteração da estrutura da proteína, portanto, também da sua funcionalidade.

Nos experimentos de acoplamento molecular foram predominantes as interações com resíduos de aminoácidos apolares, característica esta revelada pela disposição espacial dos grupos funcionais e pela sua taxa de inserção na cavidade proteica de acordo com os mapas de hidrofobicidade apresentados neste trabalho, realçando assim a importância das interações não covalentes para o estudo de candidatos a fármacos.

Também foi verificada a presença comum das ligações de hidrogênio, que com sua força de atração dependente da magnitude da distância, as quais são favoráveis a permanência do ligante na proteína, em adição a característica hidrossolúvel da região molecular favorece o caráter de solubilidade de um fármaco o que facilita sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

A alicina é um composto hidrofóbico, o que significa que é solúvel em solventes apolares, como lipídios e possui uma certa característica de interação facilitada no ambiente do interior

das proteínas, a curvatura do ligante na sua porção enxofre mostra que a alicina pode se acomodar na região hidrofóbica da bicamada lipídica o que foi evidenciado pelo *RMSD* de posição dos ligantes nas várias rodadas para a escolha da melhor pose.

Em prosseguimento, a hidrofobicidade observada nos experimentos apresenta sua direta proporcionalidade ao número de interações com resíduos de aminoácidos apolares, sugerindo assim a tendência de estabilização da estrutura proteica na direção de um gradiente de energia menor em relação ao ambiente de solvatação externo ao bolso hidrofóbico, onde é o local de acoplamento do ligante.

O desvio padrão da energia total do ligante nas três rodadas de acoplamento molecular foi maior com a proteína modelo1_ *Babesia caballi*, e menor com a proteína PBD Id 4APM *Babesia divergens*, o que como medida de dispersão indica um menor grau de variação no desvio padrão quanto mais próximo do zero. Sendo que a melhor pose do ligante é determinada pela menor energia total, e as proteínas modelo1_ *Babesia caballi* e PBD Id 4APM *Babesia divergens*, nesta ordem, foram as melhores poses do ligante de acordo com os experimentos realizados.

A diferença de *RMSD* da melhor configuração de ajuste do ligante alicina na primeira rodada do algoritmo foi menor para a proteína modelo1_ *Babesia caballi* e maior para PBD Id 3 SRI/PfRON2, ficando a proteína PBD Id 4APM *Babesia divergens* em uma posição intermediária, demonstrando maior afinidade de interações do ligante com a sequência de aminoácidos de *Babesia*.

As energias de van der Waals, que representam as interações de curto alcance para moléculas em um meio solvatado, tiveram o melhor desempenho as interações com as proteínas: PBD Id 4APM *Babesia divergens* e modelo1_ *Babesia caballi*.

Quanto às energias eletrostáticas de longo alcance ou de coulomb, a proteína PBD Id 3 SRI/PfRON2 apresentou maior valor de energia, seguida das proteínas: PBD Id 4APM *Babesia divergens* e modelo1_ *Babesia caballi*.

A energia de afinidade serve para ranquear diferentes ligantes pela energia de ligação, a proteína modelo1_ *Babesia caballi* obteve a maior afinidade seguida pelas proteínas: 4APM *Babesia divergens* e PBD Id 3 SRI/PfRON2.

Durante o experimento de dinâmica molecular foi possível observar a estabilização do peptídeo PfRON2 e o ligante alicina, por outro lado, ligações covalentes também foram realizadas pelos átomos de enxofre do ligante.

As simulações de dinâmica molecular verificaram que o ligante permanece estável dentro do complexo, a interação entre PfAMA1 e PfRON2 foi afetada pela presença do ligante. O desvio quadrático foi satisfatório em relação ao tempo de simulação e sua alteração de desvio,

também a flutuação de resíduos de aminoácidos e a energia das ligações de curto alcance indicam que posteriormente o ligante esteja acoplado à cadeia “A” e contribuindo assim para impedir a realização da junção móvel e posterior invasão do eritrócito pelo merozoíto igualmente ao que aconteceu em PfRON2.

Desta forma, os experimentos de acoplamento e dinâmica molecular permitiram uma análise dos resíduos de aminoácidos envolvidos e suas interações, cujas características contribuíram sobremaneira para as propriedades farmacológicas e estabilização do ligante alicina no meio hidrofóbico e de interação com a região de aminoácidos conservados nas sequências de diferentes proteínas integrantes do filo apicomplexa.

O *RMSD*, energia total, afinidade e interações de curto e longo alcance demonstraram o bom desempenho do ligante alicina com as sequências de aminoácidos da babesia, este trabalho buscou estabelecer uma correlação dos ensaios biológicos “*in vitro*” e as técnicas de *acoplamento* e dinâmica molecular aqui apresentadas.

Conclusivamente: a permanência do ligante alicina no complexo PDB Id 3SRI PfAMA1/RON2 durante um período de tempo, sujeito às equações de movimento, temperatura e pressão em ambiente solvatado e suas interações nos experimentos de acoplamento molecular, corroboram a disposição para agir funcionalmente nas proteínas de parasitas do filo apicomplexa, indicando assim que as propriedades farmacológicas da alicina oferecem condições para sua incorporação na dieta animal de equinos como base para um novo fármaco.

Perspectivas futuras apontam o prosseguimento deste trabalho como um projeto, com experimentos *In Vivo*, para a regulação da dosagem do fármaco, monitoramento dos parâmetros biológicos, cuja entrega será uma patente, a ela associado, e um produto biotecnológico para o tratamento e a prevenção de afecções causadas por *T. equi* e *B. caballi* em equinos.

8 REFERÊNCIAS

ANKRI, S. et al. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2286–2288, 1997.

BACKX NORONHA MADEIRA, A. M. **Taxonomia do Filo Apicomplexa**, 2007. Disponível em: <<https://slideplayer.com.br/slide/13447778/>>

BATIHA, G. E. S. et al. In vitro and in vivo growth inhibitory activities of cryptolepine hydrate against several babesia species and theileria equi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1–15, 2020.

BORLINGHAUS, J. et al. Allicin: Chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12591–12618, 2014.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 335–373, 2003.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–13, 2017.

DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J. Hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and failure of the rigid receptor hypothesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 38, n. 6, p. 736–749, 1999.

ERMONDI, G.; CARON, G. Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1633–1645, 2006.

FILHO, T. F. B. **Dinamica Molecular**, 2022. Disponível em: <<https://teodianobastoslab.net/Bioinformatica/DinamicaMolecular.pdf>>

FONSECA, L. A. DA. **Reação em cadeia da polimerase (PCR) de sangue periférico e esplênico para diagnóstico de babesiose equina**. [s.l.: s.n.].

FRITZ, D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). **Parasitology Research**, v. 106, n. 6, p. 1339–1342, 2010.

GUEDES, I. A. et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2021.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GUEDES, I. A.; KREMPSE, E.; DARDENNE, L. E. DockThor 2.0: a free web server for protein-ligand virtual screening. **XIX SBQT–Simpósio Brasileiro de Química Teórica**, v.

2013, p. 2013–2014, 2017.

HALGREN, T. A. Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 1996, p. 520–552, 2000.

HALGREN, T. A.; NACHBAR, R. B. MMFF94 IV - Conformational Energies and Geometries for MMFF94. v. 615, n. 1996, p. 587–615, 1996.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, 2012.

J.G. BERNARDI SOARES; F. M. ARAÚJO - MOREIRA. International Cross-border Movements of Horses in the State of Rio Grande do Sul - Brazil: Zoonoses, Biosafety, and Biodefense. **Open Access Research Journal of Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 022–028, 2023.

K. VANOMMESLAEGHE AND A. D. MACKERELL JR. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: bond perception and atom typing. **Gerontology**, v. 61, n. 6, p. 515–525, 2012.

KENDREW, J. C. Myoglobin and the structure of proteins. **Science**, v. 139, n. 3561, p. 1259–1266, 1963.

KOSHLAND, D. E. The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory Introduction of the Induced Fit Theory. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 33, n. 510, p. 2375–2378, 1994.

LAMARQUE, M. et al. The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.

LISBOA, C. D. E. Faculdade de Medicina Veterinária. 2008.

LOI, V. VAN et al. Staphylococcus aureus responds to allicin by global S-thioallylation – Role of the Brx/BSH/YpdA pathway and the disulfide reductase MerA to overcome allicin stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 139, n. May, p. 55–69, 2019.

MONTERO, E. et al. Babesia divergens Apical Membrane Antigen 1 and Its Interaction with the Human Red Blood Cell. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 11, p. 4783–4793, 2009.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Quimica**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NORMAND, B. V. LE et al. Cross-reactivity between apical membrane antigen 1 and rhoptry neck protein 2 in *P. vivax* and *P. falciparum*: A structural and binding study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–14, 2017.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205–217, 2000.

PAULO, U. D. S.; GRUBER, A. Apicomplexa : Babesia. [s.d.].

PEDRO. **Interação Enzima - Substrato**. Disponível em: <<http://10ebgspedro.weebly.com/>>.

PITEL, P. H. et al. Molecular detection of Theileria equi and Babesia caballi in the bone marrow of asymptomatic horses. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 182–184, 2010.

Pymol. Disponível em: <<https://pymol.org/2/#page-top>>.

RICHTER, G. **PANORAMA DA EQUINOCULTURA NO RIO GRANDE DO SUL: EVOLUÇÃO DE 2010 A 2016**. [s.l.] UFRGS, 2017.

SALAMA, A. A. et al. Inhibitory effect of allicin on the growth of Babesia and Theileria equi parasites. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 275–283, 2014.

SANTOS, G. R. R. M. **Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de Xanthomonas axonopodis pv . citri**. [s.l: s.n.].

SANTOS, K. B. et al. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-Peptide Data Set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 667–683, 2020.

SCOLES, G. A.; UETI, M. W. Vector ecology of equine piroplasmiasis*. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 561–580, 2015.

SILVA.RUI, UFSC. 2019. **São Carlos – SP 2019**. [s.l.] UFSCaR, 2019.

SUNHWAN JO, ET ALL. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. **Journal of computational chemistry**, v. 32, p. 174–182, 2008.

TARSO, P. DE et al. Ciência Rural Babesiose em cavalos atletas portadores Babesiosis in carrier athletic horses. 2005.

TONKIN, M. **Molecular Strategies for Active Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites**. [s.l.] BSc, Abilene Christian University, 2009, 2014.

TONKIN, M. L. et al. Babesia divergens and Neospora caninum apical membrane antigen 1 structures reveal selectivity and plasticity in apicomplexan parasite host cell invasion. **Protein Science**, v. 22, n. 1, p. 114–127, 2013.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 2003.

VOMMARO, R. C.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. A Interação de Toxoplasma gondii com a Célula Hospedeira. p. 69–81, 2014.

VULLIEZ-LE NORMAND, B. et al. Structural and functional insights into the malaria

parasite moving junction complex. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, 2012.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018.

WISE, L. N. et al. Review of equine piroplasmiasis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334–1346, 2013.