



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Tayane Honorato Siqueira

**SIMULAÇÕES MOLECULARES DA INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DE
ESTERÓIS EM ORTÓLOGOS DA ENZIMA ESTEROL 14 α -DESMETILASE-
CYP51**

**CAMPINAS
2020**

Tayane Honorato Siqueira

**SIMULAÇÕES MOLECULARES DA INIBIÇÃO DA BIOSÍNTESE DE
ESTERÓIS EM ORTÓLOGOS DA ENZIMA ESTEROL 14 α -DESMETILASE-
CYP51**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Doutora em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martínez

**O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna
Tayane Honorato Siqueira e orientada pelo Prof. Dr. Leandro Martínez.**

**CAMPINAS
2020**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Si75s Siqueira, Tayane Honorato, 1988-
Simulações moleculares da inibição da biossíntese de esteróis em ortólogos da enzima esteroil 14 α -desmetilase-CYP51 / Tayane Honorato Siqueira. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Leandro Martínez.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Dinâmica molecular. 2. Fluconazol. 3. Citocromo P-450. I. Martínez, Leandro, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular simulations of the inhibition of biosynthesis of sterols in orthologs of the enzyme sterol 14 α -demethylase-CYP51

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamics

Fluconazole

Cytochrome P-450

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Leandro Martínez [Orientador]

Rogério Custodio

Miguel Angel San Miguel Barrera

Antonia Tavares do Amaral

Ignez Caracelli

Data de defesa: 03-06-2020

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6912-9898>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5426379856826744>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leandro Martínez (Orientador)

Prof. Dr. Rogerio Custodio (IQ - UNICAMP)

Prof. Dr. Miguel Angel San Miguel Barrera (IQ - UNICAMP)

Profa Dra. Antonia Tavares do Amaral (IQ - USP)

Profa Dra. Ignez Caracelli (DF – UFSCAR)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **Tayane Honorato Siqueira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de junho de 2020.

Dedico esta tese à minha mãe, Sônia Honorato. Seu amor, sabedoria e força me inspiram a buscar sempre o meu melhor.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”. (Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

Ao professor Dr. Leandro Martínez pela orientação, motivação, paciência e o valioso acompanhamento durante todo o desenvolvimento desta pesquisa. Permanecerá a admiração pelo cientista, educador e o grande ser humano que és.

Aos professores. Dr Rogério Custodio, Dr Miguel San Miguel, Dra Antônia Tavares do Amaral e Dra Ignez Caracelli.

Aos colegas de grupo, em especial, ao Gabriel Jara (Gaby) e Ricardo Nascimento dos Santos com quem vivi valiosos momentos durante esta caminhada. Aos colegas Paulo Cesar Telles de Souza e Melina Mottin que sempre me incentivaram.

Aos funcionários da CPG do IQ e ao Adriano Ferruzi pelo suporte técnico e operacional do cluster.

A minha família, Mãe, Irmã, Kaka, Meggy, Italo pela sorte de ter vocês na minha vida!

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro (Processo de bolsa nº161305/2014-8).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Estima-se que fungos patogênicos causem 11,5 milhões de graves infecções e afetem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo anualmente. Os quimioterápicos antifúngicos da classe triazólica, como o fluconazol, considerados pela Organização Mundial de Saúde um medicamento essencial, têm se mostrado insuficientes para tratar muitas infecções fúngicas. Portanto, uma nova classe de compostos antifúngicos deve ser desenvolvida, o que pode ser feito a partir da compreensão da base molecular da afinidade e especificidade do fluconazol. O alvo molecular para os compostos triazólicos é o produto do gene ERG11, o citocromo P450 Esterol 14 α -desmetilase (CYP51), que faz parte da via biossintética do ergosterol. Neste estudo, simulações de dinâmica molecular e docking molecular foram utilizadas para explorar os modos de ligação do fluconazol nas enzimas de CYP51 presentes em *H.sapiens* (Hs), *M.tuberculosis* (Mt), *C.albicans* (Ca) e *C.glabrata* (Cg) e quatro mutantes de CYP51-Ca. Observou-se que as enzimas humanas e micobacterianas são mais flexíveis que as variantes fúngicas. O CYP51-Mt exibe flutuações estruturais importantes no loop BC que permitem o acesso e/ou egresso de ligantes do sítio de ligação que não estão presentes nos outros ortólogos. Isso resulta em um ligante com maior flexibilidade. No entanto, um resíduo polar no sítio de ligação do ortólogo micobacteriano leva a interações proteína-ligante mais fortes. Esta substituição é compensada por interações do ligante com o grupo HEME e com moléculas de água, de tal modo que as energéticas globais de ligação favorecem as enzimas fúngicas na ordem observada experimentalmente. Estes resultados sugerem que ligantes com grupos hidrofóbicos maiores serão estabilizados no bolso de ligação das enzimas humanas e micobacterianas, enquanto ligantes menores projetados para formar ligações polares específicas com o grupo HEME devem ser projetados para aumentar a especificidade das enzimas fúngicas. A avaliação dos mutantes de CYP51-Ca, associadas à resistência ao fluconazol, revelaram que as alterações de aminoácidos na região do bolso de ligação afetaram distintamente a flexibilidade em CYP51-Ca. Os diferentes padrões de interação entre o ligante fluconazol e resíduos chaves presentes no sítio de ligação nas estruturas mutantes de CYP51-Ca sugerem que as conformações específicas do fluconazol amostraram os estados associados a maior afinidade ao fluconazol, enquanto outra conformação foi exclusivamente amostrada nas simulações das estruturas mutantes (Y132F, Y132H e S405F), compondo um modo de ligação de mais baixa afinidade. Verificou-se também que as mutações afetaram a estabilidade da região do bolso de ligação do grupo heme. As presentes observações nos levaram a deduzir que a 'força inibitória' do quimioterápico fluconazol no sítio ativo da enzima CYP51-Ca segue a ordem: Nativa>Y132F>K143R>S405F \geq Y132H.

ABSTRACT

Pathogenic fungi are estimated to cause 11.5 million serious infections and affect more than one billion people worldwide annually. Antifungal chemotherapy drugs of the triazolic class, such as fluconazole, considered by the World Health Organization to be an essential drug, have been shown to be insufficient to treat many fungal infections. Therefore, a new class of antifungal compounds must be developed, possibly from the understanding the molecular basis of the affinity and specificity of fluconazole. The molecular target for triazole compounds is the product of the ERG11 gene, cytochrome P450 Esterol 14 α -demethylase (CYP51), which is part of the biosynthetic pathway of ergosterol. In this study, molecular dynamics and molecular docking simulations were used to explore fluconazole binding to CYP51 enzymes present in *H.sapiens* (Hs), *M.tuberculosis* (Mt), *C.albicans* (Ca) and *C.glabrata* (Cg) and four CYP51-Ca mutants. It was observed that human and mycobacterial enzymes are more flexible than fungal variants. The CYP51-Mt exhibits important structural fluctuations in the BC loop that allow access and/or egress of ligands from the binding site that are not present in other ortholog. This results in a binder with greater flexibility. However, a polar residue at the mycobacterial ortholog binding site leads to stronger protein-ligand interactions. This substitution is compensated by interactions of the ligand with the HEME group and with water molecules, in such a way that the global energetics of binding favor the fungal enzymes in the order observed experimentally. These results suggest that ligands with larger hydrophobic groups will be stabilized in the binding pocket of human and mycobacterial enzymes, while smaller ligands designed to form specific polar bonds with the HEME group should be designed to increase the specificity of fungal enzymes. The evaluation of CYP51-Ca mutants, associated with resistance to fluconazole, revealed that changes in amino acids in the region of the binding pocket distinctly affect flexibility in CYP51-Ca. The different patterns of interaction between the fluconazole ligand and key residues present in the binding site of the mutant structures of CYP51-Ca suggest that fluconazole sampled the states associated with greater affinity, while another conformation was exclusively sampled in the simulations of the mutant structures (Y132F, Y132H and S405F), composing a lower affinity binding mode. It was also found that the mutations affect the stability of the heme group binding pocket region. The present observations led us to deduce that the 'inhibitory force' of the chemotherapeutic fluconazole at the active site of the enzyme CYP51-Ca follows the order: Native > Y132F > K143R > S405F \geq Y132H.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Carga global das principais infecções fúngicas que ameaçam a vida em indivíduos imunocomprometidos. Visualiza-se a intersecção entre graves infecções fúngicas com tuberculose (TB), HIV, Câncer, Asma (SAFS), Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e suas respectivas taxas de mortalidade estimada. Fonte: adaptada de dados obtidos de www.GAFFI.org..... 21

Figura 2 - Ocorrência das principais infecções pelo gênero *Candida* sp. (A) Percentual de isolados de *Candida* sp. resistentes aos antifúngicos fluconazol, equinocandinas e outros segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) de 2009 a 2017; (B) Taxas relativas de candidemia invasiva causada por diferentes espécies do gênero *Candida*.sp. Fonte: Adaptada de CDC - www.cdc.gov..... 22

Figura 3 - Registro da distribuição espaço-temporal da incidência de resistência dos patógenos *A.fumigatus*, *C.albicans*, *C.auris*, *C.glabrata*, *C.gattii* e *C.neoformans* aos antifúngicos da classe azólica. O aumento da intensidade de cor (escala vermelha) descreve a crescente incidência de resistência destes patógenos aos azóis do ano de 1987 ao ano de 2017 em diferentes partes do mundo. Adaptado de Fisher et al. 2018¹⁷..... 23

Figura 4 - Representação esquemática comparativa da biossíntese de esteróis entre diferentes classes de seres vivos. Embora, os esteróis sejam formados a partir da acetilcoenzima A e via do mevalonato, a oxidação enzimática do esqualeno marca o ponto de ramificação entre a biossíntese de hopanóide em procariontes (algumas bactérias) que o distingue da bioquímica de esteróis em eucariontes. É formado ergosterol em fungos e protozoários, colesterol no homem e em animais e sitosterol em plantas. A) A enzima CYP51 catalisa a desmetilação do carbono 14 do substrato lanosterol, a partir de uma sequência de três reações oxidativas, I, II e III; B) Fluconazol inibe a enzima CYP51 fúngica e impede a correta biossíntese de ergosterol. Em vez de formar ergosterol, que é o principal esterol constituinte das membranas celulares dos fungos são sintetizados esteróis tóxicos os quais têm efeito fungistático na célula fúngica. 26

Figura 5 - A cavidade do sítio catalítico da enzima CYP51 fúngica de *Candida glabrata* disponível no Protein Data Bank (PDB id 5JLC). O presente modelo estrutural ilustra as interações da heme proteína com o inibidor fluconazol e com o resíduo de cisteinato altamente conservado na família de enzimas do citocromo P450. É possível visualizar também a presença de uma α -hélice do tipo transmembranar que conecta a enzima a bicamada lipídica celular de organismos eucariontes, particularmente presentes em CYPs fúngica e humana. 27

Figura 6 - Evolução cronológica dos principais quimioterápicos antifúngicos da classe azólica e suas respectivas estruturas moleculares. 31

Figura 7 - Mecanismo de resistência ao fluconazol em *Candida albicans*. (A) Alteração da enzima alvo (mutações pontuais no gene ERG11); (B) Regulação positiva de genes *Candida Drug Resistance* CDR1, CDR2 (Transportadores de membrana) e efluxo do antifúngico do interior celular; (C) superexpressão de CYP51 e (D) Mutação do gene ERG3 que bloqueia a síntese do esteroide tóxico 14-metil-ergosta-8,24(28)-dien-36-diol, resultando na acumulação de 14 α -metilfecosterol que é capaz de suportar a função da membrana da célula fúngica. Adaptado de Parker et al. 2014⁷⁰. 35

Figura 8 - Termos que representam as interações ligadas e não ligadas da Energia Potencial do campo de força CHARMM: 1) Energia de Ligação, 2) Energia do Ângulo de ligação, 3) Energia do diedro próprio, 4) Energia do diedro impróprio e 5) Energia Urey-Bradley. Os tipos de potenciais das interações do tipo ligadas e não ligadas também estão representados. 40

Figura 9 – Sobreposição entre a estrutura inicial simplificada do fluconazol, na qual um dos anéis triazólicos foi omitida, construída no molefacture e a estrutura otimizada em gaussian09 no nível de teoria MP2/6-31G(d) (em amarelo). 49

Figura 10 - Alinhamento estrutural das sequências de aminoácidos das enzimas CYP51 humana, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida glabrata* e *Candida albicans*. Os elementos de estrutura secundária de CYP51 de *C.glabrata* (PDB-5JLC), *C.albicans* (PDB-5TZ1), *H.sapiens* (PDB-3LD6) e *M.tuberculosis* (PDB-1EA1) estão representados acima da sequência primária. Os aminoácidos conservados estão destacados em vermelho; os que apresentam características semelhantes, em amarelo. Os asteriscos ‘ * ’ indicam quais aminoácidos que fazem parte do sítio de interação das proteínas selecionadas a partir de 4.0 Å do grupo Heme (HEM). O Retângulo em cinza marca o segmento específico de CYP51 fúngica, o β 5 hairpin. O alinhamento da sequência primária entre os ortólogos de CYP51 foi gerado com o programa Clustal-Omega¹³⁸, e a informação de estrutura secundária foi adicionada a este alinhamento com a ajuda do servidor web ENDscript¹³⁹. 62

Figura 11 - Análise comparativa das estruturas do CYP51 deste estudo. A) Em CYP51-Mt (PDB id 1EA1) dois canais conectam o local de ligação com o solvente. O canal 2 é comum a todos os CYP51s e o Canal 1 é específico de CYP51-Mt. O canal 1 existe devido ao maior comprimento e flexibilidade do loop BC. B e C) A estrutura humana de CYP51 (PDB id 3LD6) e estruturas fúngicas CYP51-Ca (PDB id 5TZ1), CYP51-Cg (PDB id 5JLC) exibem o canal 2 em comum com CYP51-Mt. (C) CYP51-Cg tem uma hélice transmembrana adicional (T-anchor). C) Superposição estrutural dos quatro ortólogos do CYP51 indicando as regiões de grande variabilidade: a hélice-I, o loop HI e a hélice-H, e o loop GH e a hélice G são deslocadas em CYP51-Mt em relação às enzimas fúngicas e humana; o loop BC de CYP51-Mt é mais longo o que leva à abertura do Canal

1; O β 5-hairpin, que é o segmento filo-específico das enzimas CYP51 fúngicas. O ligante é mostrado em verde na representação vdw e o grupo Heme é mostrado em representação sticks..... 63

Figura 12 - Flutuações estruturais das estruturas de CYP51. A) CYP51-Mt, B) CYP51-Ca; C) CYP51-Cg, D) CYP51-Hs. Regiões de menor flexibilidade são mostradas em azul, e regiões de maior flexibilidade são mostradas em verde. E) RMSDs do loop BC, do bolso de ligação do heme, heme-bulge e da hélice I, mostrando as maiores flutuações estruturais dessas regiões em CYP51-Mt e CYP51-Hs em relação aos ortólogos fúngicos. F) Conformações do ligante no bolso de ligação: Seis diferentes conformações foram observadas, sendo a cristalográfica predominante em enzimas fúngicas, enquanto a conformação mais frequente em CYP51-Mt difere da estrutura cristalográfica por uma rotação de um dos anéis triazólico. A conformação mais frequente no CYP51-Hs difere da estrutura cristalográfica por uma rotação dos anéis triazólico e 2,4-difluorofenil e pela inclinação da molécula em relação ao plano Heme. 66

Figura 13 - Resíduos do sítio ativo e suas interações com o fluconazol. A) Resíduos pertencentes ao sítio ativo de acordo com os modelos cristalográficos. Uma diferença importante entre as enzimas fúngicas e os ortólogos de Mt e Hs ocorre na posição Arg96/Leu139/Leu148/Phe152. B) Resíduos em contato com o fluconazol que durante as simulações apresentaram diferentes perfis de interação com o ligante. C) Distâncias de Tyr76/118/127/131 e Phe89/Tyr132/141/145 em relação aos átomos de carboxilato dos grupos HEME, que competem com as interações polares com o ligante. D) Interações de Arg96 de CYP51-Mt com o ligante e com os carboxilatos do HEME. Essas interações polares são exclusivas da enzima micobacteriana. E) Interações no sítio de ligação no CYP51-Hs: ocorre uma interação persistente entre os resíduos Tyr145 e Phe152; e os resíduos Tyr131, Phe234, His314 e Leu310 formam interações esporádicas, mas importantes com o fluconazol..... 72

Figura 14 - Energias de interação entre o fluconazol e os componentes dos sistemas: A) Interações ligante-ambiente total. B) Interações ligante-proteína. C) Interações ligante-HEME. D) Interações ligante-água. E) Representação do sítio de ligação do CYP51-Ca que apresenta o ingresso de moléculas de água no sítio ativo na região próxima do loop BC, que compensa parcialmente as interações ligante-proteína mais fracas em relação a CYP51-Mt e CYP51-Hs, mas que levam à desestabilização da ligação. 74

Figura 15 – Sequência do gene Erg11 que codifica a enzima Esterol 14 α -desmetilase de *C.albicans*. As mutações em cepas resistentes ao fluconazol encontradas experimentalmente estão indicadas por setas. A estrutura secundária está indicada por α -hélices nomeadas por letras de A até L. Também é visualizado o quinto ligante do heme, o resíduo de cisteína C470 e a α -hélice transmembranar T..... 78

- Figura 16** - Análise comparativa das propriedades estruturais RMSD, Raio de giro, Contatos nativos em (A) e área de superfície acessível ao solvente (B) entre a estrutura nativa e mutantes de CYP51 de *Candida albicans*. 81
- Figura 17** - Análise comparativa das propriedades dinâmicas: flutuações da média da raiz quadrada - RMSF entre a estrutura nativa e mutantes de CYP51-Ca em relação aos resíduos (210 a 480) em (A); Diversidade conformacional do ligante Fluconazol amostrados em simulações de MD ao longo de 200 ns da enzima CYP51 nativa e mutantes (Y132F, Y132H, K143R e S405F) de *Candida albicans* é mostrada em (B); Flutuações estruturais das estruturas de nativa e mutantes (Y132F, Y132H, K143R e S405F) de *Candida albicans* é mostrada em (C). Regiões de menor flexibilidade são mostradas em azul, e regiões de maior flexibilidade são mostradas em vermelho..... 83
- Figura 18** – Caracterização dinâmica das principais interações do quimioterápico fluconazol estabelecidas com os resíduos do sítio ativo de CYP51-Ca (nativa e mutantes: Y132/F/H a uma distância mínima de 4Å e que ocorreram em mais de 10% do tempo de simulação de MD. A avaliação da estabilidade das interações dos resíduos de tirosina em CYP51-Ca em relação ao grupo heme também foram avaliadas em (A); A representação das principais interações do fluconazol com os resíduos que compõem o sítio de ligação de CYP51-nativa (Y132) é mostrada em (B), Y132F em (C) e Y132H em D..... 86
- Figura 19** - Caracterização dinâmica das principais interações do quimioterápico fluconazol estabelecidas com os resíduos do sítio ativo de CYP51-Ca (nativa e mutante K143R a uma distância mínima de 4Å e que ocorreram em mais de 10% do tempo de simulação de MD. A avaliação da estabilidade das interações dos resíduos de tirosina em CYP51-Ca em relação ao grupo heme também foram avaliadas. A representação das principais interações do fluconazol com os resíduos que compõem o sítio de ligação de CYP51-nativa (a Esquerda) e mutante K143R (a direita) também podem ser visualizadas. 87
- Figura 20** – Caracterização das principais interações do quimioterápico fluconazol estabelecidas com os resíduos do sítio ativo de CYP51-Ca (nativa e mutante S405F) a uma distância mínima de 4Å e que ocorreram em mais de 10% do tempo de simulação de MD. A avaliação da estabilidade das interações dos resíduos de tirosina em CYP51-Ca em relação ao grupo heme também foram avaliadas. A representação das principais interações do fluconazol com os resíduos que compõem o sítio de ligação de CYP51-nativa (a Esquerda) e mutante S405F (a direita) também podem ser visualizadas..... 88
- Figura 21** - Energias de interação entre o fluconazol e os componentes dos sistemas em CYP51-Ca nativa e os quatro mutantes. A) Interações ligante-ambiente total. B) interações ligante-proteína. C) interações ligante-HEME. D) interações ligante-água. 90

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Principais tipos de infecções fúngicas ordenadas de acordo com a sua gravidade.....	19
Tabela 2 - Descrição das estruturas cristalográficas obtidas do Protein Data Bank - PDB e utilizadas neste estudo.	38
Tabela 3 - Tipos atômicos e cargas iniciais do fluconazol pré-definidas pela metodologia do CGenFF.	48
Tabela 4 - Cargas otimizadas do fluconazol	51
Tabela 5 - Ângulos diedrais impróprios e suas respectivas constantes de força $k\varphi$ e ângulo φ_0	54
Tabela 6 – Principais resíduos de CYP51 de M.tuberculosis (PDB:1EA1), C.albicans (PDB-5TZ1), C.glabrata (PDB-5JLC) e H.sapiens (PDB:3LD6) que interagem com o fluconazol a uma distância menor e igual a 4,0 Å.....	68
Tabela 7 - Resultados do docking molecular do fármaco fluconazol em ortólogos da enzima CYP51 e afinidades experimentais.....	76
Tabela 8 - Mutações encontradas em isolados de espécies de Candida albicans associadas a resistência e aumento da concentração mínima inibitória (MIC) do quimioterápico fluconazol.....	79
Tabela 9 - Resultados do docking molecular do quimioterápico fluconazol em mutantes da enzima CYP51 de Candida albicans.	92
Tabela A1 - Constantes da força de ligação e de torção de ângulos parametrizados para a estrutura do fluconazol.	110
Tabela A2 – Constantes de força, K, o ângulo de fase δ ($^\circ$) e multiplicidade, n, dos diedros parametrizados para a estrutura do fluconazol.....	111
Tabela A3 – Otimização dos ângulos diedrais e suas correspondentes constantes de força, K, o ângulo de fase δ ($^\circ$) e multiplicidade, n, para a estrutura do fluconazol.	112

Tabela A4 - Análise das energias de interação do fluconazol com o ambiente obtido a partir de simulações de MD. O intervalo de interações observado em cada caso é indicado pelo desvio padrão das flutuações. **113**

Tabela A5 - Análise comparativa das propriedades estruturais RMSD, Raio de giro, Contatos nativos e área de superfície acessível ao solvente entre a estrutura nativa e mutantes. **113**

Tabela A6 - Análise das energias de interação do fluconazol com o ambiente obtido a partir de simulações de MD. O intervalo de interações observado em cada caso é indicado pelo desvio padrão das flutuações. **114**

Lista de Abreviaturas

ABPA - Aspergilose broncopulmonar alérgica

COPD - Doença pulmonar obstrutiva crônica

CYP - Citocromo - P450

CYP51 - Esterol 14 α -desmetilase

CDC - Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos da América

CDR - Gene codificante de proteínas transportadoras de membrana do tipo *Candida Drug Resistance*

ERG11 - Gene codificante da enzima Esterol 14 α -desmetilase

ERG3 - Gene codificante da enzima Δ 5,6 - dessaturase

GAFFI (*Global Action Fund for Fungal Infections*)

LIFE (Leading International Fungal Education)

MD- Dinâmica Molecular

MDR1 - Gene codificante de proteínas transportadoras de membrana do tipo *Multidrug resistance*

P450-

14DM - Esterol 14 α -desmetilase

SAFS - Asma grave com sensibilização fúngica

TB - Tuberculose

TPF - Fluconazol

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	18
1- INTRODUÇÃO	18
1.1 - Cenário Mundial das Infecções fúngicas.....	18
1.2 - Esterol 14 α -desmetilase- CYP51 no desenvolvimento de quimioterápicos antifúngicos	24
1.3 - Quimioterápicos antifúngicos	29
1.3.1 - Quimioterápicos azólicos.....	30
1.3.2- O quimioterápico triazólico: Fluconazol	31
1.4 - Resistência fúngica ao quimioterápico fluconazol	33
OBJETIVOS	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
CAPÍTULO 2.....	37
2- METODOLOGIA.....	37
2.1 - Escolha do alvo e do inibidor e sua preparação.....	37
2.2 - Metodologia Teórica	38
2.2.1 - Simulações de dinâmica molecular	38
2.2.1.1 - Campo de força	39
2.2.1.2 - Integração das Equações de Movimento	41
2.3 - Protocolo das simulações de dinâmica molecular.....	43
2.4 - Parametrização de Ligantes	45
2.4.1 - Protocolo padrão de parametrização do fluconazol segundo o CGenFF	46
2.4.1.1 - Preparação do sistema	47
2.4.1.2 - Otimização da geometria	49
2.4.1.3 - Otimização das cargas	49
2.4.1.4 - Otimização dos comprimentos de ligações, ângulos e respectivas constantes de força	51
2.4.1.5 – Otimização dos ângulos diedrais.....	53
2.4.1.6 – Ângulos diedrais impróprios	54
2.5 - Docking Molecular	55
2.5.1- Protocolo das simulações de docking molecular	57
CAPÍTULO 3.....	60
3- RESULTADOS	60
3.1 - Base molecular da inibição da biossíntese de esteróis em ortólogos da enzima Esterol 14 α -desmetilase	60
3.1.1 - Análises comparativas entre os ortólogos de Esterol 14- α -desmetilase	60

3.1.2- Flutuações estruturais dos ortólogos de CYP51 e suas interações com o fluconazol.....	65
3.1.3- A inibição da atividade catalítica de ortólogos de CYP.....	68
3.1.4 - A energia de interação entre o fluconazol e ortólogos de CYP51.....	73
3.1.5 - Discussão geral.....	77
3.2 - Base molecular da resistência ao inibidor fluconazol em mutantes de Esterol 14 α -desmetilase-CYP51 de <i>Candida albicans</i>	78
3.2.1 - Análise comparativa dos aspectos estruturais e dinâmicos da inibição da atividade catalítica em mutantes de CYP51 de <i>Candida albicans</i>	79
3.2.2 - Aspectos gerais da inibição da atividade catalítica em mutantes de CYP51 de <i>Candida albicans</i>	84
3.2.2.1 - Mutantes Y132F e Y132H.....	85
3.2.2.2 - Mutantes K143R e S405F.....	86
3.2.3 - Caracterização energética das interações entre mutantes de CYP51-Ca e o ligante fluconazol.....	89
3.2.4 - Discussão geral.....	93
CAPÍTULO 4.....	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
PERSPECTIVAS.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXO.....	110

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Cenário Mundial das Infecções fúngicas

As infecções fúngicas adquiriram notabilidade no início do século XIX, a partir do surgimento da teoria microbiana das doenças. Agostino Bassi, conhecido como o “pai da micologia médica” na atualidade, conseguiu demonstrar experimentalmente a relação de uma doença desconhecida na época, que atacava o bicho-da-seda, o “mal de segno” (atualmente conhecida por muscardina) com a presença de fungos microscópicos. Bassi denominou estes fungos de *Botrytis paradoxa*, mas na atualidade são conhecidos por *Botrytis bassiana* em seu reconhecimento. Em 1835, Bassi publicou os resultados das suas pesquisas sob o título *Del mal de segno, calcinaccio o moscardino*¹. De acordo com as observações de Bassi a muscardina era causada por fungos microscópicos, os quais podiam transmitir a enfermidade dos animais mortos para os saudáveis por meio do contato ou por comida infectada. Bassi prescreveu na época uma forma de eliminação e prevenção deste patógeno fúngico sendo este o primeiro caso em que se estabeleceu experimentalmente a conexão causal entre um microorganismo e uma doença^{2,3,4}.

Em 1839, Langenbeck observou, pela primeira vez, em aftas bucais de um paciente com Tifo, a espécie fúngica patogênica, *Candida albicans* que Robin em 1853 havia denominado de *Oidium Albicans*. Em 1840 descobriu-se que os fungos também eram responsáveis por causar enfermidades em plantas (por exemplo, a ferrugem e o carvão), e investigadores da época, inclusive Bassi, relacionaram os fungos com enfermidades que acometiam os tegumentos e as mucosas de humanos e animais^{5,6}. Numa série de artigos publicados entre 1841 e 1844, David Gruby descreveu os fungos associados a quatro enfermidades na espécie humana. Em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral, classificando o microorganismo no gênero *Sporotricum*. Todavia foi Berkhout, em 1923, que

estabeleceu o gênero *Candida* e nomeou a espécie conhecida hoje como *Candida albicans*^{7,8}.

Somente a partir das décadas de 1970 e 1980 constatou-se um novo avanço significativo acerca do entendimento e conhecimento das infecções causadas por diferentes espécies patogênicas do reino Fungi⁹. Mais de 111 denominações, descritas no livro *The yeast*, de 1984, foram atribuídas ao gênero *Candida* ao longo da história. Tal como observado por Ainsworth, em 1976, em seu informativo estudo sobre a história da micologia, os fungos foram eclipsados primeiro pelas bactérias e depois pelos vírus como patógenos do homem, e o estudo dos fungos causadores de doenças à espécie humana foi negligenciada até a última década daquele século, quando Raymond Jacques Sabouraud teve que redescobrir as observações feitas a cerca de 50 anos atrás por David Gruby. Dos milhões estimados de espécies de fungos que habitam a terra, sabe-se no presente que apenas algumas centenas são capazes de causar alguma enfermidade na espécie humana^{7,8,10}.

As infecções fúngicas comumente se classificam em superficiais, cutâneas, subcutâneas e em sistêmicas ou primárias e oportunistas. A sua patogenia baseia-se na inter-relação entre o sistema imune do hospedeiro e da patogenicidade do agente fúngico. Hospedeiros imunocomprometidos podem desenvolver infecções sistêmicas graves por fungos que não são tidos como patogênicos em indivíduos normais. Para um fungo ser considerado um patógeno, o mesmo deve possuir aptidão para aderir e penetrar nos tecidos do hospedeiro, multiplicar-se *in vivo*, contornando os mecanismos de defesa do hospedeiro e causar lesão tecidual. No cenário mundial atual os fungos estão entre os principais agentes de infecções em indivíduos imunocomprometidos. O sucesso do transplante de órgãos, da terapia imunossupressora, da quimioterapia do câncer, o uso extensivo de antibióticos de amplo espectro, o emprego de sondas e cateteres intravenosos em ambiente hospitalar e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) respondem pelo aumento crescente de indivíduos suscetíveis às infecções fúngicas^{7,11,12}.

É válido exemplificar que o reino fungi⁹ não foi reconhecido apenas como agente patogênico. O seu valorante papel na indústria alimentícia, na produção de antibióticos (*Penicillium*) e imunossupressores (*Tolypocladium inflatum*) bem

como na decomposição de matéria orgânica e produção de biocombustíveis também foram descobertos^{13,14}.

De acordo com os dados coligidos pelas entidades internacionais não governamentais, *GAFFI (Global Action Fund For Fungal Infections)* e *LIFE (Leading International Fungal Education)*, as infecções fúngicas são elegíveis em cinco grupos de acordo com a sua gravidade, conforme mostra a Tabela 1. i) As invasivas, que muitas vezes são fatais, meningite fúngica ou criptocócica, pneumonia por *Pneumocystis*, histoplasmose, aspergilose e a candidemia; ii) Pulmonar crônica (aspergilose pulmonar crônica); iii) Alérgica (aspergilose broncopulmonar alérgica - ABPA e asma grave com sensibilização fúngica - SAFS); iv) Candidíase oral, esofágica e geniturinária e v) as de pele, cabelos e unhas. A carga global das infecções fúngicas de maior gravidade que ameaçam a vida em indivíduos imunocomprometidos e suas respectivas taxas de mortalidade geral estimada é mostrada na Figura 1, adaptada de dados obtidos de www.GAFFI.org.

Tabela 1 – Principais tipos de infecções fúngicas ordenadas de acordo com a sua gravidade

I	Infecções fúngicas invasivas	Meningite criptocócica; Aspergilose invasiva; Candidíase invasiva; Pneumonia por <i>Pneumocystis</i> Histoplasmose
II	Infecções pulmonares crônicas	Aspergilose pulmonar crônica
III	Doenças alérgicas fúngicas	Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) Asma grave com sensibilização fúngica (SAFS)
IV	Infecções de mucosas	Candidíase oral, esofágica e geniturinária
V	Infecções da pele, cabelo e unhas	Dermatomicoses <i>Tinea corporis</i> <i>Tinea capitis</i> Onicomicose

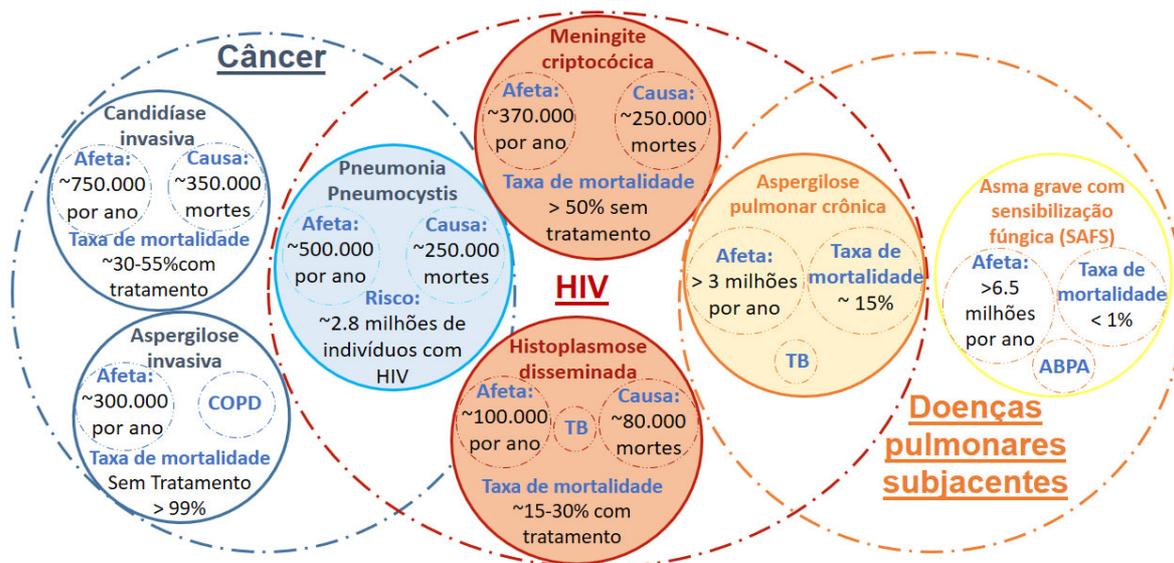


Figura 1 - Carga global das principais infecções fúngicas que ameaçam a vida em indivíduos imunocomprometidos. Visualiza-se a intersecção entre graves infecções fúngicas com tuberculose (TB), HIV, Câncer, Asma (SAFS), Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e Doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e suas respectivas taxas de mortalidade estimada. Fonte: adaptada de dados obtidos de www.GAFFI.org.

A maioria das infecções fúngicas é causada pelos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. As espécies do gênero *Candida sp.* são os agentes etiológicos fúngicos mais comuns das infecções invasivas que ameaçam a vida. Embora a espécie de *Candida albicans* ainda seja considerada o principal patógeno associado à candidemia, a incidência de infecções por espécies não-*albicans* (por exemplo, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida auris* e *Candida krusei*) tem ganhado destaque em muitas partes do mundo. Isto se deve a alta incidência de resistência fúngica aos principais quimioterápicos utilizados no tratamento das infecções por *Candida sp.* e também a falhas de diagnóstico, tratamento e prevenção destas enfermidades^{15,16,17}.

A resistência de espécies de *Candida sp.* ao fluconazol foi identificada como uma séria ameaça à saúde pública segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC). O percentual de isolados de *Candida sp.* resistentes aos antifúngicos fluconazol, equinocandinas e outros segundo o CDC do ano de 2009 a 2017 é mostrado na Figura 2A. Também é exemplificado uma perspectiva da incidência de candidemia causada por diferentes espécies do gênero *Candida sp.* na Figura 2B.

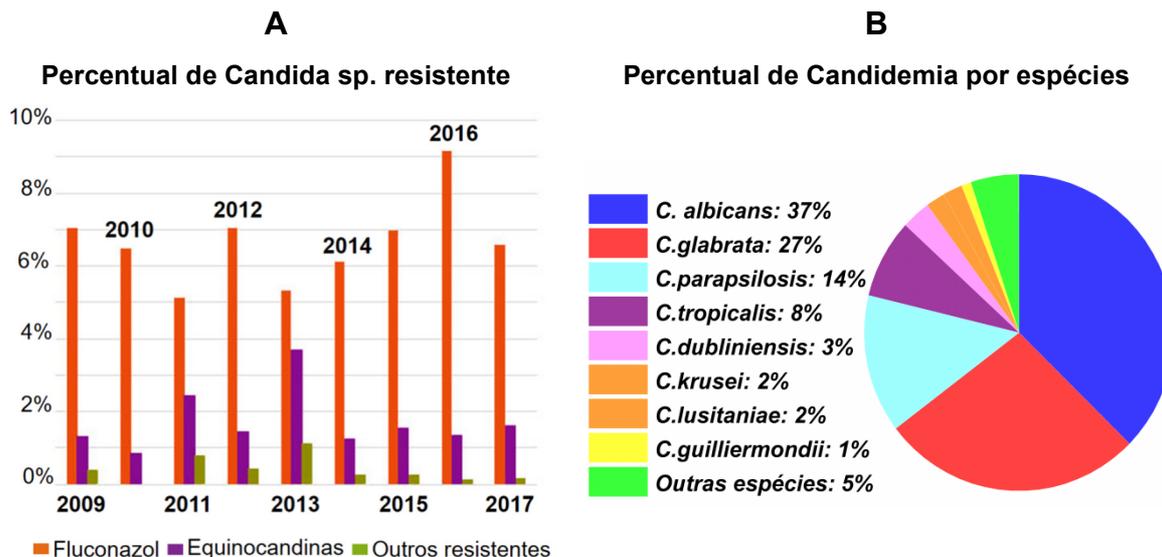


Figura 2 - Ocorrência das principais infecções pelo gênero *Candida* sp. (A) Percentual de isolados de *Candida* sp. resistentes aos antifúngicos fluconazol, equinocandinas e outros segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) de 2009 a 2017; (B) Taxas relativas de candidemia invasiva causada por diferentes espécies do gênero *Candida* sp. Fonte: Adaptada de CDC - www.cdc.gov.

A taxa de incidência de resistência dos fungos patogênicos aos quimioterápicos antifúngicos comumente utilizados no tratamento das infecções fúngicas atual é sem precedentes e têm mudado o cenário das infecções fúngicas no mundo. Uma visão qualitativa da distribuição espaço-temporal da incidência de resistência dos diferentes patógenos fúngicos (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*) aos antifúngicos da classe azólica e sua progressão do ano de 1987 ao ano de 2017 e dada na Figura 3, adaptada de Fisher et al. 2018¹⁸.

Segundo o mais recente estudo da carga global das infecções fúngicas estima-se que anualmente fungos patogênicos causem 11,5 milhões de graves infecções invasivas e micoses superficiais, e afetem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo^{15,19}. Uma taxa de mortalidade maior que 1,6 milhão por ano é estimada para as infecções fúngicas, comparável ao total de mortes registradas por tuberculose e 3 vezes maior que o número de mortes causadas pela malária.

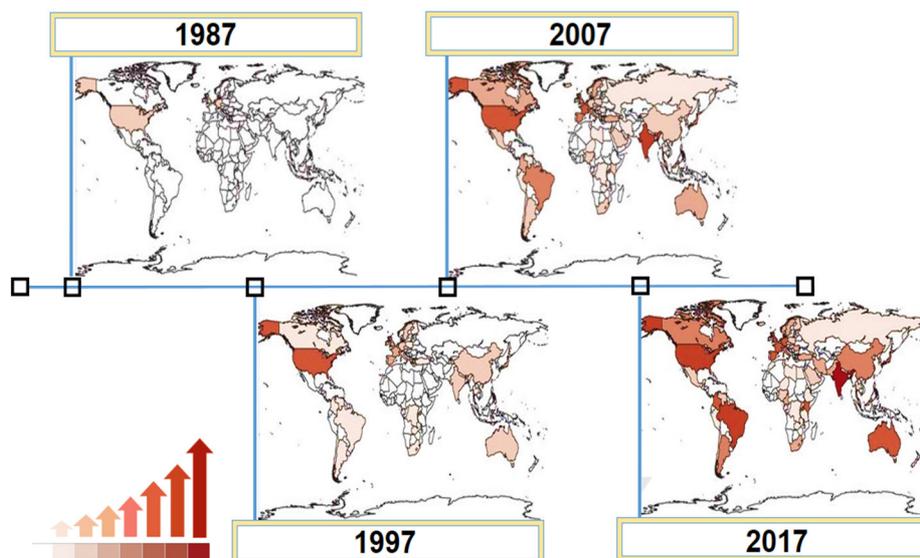


Figura 3 - Registro da distribuição espaço-temporal da incidência de resistência dos patógenos *A.fumigatus*, *C.albicans*, *C.auris*, *C.glabrata*, *C.gattii* e *C.neoformans* aos antifúngicos da classe azólica. O aumento da intensidade de cor (escala vermelha) descreve a crescente incidência de resistência destes patógenos aos azóis do ano de 1987 ao ano de 2017 em diferentes partes do mundo. Adaptado de Fisher et al. 2018¹⁸.

De acordo com o Fundo Global de Ações contra Infecções fúngicas (GAFFI) as infecções fúngicas hoje atingem mais de 300 milhões de pessoas no mundo. Nesse grupo, 25 milhões de pessoas estão sob risco de morte ou perda de visão. No ano de 2016 as infecções fúngicas micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas foram inseridas no grupo de doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde, e representam um emergente problema de saúde pública^{15,19}. No Brasil, estima-se que quase 4 milhões de pessoas devam ter infecções fúngicas a cada ano. Desse total, 2,8 milhões são infecções causadas por *Candida* sp. e 1 milhão por *Aspergillus* sp., que avançam sobretudo em indivíduos imunocomprometidos²⁰.

O cenário das infecções fúngicas atual é preocupante não só nos países subdesenvolvidos. Embora a história relate o grande período de ostracismo em relação ao conhecimento das infecções causadas por fungos nos séculos passados numeroso conhecimento foi agregado ao reino Fungi⁹. Entretanto, inúmeras lacunas ainda precisam ser preenchidas para que a batalha contra as infecções fúngicas seja vencida. As técnicas de modelagem molecular aliadas à ciência computacional de alta performance e à biologia molecular, bem como o conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos nas bases moleculares dessas enfermidades, tornou exequível o estudo em nível atômico e molecular

dos complexos sistemas biológicos que permeiam as infecções de origem fúngica.

Uma visão geral recente das estratégias de modelagem molecular usadas para o projeto de ligantes para a superfamília de enzimas do citocromo P450 pode ser encontrada em Kontoyianni and Lacy 2018²¹. Técnicas de modelagem têm sido usadas para sugerir novos análogos de pirazol baseados em um modelo de homologia de CYP51 de *Candida albicans*^{22,23}. Além disso, simulações moleculares têm sido usadas para racionalizar as afinidades de vários inibidores para ortólogos CYP51 e para compreender o papel das mutações na estabilidade das enzimas^{24,25}. Nas seções seguintes deste capítulo serão descritos tópicos importantes para a compreensão e fundamentação do estudo presente nesta tese.

1.2 - Esterol 14 α -desmetilase- CYP51 no desenvolvimento de quimioterápicos antifúngicos

O principal alvo bioquímico para o desenvolvimento de quimioterápicos antifúngicos é a enzima Esterol 14 α -desmetilase (CYP51 também conhecida como P450_{14-DM}) codificada pelo gene ERG11. CYP51 é um membro da superfamília de hemoproteínas monooxigenases, o citocromo P450 (CYP) e é evolutivamente a P450 mais conservada. distribuída em todos os domínios biológicos de vida. Os membros da superfamília de enzimas do citocromo P450 são importantes por catalisar o processo oxidativo de vários substratos orgânicos e desempenham um papel essencial durante a metabolização e conversão de esteróis nos diferentes reinos biológicos^{26,27,28,29}.

CYP51 é uma enzima do CYP essencial em uma das etapas da biossíntese de esteróis em eucariotos. Os esteróis são constituintes indispensáveis das células eucarióticas. Eles mantêm a fluidez e permeabilidade da membrana e modulam a atividade de proteínas ligadas à membrana e canais iônicos. Além disso, os esteróis são precursores de muitas moléculas biologicamente importantes, que desempenham papéis na regulação do crescimento e desenvolvimento, tais como os hormônios e a vitamina D^{26,27,29,30,31,32,33}. Embora os esteróis sejam formados a partir da acetilcoenzima A e via do mevalonato, a oxidação enzimática do esqualeno marca o ponto de

ramificação entre a biossíntese de hopanóide em procariontes que o diferencia da biossíntese de esteróis em eucariontes conforme mostrado no esquema da Figura 4 a seguir.

Basicamente a biossíntese de esteróis em eucariontes se inicia a partir de um processo anaeróbico a partir do precursor acetilcoenzima A e via do mevalonato. Na via do mevalonato os intermediários pirofosfato de isopentenila e difosfato de dimetilalilo são acoplados para gerar geranyl pirofosfato que então leva a farnesil pirofosfato, um produto da farnesil difosfato sintase. A esqualeno sintase combina então duas moléculas de farnesil pirofosfato em esqualeno.

O esqualeno é então oxidado pela esqualeno epoxidase, que insere um átomo de oxigênio do oxigênio molecular na ligação dupla terminal para produzir 2,3-óxido de esqualeno. O 2,3-óxido de esqualeno é transformado em cicloartenol e obtusifoliol, como precursores da maioria dos esteróis de plantas e algas e em lanosterol, como precursor dos esteróis de origem animal, fúngica e humana. Em organismos procariontes (com exceção de algumas bactérias) a partir do intermediário esqualeno é formado hopanóides, que são moléculas similares ao esteróis e tem a função de condicionar parte da rigidez das membranas citoplasmáticas nas células bacterianas^{26,27,31,32,34}.

Conforme exemplificado pela Figura 4, a especificidade do substrato de CYP51 se difere discretamente entre os diferentes ortólogos eucariontes de CYP51. 24,25-di-hidrolanosterol, lanosterol e eburicol são substratos do CYP51 em fungos, protozoários, animais e humanos, enquanto obtusifoliol e C4-norlanosterol são substratos em plantas/algas e alguns protozoários. Entretanto, os ortólogos eucariontes de CYP51 compartilham essencialmente a mesma função catalítica. CYP51 catalisa uma reação regio e estereosseletiva da remoção oxidativa do grupo 14- α -metila de precursores de esterol. Durante o ciclo catalítico, o esterol passa por uma sequência de três reações monooxigenases resultando na conversão do grupo 14- α -metila em um álcool, 14-hidroximetil, seguido de um aldeído, 14-carboxaldeído e finalmente, ocorre a eliminação do grupo metilo na forma de ácido fórmico com formação concomitante de uma ligação dupla C₁₄-C₁₅ no núcleo dos esteróis do produto final. A cada etapa uma molécula de oxigênio molecular, dois prótons e dois elétrons liberados pelo NADPH - Citocromo P450 redutase são consumidos no decorrer da reação, conforme mostrado na parte A, em verde, da Figura 4.

A biossíntese de esteróis a partir de acetilcoenzima A em organismos eucariontes é significativamente diversificada, resultando em componentes de membrana distintos, todavia estruturalmente relacionados. É formado colesterol em animais e humanos, ergosterol em fungos e protozoários e sitosterol em plantas, conforme mostrado na parte inferior da Figura 4. Um exemplo de inibição da enzima CYP51 e interrupção das etapas desta via, a partir do quimioterápico antifúngico, fluconazol são apresentados na parte B, em vermelho, na Figura 4.

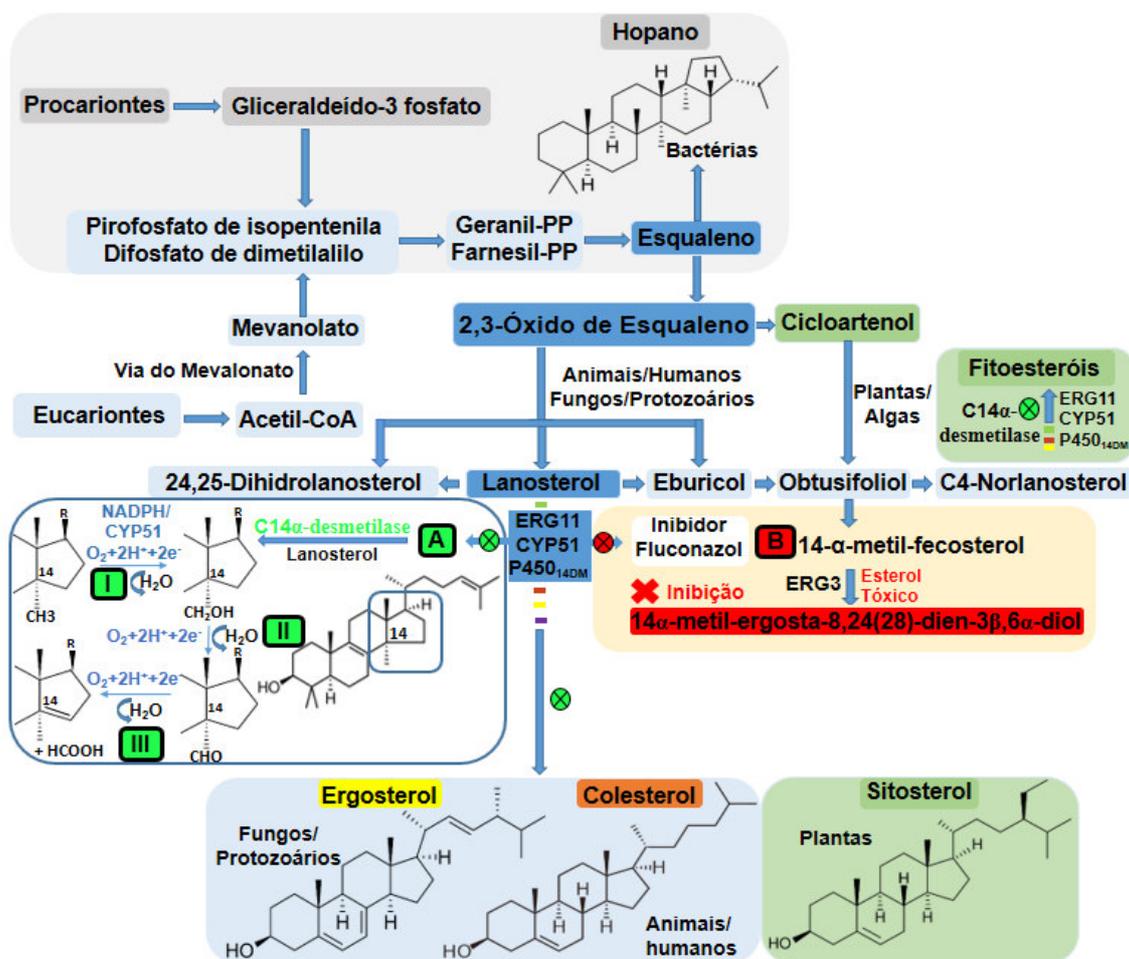


Figura 4 - Representação esquemática comparativa da biossíntese de esteróis entre diferentes classes de seres vivos. Embora, os esteróis sejam formados a partir da acetilcoenzima A e via do mevalonato, a oxidação enzimática do esqualeno marca o ponto de ramificação entre a biossíntese de hopanóide em procariontes (algumas bactérias) que o distingue da bioquímica de esteróis em eucariontes. É formado ergosterol em fungos e protozoários, colesterol no homem e em animais e sitosterol em plantas. A) A enzima CYP51 catalisa a desmetilação do carbono 14 do substrato lanosterol, a partir de uma sequência de três reações oxidativas, I, II e III; B) Fluconazol inibe a enzima CYP51 fúngica e impede a correta biossíntese de ergosterol. Em vez de formar ergosterol, que é o principal esterol constituinte das membranas celulares dos fungos são sintetizados esteróis tóxicos os quais têm efeito fungistático na célula fúngica.

As regiões de maior conservação estrutural na P450, CYP51, encontram-se no núcleo da enzima, precisamente ao redor do grupo prostético Heme (uma molécula de protoporfirina IX complexada com um átomo de Fe) e do resíduo de cisteína absolutamente conservado. Este núcleo é formado por um conjunto de quatro hélices: D, E, I e L, um segundo conjunto de duas hélices, J e K, por dois conjuntos de folhas β , e um loop em forma de espiral conhecida como *meander*^{35,36,37}. Tais elementos estruturais podem ser visualizados, a partir do exemplo da ilustração do modelo da enzima CYP51 fúngica de *Candida glabrata* (PDB id 5JLC) complexada ao composto triazólico fluconazol, na Figura 5.

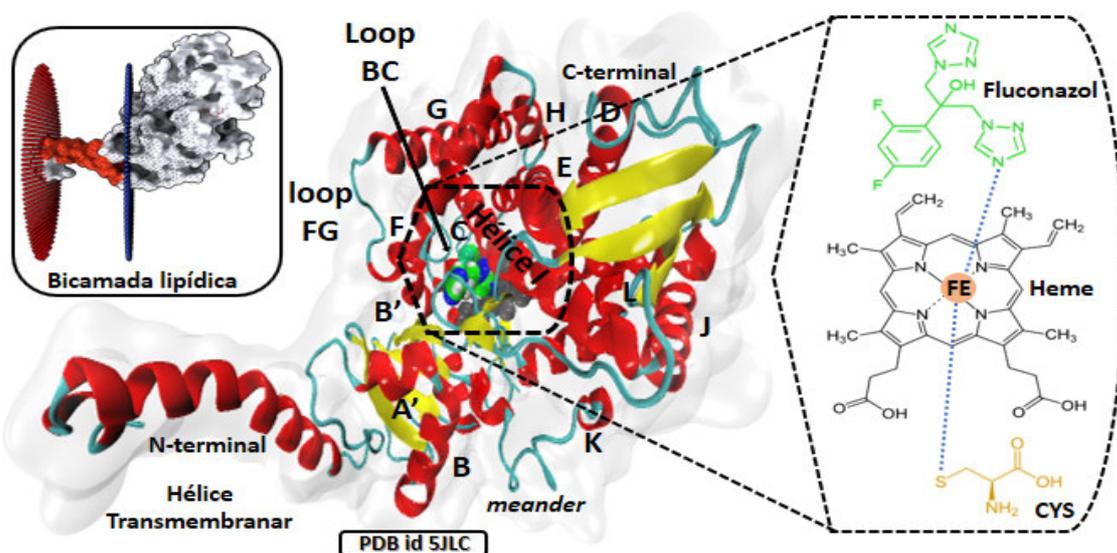


Figura 5 - A cavidade do sítio catalítico da enzima CYP51 fúngica de *Candida glabrata* disponível no Protein Data Bank (PDB id 5JLC). O presente modelo estrutural ilustra as interações da hemeoproteína com o inibidor fluconazol e com o resíduo de cisteinato altamente conservado na família de enzimas do citocromo P450. É possível visualizar também a presença de uma α -hélice do tipo transmembranar que conecta a enzima a bicamada lipídica celular de organismos eucariontes, particularmente presentes em CYPs fúngica e humana.

Estruturas de raios X de múltiplos ortólogos de CYP51s de diferentes espécies patogênicas à espécie humana (*Mycobacterium tuberculosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania infantum*, etc.) complexadas com diferentes quimioterápicos antifúngicos da classe azólica estão disponíveis no *Protein Data Bank* - PDB. A estrutura cristalina de *Mycobacterium tuberculosis* CYP51 (CYP51-Mt) é a única proteína citoplasmática solúvel que compartilha essencialmente a mesma função catalítica dos ortólogos de CYP51 ligados à

membrana, particularmente presente em mamíferos, protozoários e fungos³⁸. P450s eucarióticos contêm domínios transmembranares, uma hélice que liga a enzima à bicamada lipídica da membrana do retículo endoplasmático, conforme ilustrado pela Figura 5.

A estrutura de CYP51-Mt complexada a inibidores da classe azólica é conhecida desde 2001²⁷ e foi amplamente utilizada como modelo de homologia para análise de seus ortólogos eucarióticos pela comunidade científica. Embora a função *in vivo* do CYP51 em micobactéria seja ainda desconhecida, CYP51 é essencial em eucariotos superiores. Acredita-se que CYP51-Mt possa estar envolvida na catálise de conversões de moléculas de esteróis do hospedeiro. A análise de inativação do gene de codificação da enzima de CYP51-Mt não indicou intercorrência no seu crescimento segundo testes experimentais^{39,40,41}.

A estrutura do ortólogo de CYP51 humano (CYP51-Hs) complexado ao cetoconazol foi determinada em 2010 (PDB id 3LD6) e foi obtida por deleção da hélice transmembranar com intuito de melhorar a sua expressão e cristalização⁴². Recentemente estruturas cristalográficas fúngicas de *Candida albicans* (CYP51-Ca) em complexo com o posaconazol (PDB id. 5FSA) e com o mais recente candidato a fármaco à base de tetrazole, VT-1161 (oteseconazol) (PDB id.5TZ1)⁴³ foram depositadas no *Protein Data bank*. A estrutura fúngica de *Candida glabrata* (CYP51-Cg); (PDB id. 5JLC)⁴⁴ complexada com o itraconazol e caracterização do domínio transmembranar na região N-terminal, conforme mostrado anteriormente na Figura 5, também foram determinadas experimentalmente. As presentes estruturas citadas são fundamentais para o entendimento e projeto de novos inibidores seletivos para as espécies fúngicas e micobacteriana no âmbito da aplicação de técnicas de modelagem molecular.

Os quimioterápicos antifúngicos de maneira geral são relativamente mais difíceis de desenvolver em comparação com os antibacterianos, devido a suas células serem eucarióticas. Em particular, os compostos da classe triazólica como o fluconazol, considerado pela Organização Mundial de Saúde um medicamento essencial, têm se mostrado insuficiente para tratar muitas infecções fúngicas. Por conseguinte, uma nova classe de quimioterápicos antifúngicos deve ser desenvolvida, o que pode ser feito a partir da compreensão da base molecular da afinidade e especificidade do fluconazol. As presentes estruturas citadas acima permitiram neste estudo avaliar a seletividade dos

ortólogos de CYP51 de espécies patogênicas de *Mycobacterium tuberculosis* - *Mt*, *Candida albicans* - *Ca* e *Candida glabrata* - *Cg* ao quimioterápico fluconazol em relação ao respectivo ortólogo humano. Também permitiu o estudo de diferentes variantes mutantes do ortólogo de *Candida albicans* envolvidos nos processos de resistência antifúngica ao quimioterápico fluconazol.

1.3 - Quimioterápicos antifúngicos

O número de quimioterápicos antifúngicos é considerado limitado, visto que as células humanas são muito semelhantes às células fúngicas (são eucarióticas, com núcleo e organelas muito comuns). Atualmente contamos com exatamente cinco classes de quimioterápicos com ação antifúngica, os poliênicos, 5-fluorocitosina, griseofulvina, equinocandinas e azóis. No Brasil apenas três destas classes são utilizadas, os poliênicos, equinocandinas e azóis. Entretanto, o espectro de ação reduzido, a elevada toxicidade de algumas destas classes e a própria resistência conseguem limitar ainda mais este arsenal.

Os poliênicos representados pela anfotericina B e a nistatina ligam-se ao ergosterol e alteram as funções da membrana citoplasmática fúngica. Quando presente em concentrações suficientes, formam poros na membrana que permitem a perda de conteúdo celular, levando à morte do fungo^{45,46}. A 5-fluorocitosina inibe a síntese de ácidos nucleicos e interrompe a síntese proteica. Trata-se de uma base nitrogenada alterada artificialmente que, quando incorporada ao DNA, muda sua estrutura e interrompe sua replicação. A 5-fluorocitosina não é utilizada no Brasil apesar de ter efeito fungicida. Um alto índice de resistência está relacionado a este quimioterápico, existem espécies de *Candida* sp. naturalmente resistentes⁴⁷.

A Griseofulvina inibe a mitose de células fúngicas produzindo ruptura da estrutura do fuso acromático mitótico impedindo desta forma, a metáfase da divisão celular. Por possuir um espectro de ação restrito, é utilizada apenas contra fungos dermatófitos cujos tratamentos atualmente envolvem drogas muito mais eficazes, e por possuir efeitos colaterais hepáticos severos, sua prescrição e uso está em processo de desuso. As equinocandinas representadas por caspofungina, micafungina e anidulafungina inibem a síntese da parede celular fúngica porque impedem a ação do complexo enzimático β -1,3-D-glicano

sintase. São drogas relativamente recentes e com potencial promissor uma vez que as células humanas não possuem parede celular^{45,47}.

Os azóis (também conhecidos por azólicos) inibem a síntese do ergosterol, componente membranar da célula fúngica, ao desativar a enzima chave do processo, a Esterol 14 α -desmetilase- CYP51. A redução de ergosterol e o acúmulo de seus diferentes precursores na membrana celular, tais como o lanosterol e esteróis tóxicos do tipo metilados levam ao stress da membrana (por exemplo, alteram sua permeabilidade, enzimas que nela se alojam, sua conformação celular dentre outros). Acredita-se que o azólico interrompa a reprodução das células fúngicas e que o sistema imune as elimine. Isso pode não ocorrer em indivíduos imunocomprometidos e desencadear resistência aos derivados azólicos. Nestes indivíduos, os azólicos persistem até que as células fúngicas voltem a se multiplicar mais resistentes, tornando-se menos susceptíveis ao tratamento^{45,48,49}. Alguns exemplos dos principais representantes desta classe são: cetoconazol e itraconazol (imidazólicos), fluconazol (triazólico de primeira geração), voriconazol e posaconazol (triazólicos de segunda geração).

Nesta tese será dada maior ênfase a descrição da classe de quimioterápicos azólicos, especialmente o triazólico fluconazol.

1.3.1 - Quimioterápicos azólicos

Os quimioterápicos azólicos são antifúngicos de origem sintética caracterizados por um anel pentagonal heterocíclico contendo na sua estrutura molecular átomos de carbono e nitrogênio. São subdivididos em imidazólicos, triazólicos e recentemente novos candidatos à base de tetrazol foram projetados e desenvolvidos. Tais quimioterápicos antifúngicos têm como alvo terapêutico a membrana celular dos fungos através da inibição da enzima CYP51 pertencente à família do citocromo P450 relatada em seção superior deste capítulo.

O primeiro subgrupo, imidazólico foi descoberto no fim de 1979 sendo representado aqui pelo cetoconazol. No início dos anos 90 surgiram a primeira geração dos compostos triazólicos: o fluconazol e o itraconazol. Já a segunda geração, o voriconazol, o posaconazol, o ravuconazol, o albaconazol surgiram na última década. E por último os de terceira geração, no qual o isavuconazol foi

o último antifúngico sistêmico aprovada pela FDA - *Food and Drug Administration*, órgão federal dos Estados Unidos de controle de alimentos e medicamentos no ano de 2015⁵⁰. Atualmente os mais recentes candidatos à base de tetrazol (VT-1129 - quilseconazol, VT-1598 e VT-1161 – oteseconazol) ainda se encontram na etapa de testes para avaliar sua eficácia, segurança e toxicidade^{51,52}. Uma visão geral da evolução cronológica dos quimioterápicos da classe azólica é mostrada na Figura 6.

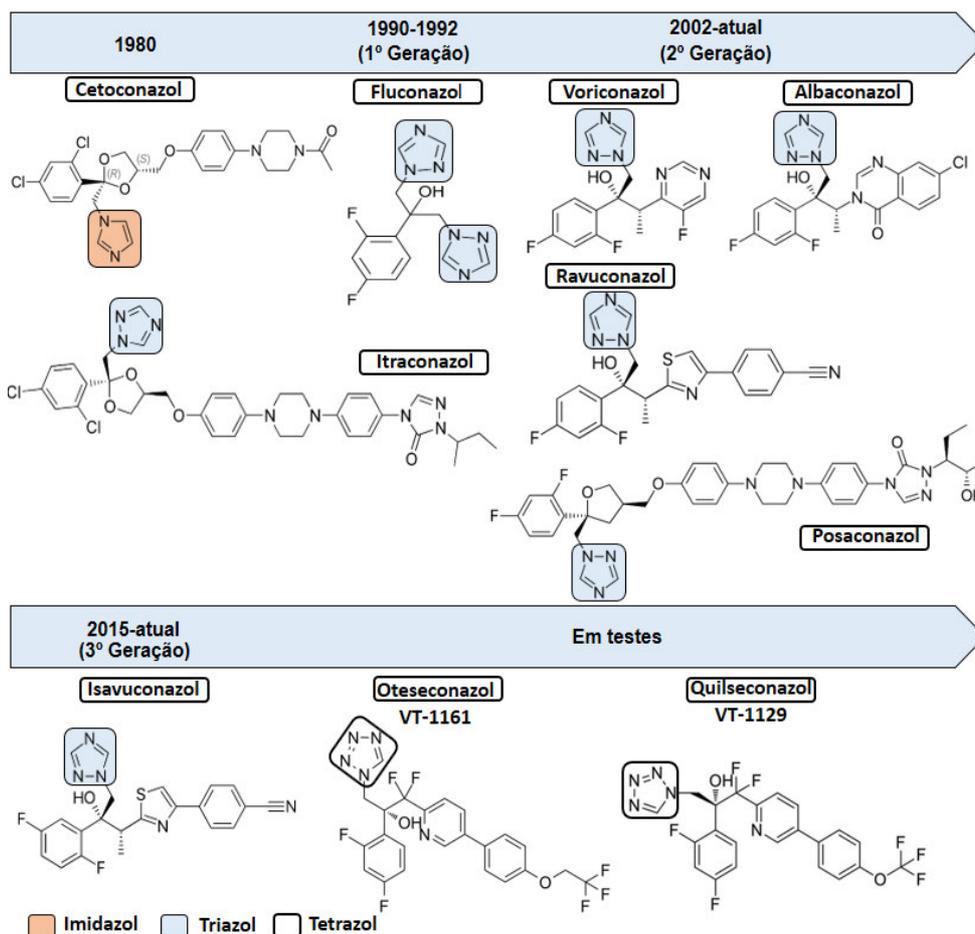


Figura 6 - Evolução cronológica dos principais quimioterápicos antifúngicos da classe azólica e suas respectivas estruturas moleculares.

1.3.2- O quimioterápico triazólico: Fluconazol

O fluconazol (TPF) é um agente antifúngico sintético bis-triazólico substituído com flúor amplamente utilizado em quimioterapia antifúngica. É considerado um medicamento essencial pela Organização Mundial de Saúde (OMS)⁵³. Também é utilizado no Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde do Brasil como terapia profilática, sendo o quimioterápico de primeira

linha de escolha para o tratamento de infecções causadas pelo gênero *Candida* sp⁵⁴. Compostos triazólicos tais como o fluconazol ocupam o espaço do sítio ativo projetado para o substrato fúngico (lanosterol) e inibem a atividade enzimática de CYP51 bloqueando a rota biossintética do ergosterol^{36,55}. O ergosterol é um dos principais componentes esteroidais das membranas celulares fúngicas. A inibição da síntese do ergosterol retarda o desenvolvimento das células fúngicas pela acumulação de seu substrato lanosterol e também pela produção de metabólitos tóxicos como o esterol metilado 14-metil-ergosta-8,24(28)-dien-36-diol^{56,57,58}, conforme mostrado na Figura 4B, em vermelho. A formação de uma membrana com integridade, fluidez e permeabilidade alterada inviabiliza a execução de funções vitais do patógeno fúngico. Enquanto a produção de intermediários tóxicos no ambiente celular culmina com o retardamento de seu crescimento⁵⁹.

O Fluconazol atua como um inibidor competitivo para CYP51 e tem efeito fungistático. Atualmente o fluconazol é eficiente para tratar infecções invasivas causadas por fungos patogênicos, incluindo espécies de *Candida albicans* e *glabrata*^{58,60}. Entretanto, *Candida glabrata* costuma ser menos sensível ao fluconazol do que as outras espécies e *Candida krusei* é inerentemente resistente ao fluconazol. O Fluconazol também possui ação contra dermatófitos e sobre a espécie *Cryptococcus neoformans*, sendo eficaz no tratamento de meningite criptocócica, devido a sua excelente penetração no liquor cefalorraquiano⁵⁴. Uma importante atividade antimicobacteriana também é relatada pelo fluconazol^{61,62}. Entretanto, a resistência ao fluconazol é frequente, e este é um grande problema, uma vez que, o fluconazol é o agente antifúngico mais comumente utilizado para profilaxia e tratamento de infecções por *Candida* sp. em diversas partes do mundo^{15,16,63}.

O Fluconazol tem sido amplamente utilizado como agente antifúngico de primeira linha no tratamento e profilaxia de candidíase invasiva, devido à sua conhecida eficácia terapêutica, custo relativamente baixo, baixa incidência de efeitos colaterais e perfil de segurança^{55,64}. Quando comparado às novas gerações de compostos triazólicos (itraconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol e mais recentemente os candidatos a fármaco à base de tetrazol, (VT-1129 - quilseconazol, VT-1598 e VT-1161 – oteseconazol) o fluconazol possui propriedades farmacocinéticas superiores, incluindo uma meia-vida mais

longa, melhor biodisponibilidade^{60,64}. Também apresenta menos interações concorrentes com o P450 humano, à exceção do recente derivado à base de tetrazol, VT-1161, podendo ser administrado terapêuticamente tanto via sistêmica quanto via tópica⁶⁵.

O fluconazol é uma droga bem tolerada, entretanto alguns efeitos colaterais indesejáveis podem ocorrer durante o tratamento tais como dor de cabeça, náuseas, diarreia e dor abdominal. Erupções cutâneas também podem ocorrer e são comuns em pacientes portadores de HIV. Raramente o fluconazol pode causar toxicidade do fígado, provocando elevação das enzimas hepáticas. Em pacientes com insuficiência renal, a dose deve ser ajustada de acordo com a taxa de filtração glomerular para evitar intoxicação pela droga. Doses excessivas, muito acima das habitualmente recomendadas, podem provocar distúrbios psiquiátricos, como alucinações e paranoia. Além disso é contraindicado na gravidez, pois está associado a diversas más-formações. O seu uso durante o aleitamento materno também deve ser evitado, uma vez que a droga é excretada pelo leite⁶⁶.

Segundo dados obtidos de estudos experimentais, o fluconazol liga-se a CYP51 humano com baixa afinidade ($k_d = 30,5\mu\text{M}$)⁶⁷ e também é conhecido por exibir alguma atividade antimicobacteriana ($k_d = 10\mu\text{M}$)^{39,68}. Sua afinidade aos alvos de CYP51 fúngicos é muito maior, exibindo constantes de dissociação na escala nano-molar em cepas de *Candida albicans* e *glabrata* ($k_d = 56\text{Nm}$)⁶⁷.

1.4 - Resistência fúngica ao quimioterápico fluconazol

A administração repetitiva ou exposição prolongada ao quimioterápico fluconazol, para tratamento e profilaxia das infecções por *Candida sp.* têm aumentado a incidência de resistência *in vitro* a este quimioterápico. Existem diferentes mecanismos de resistência ao fluconazol em espécies de *Candida sp.*, podendo ou não serem identificados simultaneamente. O efluxo do antifúngico do interior celular é o principal mecanismo, e tal ação é mediada por mutações e/ou expressão aumentada de genes MDR1 (*multidrug resistance*), CDR1 e CDR2 (*Candida Drug Resistance*). Estes genes estão presentes fisiologicamente nas células fúngicas e atuam como bombas de efluxo mobilizando uma variedade de metabólitos hidrofóbicos do meio intra para o meio extracelular.

Na célula fúngica resistente, os genes codificadores do MDR1 e do CDR podem ser transcritos sem controle e sintetizar inúmeras proteínas transportadoras de membrana. O gene MDR1 codifica uma proteína transportadora do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*), uma permease, que utiliza o gradiente de prótons para o transporte de compostos. Os genes CDR1 e CDR2 localizados no cromossomo 3 de *Candida* codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (*ATP-binding cassette*). Proteínas do tipo ABC utilizam a hidrólise do ATP para promover o transporte de compostos no meio celular de forma pouco seletiva^{45,69}. Desta forma, todo azólico que penetra no interior da célula fúngica é imediatamente bombeado para o meio extracelular reduzindo o seu conteúdo no meio intracelular^{56,70}.

A superexpressão do gene *Erg11* que codifica a enzima Esterol 14 α -desmetilase - CYP51 é o segundo mecanismo de resistência aos azólicos. A célula fúngica resistente apresenta uma expressão aumentada de *ERG11*, de modo que ocorre uma desproporção entre a elevada quantidade de enzimas CYP51 sintetizada e o reduzido percentual azólico no ambiente intracelular. O reduzido percentual azólico não consegue neutralizar efetivamente as enzimas CYP51 e conseqüentemente, a biossíntese de ergosterol ainda é mantida ativa^{71,72-74}.

A Mutação pontual no gene *ERG11* é o terceiro mecanismo de resistência a azólicos e foi objeto de estudo nesta tese. Mutações pontuais podem provocar alterações nas regiões próximas do centro ativo da enzima, região onde os azólicos atuam. A codificação de um novo aminoácido possivelmente altera a conformação da enzima CYP51 e o quimioterápico azólico não consegue atuar como um inibidor efetivamente. Pode ocorrer a diminuição da afinidade do azólico ao centro ativo da enzima. Entretanto, a enzima permanece relativamente ativa, agindo na via de biossíntese do ergosterol. Mutações no gene *ERG3* também são associadas à resistência em azóis através da alteração em suas vias metabólicas. Ocorre a síntese de 14 α -metil-fecosterol e bloqueio da síntese de esteróis tóxicos como o 14-metil-ergosta-8,24(28)-dien-36-diol^{75,45}. O 14 α -metil-fecosterol substitui o ergosterol e é capaz de suportar a função da membrana celular do patógeno fúngico^{56,71,72-74}. Os diferentes mecanismos de resistência aos quimioterápicos azólicos mencionadas nesta subseção se encontram exemplificados na Figura 7.

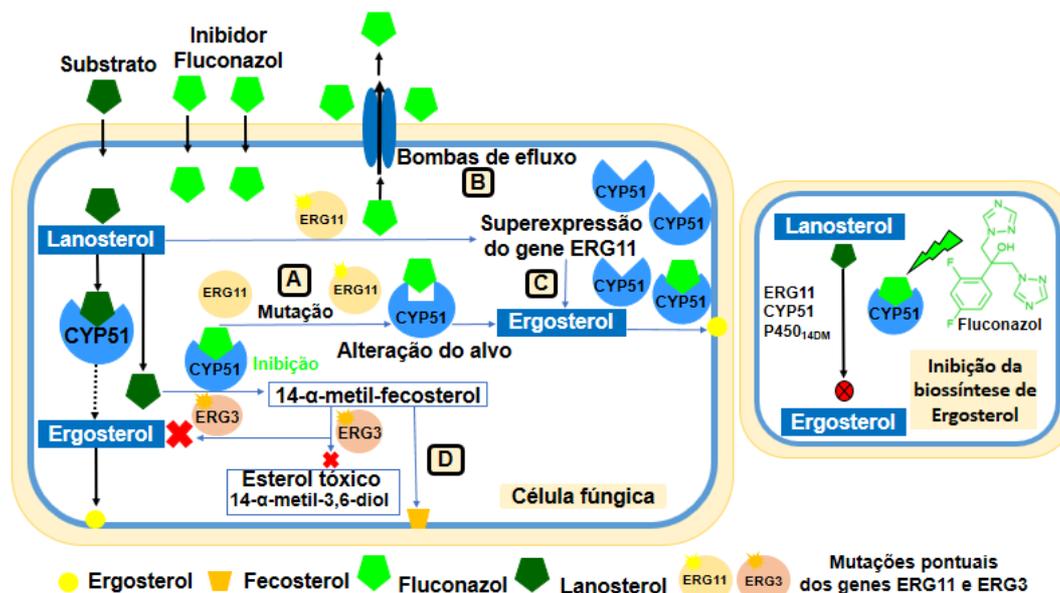


Figura 7 - Mecanismo de resistência ao fluconazol em *Candida albicans*. (A) Alteração da enzima alvo (mutações pontuais no gene ERG11); (B) Regulação positiva de genes *Candida* Drug Resistance CDR1, CDR2 (Transportadores de membrana) e efluxo do antifúngico do interior celular; (C) superexpressão de CYP51 e (D) Mutação do gene ERG3 que bloqueia a síntese do esteroide tóxico 14-metil-ergosta-8,24(28)-dien-36-diol, resultando na acumulação de 14 α -metil-fecosterol que é capaz de suportar a função da membrana da célula fúngica. Adaptado de Parker et al. 2014⁷¹.

Diante do grande desafio que tem sido desvendar as infecções fúngicas multirresistentes tornou-se imperativo não só o desenvolvimento de quimioterápicos antifúngicos eficazes e seletivos as diferentes espécies patogênicas fúngicas, como também, entender os mecanismos moleculares inerentes a resistência a estes quimioterápicos. Parte desta tese colabora com uma nova perspectiva científica acerca da influência de certas mutações na enzima CYP51 de *Candida albicans* sobre o mecanismo molecular de resistência ao fluconazol. Para tanto, simulações de dinâmica molecular e docking molecular foram empregados a estes complexos sistemas. Dados concretos obtidos de estudos experimentais demonstraram que certas mutações na enzima alvo CYP51 de *Candida albicans* alteram a capacidade do fluconazol em inibir a atividade desta enzima resultando em um aumento de resistência^{73,76}.

OBJETIVOS

O estudo contido nesta tese busca a compreensão da base molecular da afinidade e especificidade do fluconazol em ortólogos de CYP51 presentes nas espécies de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Homo sapiens* para os quais dados estruturais estão presentes. Buscou-se também compreender a influência de mutações no mecanismo de resistência ao fluconazol em CYP51 de *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender a base molecular da inibição da biossíntese de esteróis em ortólogos da enzima Esterol 14 α -desmetilase-CYP51
- Compreender a base molecular da resistência ao inibidor fluconazol em mutantes de Esterol 14 α -desmetilase-CYP51 de *Candida albicans*.

2- METODOLOGIA

2.1 - Escolha do alvo e do inibidor e sua preparação

O estudo nesta tese avaliou a atividade inibitória do fluconazol sobre os ortólogos da enzima alvo Esterol 14- α -desmetilase (CYP51). Análises estruturais comparativas das enzimas CYP51 P450 de *Homo sapiens* (CYP51-Hs), *Candida albicans* (CYP51-Ca), *Candida glabrata* (CYP51-Cg) e *Mycobacterium tuberculosis* (CYP51-Mt) complexadas com o quimioterápico fluconazol foram feitas por simulações de dinâmica molecular (MD). Foram utilizadas recentes estruturas cristalográficas de CYP51 fúngicos de *Candida albicans* (PDB id 5TZ1; resolução: 2.0Å) em complexo com o tetrazol, VT-1161 (oteseconazol)⁴³ e de *Candida glabrata* (PB id 5JLC; resolução: 2.4Å) em complexo com itraconazol⁴⁴. O ortólogo humano foi obtido em complexo com o cetaconazol (PDB id 3LD6; resolução:2.8Å)⁷⁷. A estrutura de *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com o fluconazol (PDB id. 1EA1; resolução:2.21Å)²⁷ foi utilizada como estrutura de referência, porque é co-cristalizada com o inibidor de interesse. As coordenadas atômicas do ligante fluconazol presentes na estrutura de CYP51-Mt foram inicialmente transportadas para *H.sapiens* (PDB id. 3LD6), *C. albicans* (PDB id. 5TZ1) e *C. glabrata* (PDB id. 5JLC) para gerar os modelos moleculares iniciais e seus respectivos complexos. Na Tabela 2 são descritas as estruturas cristalográficas obtidas do *Protein Data Bank* e utilizadas neste estudo.

Os CYP51s fúngicos contêm domínios transmembranares helicoidais N-terminais que não estão presentes em CYP51-Mt. Em nossas simulações desconsideramos a presença da hélice transmembrana determinada na estrutura de CYP51-Cg (PDB id 5JLC). A ausência de consideração do domínio transmembranar não prejudica a análise dos resultados no presente estudo, uma vez que o foco principal são as interações na região do sítio de ligação com o inibidor fluconazol, relativamente distantes do domínio transmembranar.

Para o estudo com mutantes envolvidos no mecanismo de resistência antifúngica ao quimioterápico fluconazol, mutações pontuais nos resíduos

Y132F, Y132H, K143R e S405F foram realizadas na estrutura alvo de CYP51 de *Candida albicans* (PDB id 5TZ1) utilizando o *plugin mutator* implementado no *Visual Molecular Dynamics - VMD*.

Tabela 2 - Descrição das estruturas cristalográficas obtidas do Protein Data Bank - PDB e utilizadas neste estudo.

Descrição das estruturas de CYP51	Código PDB	Resolução (Å)	Referência
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complexada ao fluconazol	1EA1	2.21 Å	27
<i>Homo sapiens</i> complexada ao cetoconazol	3LD6	2.8 Å	77
<i>Candida Glabrata</i> complexada ao Itraconazol	5JLC	2.4 Å	44
<i>Candida Albicans</i> complexada ao tetrazol VT-1161 – oteseconazol (VT1)	5TZ1	2.0 Å	43

2.2 - Metodologia Teórica

2.2.1 - Simulações de dinâmica molecular

O foco principal de uma simulação de dinâmica molecular (MD) é o estudo do comportamento de um sistema de partículas ao longo do tempo. Simulações de MD consistem em determinar explicitamente as trajetórias dos átomos que compõem o sistema físico através da solução numérica das equações do movimento da mecânica clássica newtoniana. Assim, a técnica de MD é capaz de transmitir informações acerca do comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema. A partir do conjunto de trajetórias determinadas por esta técnica faz-se o uso dos princípios da mecânica estatística para calcular os valores médios das propriedades mecânicas macroscópicas do sistema, tais como, energia, pressão, temperatura, entropia, energia interna, energia livre, dentre outros^{78-80,81}.

No contexto dos sistemas proteicos, o comportamento dinâmico das proteínas em diferentes intervalos de tempo é utilizado para obter interpretações detalhadas e predições do comportamento estrutural e dinâmico relacionado às funções biológicas e até mesmo ao envelhecimento⁸².

Para realizar uma simulação de MD é imprescindível, além das posições e velocidades iniciais, o conhecimento da força exercida em cada partícula, a qual é derivada do potencial intermolecular $V(r^N)$, e um algoritmo para a integração numérica das equações do movimento. Uma aproximação comum para o tratamento das interações intermoleculares envolve a introdução de um modelo ou “campo de força” efetivo, que permite que cálculos em grande escala sejam executados em proteínas, membranas ou outros grandes sistemas biológicos, com o tratamento explícito das moléculas do solvente (água, compostos orgânicos, etc). Diversos potenciais efetivos clássicos para o tratamento das interações intermoleculares foram desenvolvidos e aplicados com sucesso nesta área^{78–80,81}. Dentre eles, destacam-se os campos de força CHARMM⁸³ e AMBER⁸⁴. No presente estudo utilizamos os campos de força CHARMM36⁸⁵ para descrição molecular dos sistemas de interesse deste estudo.

2.2.1.1 - Campo de força

Segundo a descrição do campo de força CHARMM36⁸⁵ as forças atômicas que governam o movimento molecular são descritas em termos de funções de energia potencial com características estruturais tais como: estiramento de comprimento de ligação, torção de ângulos de ligação, torção de diedros (próprios e impróprios) e interações não ligantes do tipo *Lennard-Jones* e eletrostática Coulombiana. Termos especiais como, as restrições de posição e vínculos em comprimentos e ângulos de ligação de *Urey-Bradley* e correções numéricas do mapa de energia clássico 2D ($\phi - \psi$) aplicados a quaisquer dois diedros - CMAP também são utilizadas. A representação da energia potencial total de uma molécula utilizando o campo de força CHARMM^{83,86} pode ser representada de forma genérica pela expressão, $V_{TOTAL} = V_{INTRA} + V_{INTER}$ ou pela equação 1.

$$\begin{aligned}
V_{TOTAL} = & \sum_{\text{ligações}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ângulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \sum_{\substack{\text{diédros} \\ \text{próprios}}} k_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta)) + \sum_{\substack{\text{diédros} \\ \text{impróprios}}} k_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \\
& + \sum_{\text{Urey-Bradley}} k_{ub} (b^{1,3} - b_0^{1,3})^2 + \sum_{\text{cmap}} u_{cmap}(\phi, \psi) \\
& + \sum_{\text{não ligantes}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}} + \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^{\min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1)
\end{aligned}$$

Onde, $r_{ij}^{\min} = \frac{(r_i^{\min} + r_j^{\min})}{2}$, $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$. e b_0, θ_0, φ_0 e $b_0^{1,3}$ são comprimento de ligação, ângulo de ligação, ângulo diedral, impróprios, e termo de Urey-Bradley em equilíbrio respectivamente, n e δ são a multiplicidade e o ângulo de fase dos ângulos diedrais próprios. $k_b, k_\theta, k_\phi, k_{ub}$ e k_φ corresponde as suas respectivas constantes de força. A interação entre termos ligados é expressa por um potencial de tipo harmônico, com uma soma feita sobre todas as ligações covalentes. Tipos de potenciais deste tipo são representados na Figura 8.

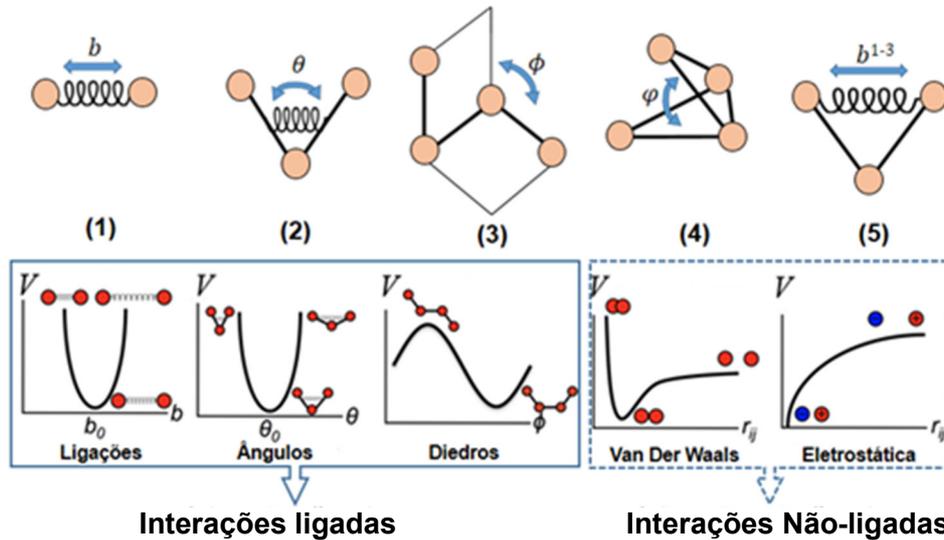


Figura 8 - Termos que representam as interações ligadas e não ligadas da Energia Potencial do campo de força CHARMM: 1) Energia de Ligação, 2) Energia do Ângulo de ligação, 3) Energia do diedro próprio, 4) Energia do diedro impróprio e 5) Energia Urey-Bradley. Os tipos de potenciais das interações do tipo ligadas e não ligadas também estão representados.

O termo 1 corresponde a energia de ligação em função da vibração entre dois átomos ligados. O termo 2 corresponde a energia de distorção do ângulo

em função do movimento entre três átomos ligados. O termo 3 corresponde a energia do diedro ou energia torsional em função do ângulo dos planos formados entre quatro átomos ligados sequencialmente. Esta energia favorece conformações que correspondem ao mínimo de energia local. O Termo 4 corresponde a energia do diedro-impróprio em função do ângulo dos planos formados por quatro átomos ligados não sequencialmente. Esta energia mantém a quiralidade e planaridade de certas moléculas. O termo 5 corresponde a energia Urey-Bradley em função da distância entre dois átomos separados por um átomo comum (interações 1-3). As interações entre átomos não ligados compreende as interações de repulsões e atrações de Van der Waals e do tipo Coulombianas. O potencial eletrostático é dado pela lei de Coulomb, onde, q_i , q_j e r_{ij} corresponde as cargas parciais atômicas e a distância entre os átomos i e j respectivamente. $\epsilon_0 = 8,853 \cdot 10^{-12}$ é a permissividade do vácuo, ϵ é a constante dielétrica, usada para considerar a polarização do meio. O potencial de *Lennard-Jones* é representado por um termo de atração, elevado à sexta, e um termo de repulsão, elevado a 12, este último tem predominância a distâncias curtas.

Detalhes sobre como as equações que descrevem essas interações são parametrizadas segundo o campo de força CHARMM General Force Field - CGenFF, campo de força utilizado para a descrição do ligante fluconazol, serão abordados adiante, na seção 2.2.1.

2.2.1.2 - Integração das Equações de Movimento

Para estudar a evolução temporal de um sistema molecular usando MD, além da geração da configuração inicial das moléculas, posições (r) e velocidades iniciais (p), faz-se necessária a integração das equações de Newton, que especifica como as posições e velocidades atômicas variam com o tempo. Em um sistema isolado a Hamiltoniana que define o sistema é uma constante de movimento representada na equação 2, dada pela soma das energias potencial e cinética dos sistemas. Onde N é o número de partículas do sistema.

$$H_N(r^N, p^N) = \frac{1}{2m} \sum_{i=1}^N |p_i|^2 + V_N(r^N) \quad (2)$$

De forma geral na MD calcula-se a força \vec{F}_i que atua sobre cada partícula i a partir do gradiente da função energia potencial $V(r_i)$. A aceleração de cada partícula a_i é obtida pela segunda lei de Newton, dividindo a força \vec{F}_i pela massa (m_i).

$$\vec{F}_i(t) = -\vec{\nabla}_i V_N(r^N) \quad e \quad \vec{a}_i = \frac{d^2 r_i}{dt^2} = \ddot{r}_i(t) = \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \quad (3)$$

O algoritmo de um programa de MD consiste da solução numérica destas equações de movimento fornecendo uma trajetória (coordenadas e momentos conjugados em função do tempo) do sistema sob estudo. Existe uma série de algoritmos que integram as equações de movimento utilizando diferenças finitas, sendo comumente usados os algoritmos de *Verlet*⁸⁷ e o *Verlet-Velocidade*⁸⁸. Neste estudo utilizamos o algoritmo *Verlet-Velocidade*. Embora ambos os algoritmos *Verlet* e *Velocity Verlet* gerem a mesma trajetória, o *Velocity Verlet* determina a velocidade nos mesmos instantes que determina a posição. O algoritmo *Verlet-Velocidade* calcula a posição e velocidade das partículas no tempo a partir das equações 4 e 5

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \vartheta(t) + \frac{1}{2} \Delta t^2 \frac{f(t)}{m} \quad (4)$$

$$\vartheta(t + \Delta t) = \vartheta(t) + \frac{f(t) + f(t + \Delta t)}{2m} \Delta t \quad (5)$$

Determinadas as posições e velocidade iniciais, calculamos, $\vartheta(t)$ e $r(t)$ aplicando as equações 4 e 5 n vezes, considerando que o tempo total de simulação desejado é $t = n \cdot \Delta t$. As posições e velocidades após um ciclo de tempo completo são dadas pelas equações 6 e 7.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \Delta t \vartheta \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \quad (6)$$

$$\vartheta(t + \Delta t) = \vartheta \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{f(t + \Delta t)}{2m} \Delta t \quad (7)$$

O cálculo da energia leva tempo em simulações de MD. Para obter os ensembles corretos, a conservação da energia também é relevante. Logo, os critérios básicos que um bom integrador para dinâmica molecular precisa satisfazer são: rapidez, exigindo idealmente apenas um cálculo de energia por

passo de tempo, economia de memória, capacidade de usar um passo de tempo relativamente longo e capacidade de obedecer, com boa aproximação, o princípio de conservação da energia. Evidentemente, o custo computacional no cálculo das forças envolvidas, e o número de ciclos determinado por Δt e o tempo total de relaxação do sistema, limitam a aplicação de MD em problemas envolvendo cadeias proteicas muito extensas. O tempo total de simulação depende dos processos dinâmicos que se deseja investigar e da convergência estatística das propriedades de interesse^{80,81}.

É extensa a diversidade de sistemas tratáveis por MD. Por exemplo, termodinâmica de ligantes, estabilidade de proteínas, enovelamento de macromoléculas pequenas, efeitos da mutação, mudanças conformacionais, reconhecimento molecular (proteínas, DNA, membranas, complexos) e transporte de íons em sistemas biológicos, etc. Adicionalmente, a MD é usada como instrumento complementar em procedimentos experimentais de refinamento estrutural, como em cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (NMR), e nos projetos de desenvolvimento de drogas para fins farmacêuticos.

2.3 - Protocolo das simulações de dinâmica molecular

As simulações de Dinâmica Molecular (MD) foram realizadas utilizando o programa NAMD⁸⁹ o campo de força CHARMM36 com correções de CMAP para a proteína e grupo heme,^{83,85} e o modelo TIP3P para água⁹⁰. O Campo de Força CHARMM General Force *Field*⁹¹ foi utilizado para descrição molecular do ligante fluconazol. O Campo de Força Geral do CHARMM (v3.1) obtido do servidor cgenff.paramchem.org (v1.0)^{91,92} foi usado para determinar os parâmetros ausentes e atribuir os tipos de átomos e cargas atômicas parciais para o ligante fluconazol, por analogia. Os parâmetros faltantes, ligações, ângulos e diedros e as cargas parciais de todos os átomos do fluconazol foram otimizadas usando o plugin Force Field Toolkit (ffTK) no VMD^{93,94}. As estruturas de cada enzima foram obtidas no banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* - PDB conforme Tabela 3. Todos os átomos de hidrogênio da enzima, grupo heme e do ligante fluconazol foram adicionados utilizando o programa psfgen do pacote

NAMD. Os estados de protonação das histidinas foram determinados utilizando o servidor online H++⁹⁵.

Todos os sistemas foram solvatados em água explicitamente em uma caixa cúbica de tamanho no mínimo de 15 Å em relação às dimensões da proteína em cada direção, utilizando o plugin solvate do programa *Visual Molecular Dynamics* - VMD⁹⁶. Para neutralizar o sistema e mimetizar uma força iônica fisiológica a uma concentração de 0,15 M, foram adicionados íons Na⁺ e Cl⁻ utilizando o plugin auto-ionize do VMD. Um pistão e um termostato de Langevin foram utilizados para manter a pressão em 1 atm e a temperatura em 310K. Portanto, os sistemas simulados foram isotérmicos-isobáricos (ensembles NPT). Condições periódicas de contorno foram usadas. As interações de curto e longo alcance foram calculadas a cada 1 e 2 passos de integração, respectivamente. As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas com a metodologia de Soma de Ewald (PME)⁹⁷. O algoritmo Verlet-Velocidade⁸⁸ foi usado com um passo de tempo de simulação de 2 fs.

Os primeiros passos de uma MD constituem o que se denomina de “período de equilibração” ou inicialização. Nesse estágio, as propriedades do sistema não se mantêm constantes. O período de equilibração é variável e depende do sistema em estudo. Geralmente, dá-se por finalizado quando a energia, temperatura e pressão atingem patamares constantes. A partir desse ponto pode-se então gerar as trajetórias da MD e calcular as diferentes propriedades para o sistema de interesse. Para atingir o equilíbrio, realizamos etapas sequenciais de minimização (com o algoritmo de Gradientes Conjugados) e simulações de MD, como segue: i) 10000 passos de minimização com restrições em todos os átomos da estrutura da proteína, heme e fluconazol para permitir o relaxamento do solvente, seguidos por 200 ps de MD; ii) 500 passos de minimização e 200 ps de MD com restrições apenas sobre os átomos de carbono- α da proteína; iii) 2,2 ns de MD sem restrições. Finalmente, foram realizadas quatro simulações de MD independentes de produção, de 50 ns, para cada sistema em estudo.

Este mesmo protocolo de simulações foi implementado para o estudo dos 4 mutantes no alvo CYP51 de *Candida albicans*. Quatro simulações de MD independentes de produção de 50 ns foram realizadas para cada estrutura de CYP51 de *Candida albicans* mutada, na presença e ausência do ligante

fluconazol, totalizando 32 simulações e um tempo de 200 ns para cada sistema em estudo.

As análises foram realizadas com o auxílio do pacote de programas MDanalysis, MDlovoFit e VMD. Usando o programa MDanalysis⁹⁸ foi possível gerar as distribuições de distâncias e distribuições de energias potenciais advindas das interações entre o inibidor fluconazol e resíduos-chave do sítio catalítico dos ortólogos de CYP51 e mutantes de CYP51-Ca. Também calculou-se o raio de giro e contatos nativos em função do tempo. A análise da mobilidade e flutuação estrutural em função do tempo, tais como Desvio da Média Quadrático - RMSD e Flutuações da Média Quadrático - RMSF dos carbonos α usando a estrutura cristalográfica como referência foram calculados usando o programa MDLovoFit⁹⁹. VMD⁹⁶ e Pymol¹⁰⁰ foram usados para visualizar as trajetórias de MD e gerar figuras. Todas as simulações foram executadas no cluster *Kahuna* do CEPID - *Center for Computational Engineering & Sciences* (CCES) da UNICAMP.

2.4 - Parametrização de Ligantes

A incapacidade para gerar rapidamente parâmetros precisos e robustos continua a limitar seriamente a aplicação de simulações de MD para muitos sistemas. O avanço das simulações de MD como um método para sondar sistemas biológicos exige superar obstáculos, incluindo limitações na escala de tempo, no tamanho do sistema, bem como a representação exata do sistema molecular. A precisão da descrição molecular exige o desenvolvimento de campos de força que descrevam adequadamente importantes interações atômicas presentes no sistema molecular⁹⁴.

Devido a ampla variedade de estruturas químicas, alguns campos de força não contém todos os parâmetros para sua descrição molecular. Para contornar este problema, faz-se necessário o processo de parametrização. O processo de parametrização consiste em um conjunto de parâmetros topológicos e observáveis para a completa descrição das interações intra e intermoleculares do composto em estudo. A parametrização pode ser feita usando programas e servidores online baseados em campos de força, como por exemplo, o general

AMBER force field (GAFF)¹⁰¹, CHARMM General Force Field (CGenFF)⁹¹, SwissParam¹⁰², dentre outros.

A determinação dos parâmetros estruturais para as interações intramoleculares e intermoleculares de um campo de força são obtidos através de uma mistura de cálculos *ab initio*, e dados experimentais, principalmente medidas espectroscópicas⁹¹. Cabe ao pesquisador verificar qual conjunto de parâmetros melhor descreve o seu sistema molecular de interesse. No desenvolvimento do estudo contido nesta tese foi escolhido o campo de força *CHARMM General Force Field* (CGenFF) para descrição molecular do ligante fluconazol. O CGenFF é um campo de força orgânico criado com objetivo de simular moléculas farmacológicas em um meio biológico, representado pelo campo de força biomolecular CHARMM⁹¹.

2.4.1 - Protocolo padrão de parametrização do fluconazol segundo o CGenFF

Para o desenvolvimento dos parâmetros do fluconazol é necessário gerar dados “alvo” apropriados. Conforme a filosofia de parametrização do CGenFF, esses dados alvo são obtidos a partir de cálculos de mecânica quântica, exceto para os casos onde os parâmetros são obtidos experimentalmente como, os parâmetros de *Lennard Jones*. Nesta seção serão descritas as etapas executadas para obtenção de parâmetros para o ligante fluconazol compatíveis com o campo de força CGenFF.

Para a parametrização do fluconazol primeiramente utilizou-se o servidor *ParamChem* (disponível no site: <http://www.paramchem.org>, empregando o campo de força CHARMM General Force Field (CGenFF)^{103,104,105}. O fluxo de trabalho neste servidor é relativamente simples, sendo necessário apenas o *upload* da estrutura molecular na extensão mol2, e o mesmo direciona um arquivo de saída com extensão str.

O arquivo com extensão str nos informa os tipos atômicos, as cargas parciais atômicas e parâmetros por analogia às moléculas quimicamente semelhantes e já parametrizadas, conhecidos como parâmetros “coringas”. Também, contém “pontuações de penalidade” associadas a estes parâmetros coringas. Penalidades entre 10 e 50 indicam que alguma validação básica é recomendada, superiores a 50 precisam de otimização adicional. Identificados

todos os parâmetros ausentes e suas respectivas penalidades, o *plugin* Force Field Toolkit (ffTK)^{94,106} implementado no programa *Visual Molecular Dynamics - VMD*⁹⁶ foi utilizado para corrigir essas penalidades. ffTK conta também com a incorporação do programa *Gaussian09*¹⁰⁷.

A parametrização via ffTK é realizada em uma sequência de etapas, genericamente: *i*) Preparação de sistema e otimização da geometria, gerando o arquivo PSF contendo a descrição das interações ligadas e não ligadas das moléculas; *ii*) Realização dos cálculos dos perfis de interação de hidrogênio com a molécula de água TIP3; *iii*) Otimização das cargas do composto e cálculo das constantes de força e otimização das ligações e ângulos e finalmente; *iv*) a otimização dos ângulos diedrais^{93,94}.

2.4.1.1 - Preparação do sistema

Para a parametrização do fluconazol fez-se uma alteração em sua estrutura molecular, a partir da remoção de um dos seus anéis triazólicos, com o intuito de simplificar a estrutura e otimizar o processo de cálculo. A construção da estrutura molecular do fluconazol, assim como a geração dos arquivos PDB e PSF foram construídas a partir do *plugin Molefactory* implementado no VMD⁹⁶. O arquivo pdb, contém as coordenadas cartesianas x, y, e z da geometria inicial do fluconazol. Já o arquivo psf contém toda a descrição molecular do fluconazol tais como os nomes e tipos atômicos do CGenff, cargas parciais de cada átomo, as ligações covalentes, ângulos e diedrais próprios e impróprios da molécula. O processo de parametrização se inicia com a criação de um arquivo com todos os parâmetros estruturais que descrevem a molécula. A Tabela 3 nos dá a definição dos tipos atômicos de todos os átomos do fluconazol, de acordo, com a nomenclatura do CGenFF. As cargas iniciais da estrutura do fluconazol pré-definidas, segundo convenção do campo de força CHARMM também são mostradas na Tabela 3. Aos átomos de hidrogênio alifático sempre é atribuída uma carga de 0,09, exceto quando estão localizados em um átomo de carbono alifático adjacente a um átomo de azoto, carregado positivamente. Neste caso, é atribuída uma carga-padrão de 0,28. Aos Carbono e Hidrogênio aromáticos não adjacentes a um heteroátomo são atribuídas as cargas -0,115 e 0,115,

respectivamente. Para os demais átomos, as cargas iniciais, representadas por “-”, na Tabela 3 foram submetidas a um processo de cálculo e otimização^{93,94}.

Tabela 3 - Tipos atômicos e cargas iniciais do fluconazol pré-definidas pela metodologia do CGenFF.

Átomo	Tipo atômico	Carga inicial	Definição
C₁	CG301	-	Carbono ligado a hidroxila (-OH)
C₂	CG321	-	Carbono alifático sp ³ (-CH ₂)
C₃	CG331	-	Carbono alifático sp ³ (-CH ₃)
C₄ C₉ C₁₁ C₁₃	CG2R61	-0,115	Carbono aromático (- sp ²)
C₅ C₆ C₇ C₈	CG2R53	-	Carbono (sp ²), de heterocíclico de 5 membros, ligado a N (sp ²) e adjacente a outro heteroátomo
C₁₀ C₁₂	CG2R66	-	Carbono aromático ligado a Flúor
H₁	HGP1	-	Hidrogênio polar
H₂ H₃ H₄ H₅	HGA2	0.090	Hidrogênio alifático (-CH ₂)
H₆ H₇ H₈ H₉	HGR52	-	Hidrogênio apolar, de anel de 5 membros, ligado a carbono adjacente a heteroátomo
H₁₀	HGR61	0.115	Hidrogênio aromático
H₁₁ H₁₂	HGR62	-	Hidrogênio apolar, de anel de 6 membros, ligado a carbono adjacente ao heteroátomo
F₁ F₂	FGR1	-	Flúor aromático
O₁	OG311	-	Oxigênio de hidroxila
N₁ N₄	NG2R51	-	Nitrogênio de anel heterocíclico de 5 membros
N₂ N₃ N₅ N₆	NG2R50	-	Nitrogênio de anel heterocíclico de 5 membros (Todos os tipos de átomos do anel são (SP ²)).

Nota: O símbolo “-” corresponde as cargas iniciais dos átomos que devem ser submetidos a um processo de cálculo e otimização segundo a convenção do campo de força CHARMM.

A partir dos arquivos pdb e psf construídos no *molefacture*, e os parâmetros de referência (par_all_prot.inp e par_all36_cgenff.inp disponíveis no

site http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml, iniciamos o processo de modelagem do fluconazol usando, o Force Field Toolkit - fftk¹⁰⁶. Fftk permite identificar quais os parâmetros da molécula que não constam no campo de força, a partir da aba “bulpar”. A aquisição de parâmetros para descrição dos ângulos impróprios foi obtida a partir de parâmetros gerados por analogia pelo servidor SwissParam¹⁰² dada a ausência destes parâmetros no servidor CGenFF.

2.4.1.2 - Otimização da geometria

A otimização da geometria no processo de desenvolvimento de parâmetros objetiva obter uma estrutura que represente o mínimo de energia, de preferência o global. Utilizaram-se os arquivos de entrada psf e pdb gerados no *molefactory* e o software *Gaussian09*, com nível de teoria MP2/6-31G(d) para uma molécula neutra, para gerar o arquivo de entrada com extensão .gau. O gaussian apresenta um arquivo de saída .log, a partir do qual é gerado um novo pdb da estrutura otimizada que será utilizado nas próximas etapas. A Figura 9 nos mostra a sobreposição estrutural entre a estrutura inicial e a otimizada do fluconazol.

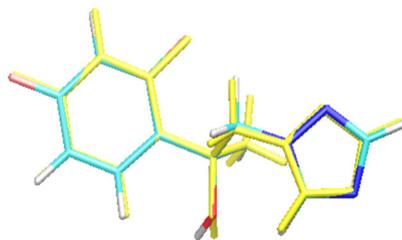


Figura 9 – Sobreposição entre a estrutura inicial simplificada do fluconazol, na qual um dos anéis triazólicos foi omitida, construída no molefactory e a estrutura otimizada em gaussian09 no nível de teoria MP2/6-31G(d) (em amarelo).

2.4.1.3 - Otimização das cargas

Com o intuito de avaliar os perfis de interação entre átomos do fluconazol com moléculas de água do tipo *Transferable Intermolecular Potentials 3* (TIP3P)⁹⁰ e calcular as cargas parciais atômicas, o fluconazol foi exposto à água e os átomos que interagem com a mesma foram definidos como doadores ou aceptores de hidrogênio, direcionados de modo, à formação de ligações de hidrogênio. Para cada um dos monoidratos formados foi gerado um arquivo de

entrada para o gaussian no nível de teoria HF/6-31G(d), mantendo a consistência com os demais campos de força CHARMM. Foram calculadas a energia mínima de interação em função da distância e do ângulo de rotação entre a água e seu respectivo átomo associado ao fluconazol.

Nesta etapa foi realizado também o cálculo do momento de dipolo. O momento de dipolo juntamente com as distâncias e energias de interação, constituem a função objetivo e compõem os dados-alvo necessários para otimização das cargas parciais. A função objetivo pode ser definida pelo momento de dipolo, a energia mínima e a distância mínima de interação entre a molécula em estudo e as moléculas de água, e é dada pela equação 8¹⁰⁶. Uma descrição mais minuciosa de cada um dos termos apresentados na equação 8 pode ser verificada em Mayne et.al. 2013.

$$\psi_{carga} = \psi_{interações} + \psi_{momento\ de\ dipolo} \quad (8)$$

Para otimização, atribuímos um valor inicial de carga com base nos valores obtidos no arquivo str, gerado pelo servidor CGenFF. Átomos cujas cargas já foram estabelecidas não participaram do processo de otimização. Além disso átomos equivalentes na estrutura do fluconazol deverão ter cargas de mesmo valor. Para cada cálculo de interação de água por mecânica quântica, é calculada a correspondente energia de interação em função da distância por mecânica molecular utilizando os valores atribuídos inicialmente para as cargas. Compararam-se as energias obtidas por mecânica molecular e mecânica quântica e, através de passos de otimização usando *simulated annealing*, ajustaram-se as cargas, até atingir o critério de convergência (valores de energias suficientemente próximos)^{93,94}. Finalmente, o arquivo psf foi atualizado com os novos valores das cargas encontradas conforme Tabela 4 abaixo.

Tabela 4 - Cargas otimizadas do fluconazol

Átomo	Carga		
	Inicial	CGENFF (.str)	Final (fTK)
C ₁	-	0,171	-0,312
C ₂	-	0,088	-0,073
C ₃	-	- 0,265	-0,135
C ₄ C ₉ C ₁₁ C ₁₃	-0,115	- 0,115	- 0,115
C ₅ C ₇	-	0,290	0,236
C ₆ C ₈	-	0,468	0,377
C ₁₀	-	0,303	0,469
C ₁₂	-	0,299	0,022
H ₁	-	0,420	0,420
H ₂ H ₃ H ₄ H ₅ H ₁₃	0,090	0,090	0,090
H ₆ H ₈	-	0,157	0,157
H ₇ H ₉	-	0,110	0,110
H ₁₀	0,115	0,115	0,115
H ₁₁	-	0,186	0,186
H ₁₂	-	0,193	0,193
F ₁	-	- 0,197	-0,197
F ₂	-	- 0,210	-0,210
O ₁	-	- 0,625	-0,390
N ₁ N ₄	-	- 0,071	0,268
N ₂ N ₅	-	- 0,574	-0,519
N ₃ N ₆	-	- 0,662	-0,703

Nota: O símbolo "-" corresponde as cargas iniciais dos átomos que devem ser submetidas a um processo de cálculo e otimização segundo a convenção do campo de força CHARMM.

2.4.1.4 - Otimização dos comprimentos de ligações, ângulos e respectivas constantes de força

Os valores de equilíbrio das distâncias de ligação e de ângulos foram obtidos através da comparação entre a Distribuição de Energia Potencial (PED – *Potential Energy Distribution*) obtida por mecânica quântica com a PED obtida

por mecânica molecular. Para proceder o cálculo de mecânica molecular foi necessário apenas atribuir valores iniciais para os comprimentos de ligações e os ângulos e, usando a função potencial do campo de força, calculou-se a energia potencial de diferentes conformações. Já na mecânica quântica, a aproximação local da superfície de energia é obtida a partir da análise dos autovalores da matriz hessiana, os quais estão relacionados com as frequências vibracionais, previstas através da segunda derivada da energia em relação aos deslocamentos das coordenadas atômicas para as ligações e ângulos. Para cada ligação ou ângulo, fazemos deslocamentos dos átomos em direções opostas gerando duas novas conformações, para as quais calculamos a energia potencial e, assim, obtemos uma descrição local da superfície de energia^{93,94, 106}.

O `fftk` determina quais as coordenadas internas afetadas para cada distorção e soma suas contribuições na energia, dada por:

$$\Delta E = \sum_j \frac{1}{2} \frac{\partial^2 E}{\partial q_i \partial q_j} \delta q_i \delta q_j \quad (9)$$

Onde q_i é a ligação ou ângulo alvo. A soma é feita sobre todas as coordenadas q_j , e a derivada é a entrada correspondente na matriz hessiana da mecânica quântica, calculada no nível de teoria MP2/6-31G(d). Comparamos as diferenças de energia obtidas por mecânica quântica e mecânica molecular, e ajustam os parâmetros até que eles converjam para valores que façam essas energias serem suficientemente similares. A função objetivo irá visar a conformação otimizada e a variação na energia causada pelos deslocamentos (0,1 Å para ligações e 5° para ângulos). A função é dada por:

$$\psi_{\text{ligados}} = \sum_{\text{ligações, ângulos}} \left[\left(\frac{q^{QM} - q^{MM}}{q_{\text{escala}}} \right)^2 + W_E (E_{\text{deslocamento}}^{QM} - E_{\text{deslocamento}}^{MM})^2 \right] \quad (10)$$

Onde q é o valor minimizado para cada ligação ou ângulo, q_{escala} é 0,03 Å para ligações e 3 Å para ângulos, W_E é o fator de peso para o componente da energia E_{escala} é 1 kcal/mol^{93,94}.

2.4.1.5 – Otimização dos ângulos diedrais

A última etapa do processo de parametrização é a determinação das torções, que descrevem as rotações em torno das ligações. Para isso examinou-se o perfil de energia potencial (PES) associado a cada um dos diedros, o que denominou-se de scan, no nível de teoria MP2/6-31G(d). Para executar o cálculo da PES fixaram-se os ângulos do diedro a ser parametrizado deixando o restante da molécula livre.

O scan no fTK é bidimensional para que seja possível atravessar conformações de alta energia, geralmente encontradas em sistemas de anéis heterocíclicos, como os presentes na estrutura do fluconazol. Para cada energia calculada na mecânica quântica deve ser calculada uma energia correspondente por mecânica molecular, que, para uma dada conformação de um ângulo diedral a ser parametrizado é dado pela equação

$$\sum_{dihedrals} k_{\phi}(1 + \cos(n\phi - \delta)) \quad (11)$$

O ângulo diedral é definido pela sequência de quatro átomos ligados, e a soma sobre as multiplicidades é uma soma de Fourier com coeficientes e ângulo de fase. Depois de calculada a energia uma nova otimização da geometria, usando os parâmetros encontrados para as ligações e ângulos no passo anterior é necessária. Desta forma, assegura-se que as aproximações feitas na obtenção desses parâmetros não irão afetar a otimização dos diedros. Para cada diedro scaneado, calculamos a energia por mecânica molecular, dada pela equação 11, utilizando todos os ângulos, ligações e cargas e atribuindo todos os termos como zero. O método *simulated annealing* foi aplicado para calcular a diferença de potencial fazendo a subtração entre os PESs obtidos por mecânica quântica e molecular. Essa diferença é traçada pela equação anterior e os resultantes serão os parâmetros diedrais^{93,94}.

Na otimização, é variado o valor da constante de força k , e o ângulo de fase é fixado como 0° ou 180° . A periodicidade n pode assumir os valores $n = 1, 2, 3, 4, 5$ e/ou 6 , de modo que cada valor acrescentado na multiplicidade irá contribuir com um par adicional de variáveis k e θ para a função objetivo. Os termos $n=1$ e $n=2$ são uteis para reproduzir mínimos locais e barreiras de diferentes alturas bem como para representar diedros em que um ou ambos

átomos centrais tem orbitais hibridizados em sp². O termo n=6 pode ser útil quando os dois átomos centrais são hibridizados em sp³. Durante a otimização é possível o controle de parâmetros como o valor máximo da constante de força (k max), alternar o valor de sigma entre 0° e 180°, ou definir uma energia de corte (*cutoff*), priorizando o cálculo em regiões mais relevantes para a otimização. Os valores das energias nas superfícies para mecânica quântica e mecânica molecular são comparados visualmente, através de gráficos. Os parâmetros vão sendo ajustados e refinados até obtenção de um *fitting* visivelmente aceitável^{93,94}. Para o cálculo de diedros a função objetivo é dada pela diferença no PES entre os scans de mecânica quântica e mecânica molecular, e é dada pela equação (12)

$$\psi_{diedrais} = \sum_{\text{conformações}} w_i (E^{QM} - E^{MM} + c)^2 \quad (12)$$

Onde E^{QM} é a energia da conformação por mecânica quântica, E^{MM} é a energia total por mecânica molecular, c é uma constante de normalização que faz $\frac{\partial \psi_{diedrais}}{\partial c} = 0$ ou seja, a média $c = E^{-MM} - E^{-QM}$ é ponderada por W_i . A soma é feita sobre todas as conformações realizadas pelo scan^{93,94}.

2.4.1.6 – Ângulos diedrais impróprios

A aquisição de parâmetros para descrição dos ângulos impróprios foi obtida a partir de parâmetros gerados por analogia pelo servidor *SwissParam*, devido à ausência destes parâmetros no servidor CGenFF. A adição destes parâmetros foi importante para manter a planaridade do componente 2,4-difluorofenil presente na estrutura do fluconazol.

Tabela 5 - Ângulos diedrais impróprios e suas respectivas constantes de força k_φ e ângulo φ_0 .

Diedros Impróprios	k_φ	φ_0
CG2R61-CG2R61-CG301-CG2R66	2.879	0.00
CG2R61-CG2R61-CG2R61-HG61	1.079	0.00
CG2R66-CG2R61-CG2R61-FGR1	2.519	0.00

A lista completa de todos os parâmetros calculados e otimizados para o fluconazol segundo a metodologia citada nesta seção se encontra nas Tabelas A1, A2 e A3 em Anexo.

2.5 - Docking Molecular

O Docking Molecular (ancoramento molecular) é um método que prevê a orientação de ajuste preferencial, por exemplo, de um ligante (L) na região do sítio de ligação de um determinado alvo macromolecular (R), de modo, a formar um complexo (RL) estável^{108,109}.

O método de docking foi introduzido no início da década de 80¹¹⁰, e desde então tem encontrado ampla aplicação em química medicinal e biologia estrutural. Trata-se de uma ferramenta de grande valor em projetos de planejamento de drogas para fins farmacêuticos. Atualmente é utilizado para a identificação e otimização de moléculas bioativas, identificação de alvos para ligação com um ligante específico (conhecido por docking reverso), design de ligantes multialvo e reposicionamento de drogas (novas ações para fármacos já existentes)¹¹¹ dentre outros.

Basicamente uma simulação de docking molecular envolve três elementos fundamentais: i) a representação do sistema; ii) a busca no espaço conformacional e iii) a classificação das soluções, de acordo com, uma função de pontuação (*Score*). No presente estudo a simulação de docking molecular foi realizada utilizando o programa DockThor¹¹². Dockthor é um servidor on-line que foi implementado para lidar com ligantes flexíveis utilizando um algoritmo genético de múltiplas soluções como função de busca e o campo de força MMFF94 como função de avaliação. Primeiramente identifica-se o espaço conformacional disponível para o ligante no sítio de ligação da enzima alvo para então dar início a busca conformacional. A busca no espaço conformacional consiste em uma exaustiva amostragem das possíveis conformações do complexo (RL) e orientações do ligante no sítio de ligação. Como resultado desta etapa, gera-se uma lista de diferentes poses do ligante, de modo que a melhor pose será a que possuir o melhor valor da função de pontuação ou score.

A função de avaliação baseia-se no campo de força clássica MMFF94S^{112,113} e cada solução gerada pelo algoritmo do programa Dockthor é

obtida a partir da somatória entre as contribuições da energia de interação do complexo macromolécula receptora - ligante (RL) e pela energia intramolecular e conformacional relativo aos ângulos diedrais do ligante e é representada pela equação 13.

$$\begin{aligned}
 & \sum_{\substack{\text{Macromolécula} \\ \text{receptora}}} \sum_{\text{Ligante}} \left\{ p \left(\frac{A_{ij}}{(r_{ij}^{12})} - \frac{B_{ij}}{(r_{ij}^6)} \right) + \frac{q_i q_j}{D(r_{ij}) r_{ij}} \right\} \\
 & + \sum_{\text{Ligante}} \sum_{\text{Ligante}} \left\{ \frac{A_{ij}}{(r_{ij}^{12})} - \frac{B_{ij}}{(r_{ij}^6)} + \frac{q_i q_j}{D(r_{ij}) r_{ij}} \right\} \\
 & + \sum_{\text{dihedrals}} \gamma k (1 + \cos(\omega_k \theta_k - \theta_{0k})) \quad (13)
 \end{aligned}$$

Onde r_{ij} é a distância entre os átomos i e j , A_{ij} e B_{ij} são os parâmetros de Lennard-Jones, q_i e q_j são as cargas parciais atômicas dos átomos i e j respectivamente, e D é a função dielétrica sigmoideal dependente da distância r_{ij} , que modela o efeito de blindagem do solvente nas interações eletrostáticas. O parâmetro γk é a constante de energia associada com a rotação de uma ligação química, θ_k é o ângulo de torção, ω_k é a periodicidade e θ_{0k} é o ângulo de fase. Embora o potencial de *Lennard-Jones* modele de forma adequada as interações repulsivas e atrativas, o termo repulsivo r^{12} muitas vezes se torna um problema, fazendo com que a energia de interação do ligante com a macromolécula receptora tenha um valor muito alto. Diferentes métodos têm sido empregados para a "suavização" do potencial de LJ, no programa DockThor foi introduzido um multiplicador (p) que é representado na equação para contornar este problema.

$$p = \frac{n}{c \times n_{max}}, \quad n = \text{Número de } \text{v} \text{li} \text{ções}; c = 0,5.$$

Um outro aspecto importante é o tratamento dado as interações de longo alcance. A avaliação das interações repulsivas e atrativas de LJ e das interações eletrostáticas entre a macromolécula receptora e o ligante torna o cálculo altamente custoso computacionalmente. Uma aproximação implementada para superar esta limitação computacional é a de considerar somente os átomos da macromolécula localizados em regiões vizinhas ao sítio de ligação. Tal aproximação é conhecida por método de grade de energia¹⁰⁸. Na metodologia

de docking baseada em grade, os valores relacionados ao potencial de LJ e eletrostático de todos os átomos da macromolécula rígida, são pré-calculados e armazenados em cada ponto de uma malha tridimensional construída de tal forma a englobar o sítio ativo da macromolécula. Os valores em um determinado ponto são posteriormente obtidos por interpolação. Esta metodologia permite que as interações de longo alcance sejam consideradas em sua totalidade e reduz significativamente o custo computacional por eliminar o cálculo do somatório relativo aos átomos da macromolécula receptora durante a execução do algoritmo¹¹⁴.

Após o cálculo da energia associada a cada complexo, as soluções geradas (conformações ou 'poses' previstas do ligante) são ordenadas. As soluções de melhor pontuação serão submetidas a processos de recombinação aqueles que agruparam soluções com diferentes valores de RMSD (inferiores a 2 Å) são reutilizados pelo algoritmo em operações genéticas para gerar novas populações mais aptas, realizando uma varredura extensa do espaço conformacional de soluções até atingir o critério de parada, o número de repetições estabelecido. Por fim, os modelos são novamente ordenados e apresentados ao usuário na forma de arquivos de coordenadas podendo o seu protocolo de docking ser validado a partir da comparação com a conformação correspondente a estrutura cristalográfica caso houver^{108,109,112,115}. Dentre as limitações desta metodologia temos a incapacidade de modelar com precisão o solvente, a entropia e a flexibilidade do alvo macromolecular¹¹⁶ em comparação aos métodos de cálculo de energia livre de ligação tais como FEP (*Free energy perturbation*) e LIE (*Linear Interaction Energy*). Estes últimos embora sejam mais precisos envolvem um alto custo computacional e exigem múltiplas simulações de MD tornando-se dispendiosos e pouco práticos no âmbito da triagem de moléculas bioativas e planejamento de fármacos.

2.5.1- Protocolo das simulações de docking molecular

A simulação de docking molecular envolveu basicamente três etapas: i) a representação do sistema, ii) predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro do sítio de ligação da enzima alvo e iii) estimativa da afinidade de ligação ou força de associação entre uma enzima alvo e seu inibidor, por

exemplo. No presente estudo analisaram-se os modos de ligação do inibidor fluconazol comparativamente entre os ortólogos de CYP51 presentes em *Homo sapiens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* e *glabrata* e em quatro mutantes de *Candida albicans* com o intuito de se estimar a afinidade de ligação de cada um destes complexos ao fluconazol.

Os cálculos de docking molecular foram realizados a partir das coordenadas das estruturas tridimensionais dos ortólogos de CYP51 humana (PDB id 3LD6), micobacteriana (PDB id 1EA1) e fúngicas (*Candida albicans* (PDB id 5TZ1) e *Candida glabrata* (PDB id 5JLC)), conforme Tabela 2. A estrutura do ligante fluconazol foi obtida do banco de dados ZINC¹¹⁷ por questões metodológicas optou-se por não iniciar o ancoramento partindo de uma conformação do ligante de baixa energia, tal como a da estrutura cristalográfica. Utilizando o programa Avogadro¹¹⁸ realizou-se a otimização de geometria e posterior geração do arquivo em formato PDB, contendo as coordenadas do ligante para posterior docagem. No programa DockThor, as coordenadas estruturais da macromolécula, do ligante, do grupo heme e das moléculas de água estruturais foram submetidas a um protocolo padrão de preparação. Para cada componente em específico foi realizada a adição de átomos de hidrogênio, o cálculo das cargas atômicas parciais padrões de acordo com o campo de força implementado no programa. Os arquivos correspondentes às coordenadas das águas estruturais e do grupo heme e seu íon de Fe³⁺ presentes no sítio ativo da enzima CYP51, foram definidos como cofatores durante o processo de docagem.

O espaço tridimensional dentro do qual o ligante tenta acoplar-se à estrutura macromolecular foi definido para englobar todo o sítio ativo da enzima. Foi gerada uma caixa cúbica com o tamanho da aresta de 30 Å, a qual foi centrada nas coordenadas atômicas X, Y e Z do íon de Fe³⁺ do grupo Heme, respectivo a cada enzima ortóloga avaliada, por caracterizar uma região central do sítio ativo. Finalizada a etapa de preparação do sistema o cálculo das contribuições energéticas das interações de *Van der Waals* e eletrostáticas entre os átomos do ligante e da macromolécula foram avaliadas na seleção desta malha tridimensional sob uma resolução de 0.25 Å. Para cada complexo foram realizados 10 cálculos, gerando 10 conformações (poses). As melhores soluções, isto é, as 'poses' da molécula do ligante de menor energia foram ranqueadas de acordo com os valores da função de pontuação ou score.

No programa Dockthor a função de pontuação de cada 'pose' gerada também pode ser obtida comparando-se com a conformação experimental de raios X, a partir do cálculo do RMSD entre ambas as moléculas. Tal ferramenta permite a validação do protocolo de docking adotado por meio da reprodução do modo de interação proposto experimentalmente (Redocking). Valores de RMSD menores que 2 Å são considerados satisfatórios para essa análise. A análise de docking molecular comparativa foi realizada para compreender a alteração nos modos de ligação do fluconazol entre os ortólogos de CYP51 e mutantes de CYP51-Ca. Os resultados obtidos foram visualizados interativamente no site do servidor Dockthor (<https://dockthor.incc.br/v2/>) e também podem ser verificados adiante nas Tabelas 7 e 9 das seções 3.1.4 e 3.2.3 respectivamente.

3- RESULTADOS

3.1 - Base molecular da inibição da biossíntese de esteróis em ortólogos da enzima Esterol 14 α -desmetilase

Neste estudo avaliou-se a atividade inibitória do quimioterápico antifúngico fluconazol sobre quatro ortólogos de *Sterol 14- α -desmetilase* (CYP51). Análises estruturais e dinâmicas comparativas entre as enzimas CYP51 do citocromo P450 de espécies patogênicas como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Mycobacterium tuberculosis* em relação ao ortólogo de *Homo sapiens* complexados ao fluconazol foram investigadas via simulações de dinâmica molecular (MD). Visando compreender as diferenças dos modos de ligação do fluconazol com o sítio de ligação de cada ortólogo de CYP51 e estimar a sua energia de interação associativa a cada um destes sistemas, simulações de docking molecular também foram usadas. A presente investigação visa a compreensão das diferenças de afinidade ao quimioterápico fluconazol pelos ortólogos de CYP51. Segundo relatado por estudos experimentais o fluconazol tem uma menor afinidade com o ortólogo do CYP51 de humanos $k_d = 30,5\mu M^{67}$. Sua afinidade nos alvos de CYP51 fúngicos é muito maior, exibindo constantes de dissociação na escala nano-molar em cepas de *Candida albicans* e *glabrata* $k_d = 56nM^{67}$. Fluconazol também é conhecido por exibir alguma atividade antimicobacteriana $k_d = 10\mu M^{39,68}$. O artigo científico publicado que compõem os resultados obtidos deste estudo¹⁴¹ pode ser encontrado em (Honorato Siqueira and Martínez 2020) e em Anexo.

3.1.1 - Análises comparativas entre os ortólogos de Esterol 14- α -desmetilase

Nesta seção serão discutidas as características estruturais entre os ortólogos de CYP51 de *Homo sapiens* (CYP51-Hs), *Candida albicans* (CYP51-Ca), *Candida glabrata* (CYP51-Cg) e *Mycobacterium tuberculosis* (CYP51-Mt). Aqui observou-se uma relativa diferença de identidade entre os quatro ortólogos de CYP51.

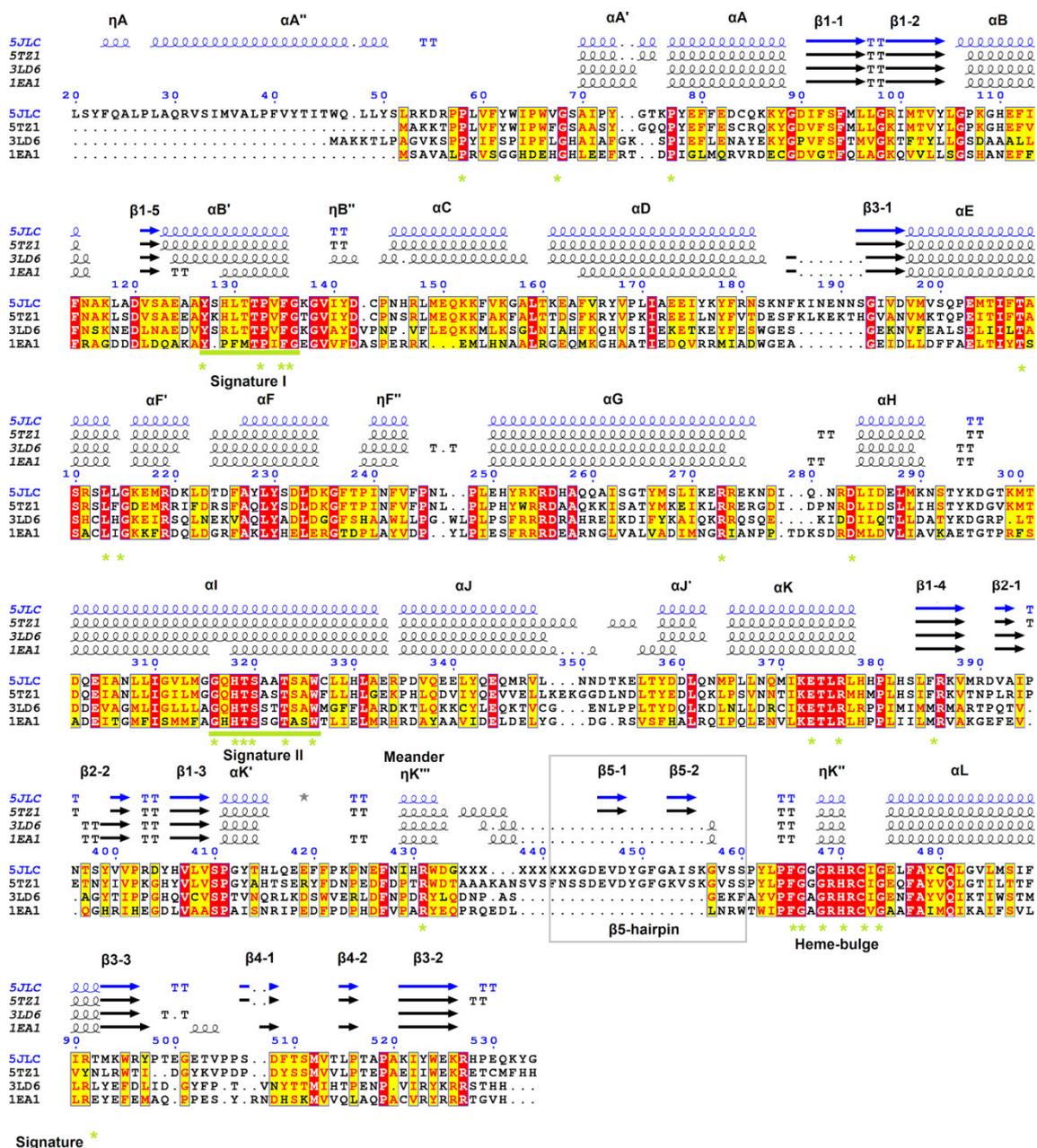
A partir do alinhamento estrutural entre os quatro ortólogos de CYP51 verificou-se que a identidade de sequência de CYP51-Ca com o seu ortólogo

CYP51-Cg é de 63%, e o desvio médio quadrático (RMSD) dos átomos C α é de apenas 0,91Å. Já a identidade de sequência de CYP51-Ca com o seu ortólogo CYP51-Mt é consideravelmente menor, de cerca de 21%, e o RMSD dos C α é de 1.98Å. Em relação ao ortólogo humano CYP51-Hs, as identidades de sequência de CYP51-Ca e CYP51-Cg são de 39,33% e 38,43% respectivamente, e o desvio quadrático médio (RMSD) dos átomos C α é de aproximadamente 1,38Å em *C.albicans* e 1,40Å em *C.glabrata*. CYP51-Mt apresenta uma identidade de sequência de 24,49% em relação ao ortólogo humano e seu RMSD em relação aos C α é de 1.92Å. Apesar do RMSD em relação aos átomos de C α em CYP51-Mt ser maior do que o observado entre CYP51s fúngicos, tais valores demonstram uma significativa semelhança estrutural entre os ortólogos de CYP51 entre espécies patogênicas e o CYP51 humano.

Os domínios catalíticos destas enzimas são compostos por uma série de sequências de resíduos invariantes e evolutivamente conservados que conferem a esta família uma espécie de assinatura. Uma representação detalhada do alinhamento de sequência dos quatro ortólogos é mostrada na Figura 10 abaixo. Estes resíduos invariantes são acreditados por representar o requisito mínimo para a atividade catalítica de CYP51^{119,120}. As regiões de maior conservação estrutural entre os quatro ortólogos de CYP51 estudados aqui compreendem as regiões do bolso de ligação do grupo heme - '*heme-bulge*'. O heme-bulge contém a sequência de resíduos F-G-x-G-R-H-R-C-x-G antes da hélice L, contendo um resíduo de cisteína que é altamente conservado dentro da família 51 do citocromo P450. Na hélice K, a sequência K-E-T-L-R próxima à região de loop *meander* é encontrada. Na hélice B, temos a sequência A-Y-x-x-x-x-T-P-x-F-G, denominada de assinatura I e, na parte central da hélice I, outra sequência considerada como uma das assinaturas do P450: G-x-H-T-S-x-x-T-x-x-W, a assinatura II e podem ser visualizadas também, na Figura10.

As diferenças estruturais entre os quatro ortólogos estudados aqui envolvem regiões importantes relacionadas à associação e dissociação do ligante do bolso catalítico. Verificou-se na estrutura CYP51-Mt a presença de dois canais acessíveis ao solvente, que conduzem o substrato/inibidor da superfície até a cavidade catalítica, conforme mostra a Figura 11A. O canal 1 é exclusivo de CYP51-Mt e é localizado na região da hélice B' e loop BC. O canal

2 está presente em todos os quatro CYPs aqui estudados e é formado pela região C-terminal da hélice F, N-terminal da hélice G e loop FG, como mostrado nas Figuras 11A a 11C^{27,121,122}.



a informação de estrutura secundária foi adicionada a este alinhamento com a ajuda do servidor web *ENDscript*¹⁴⁰.

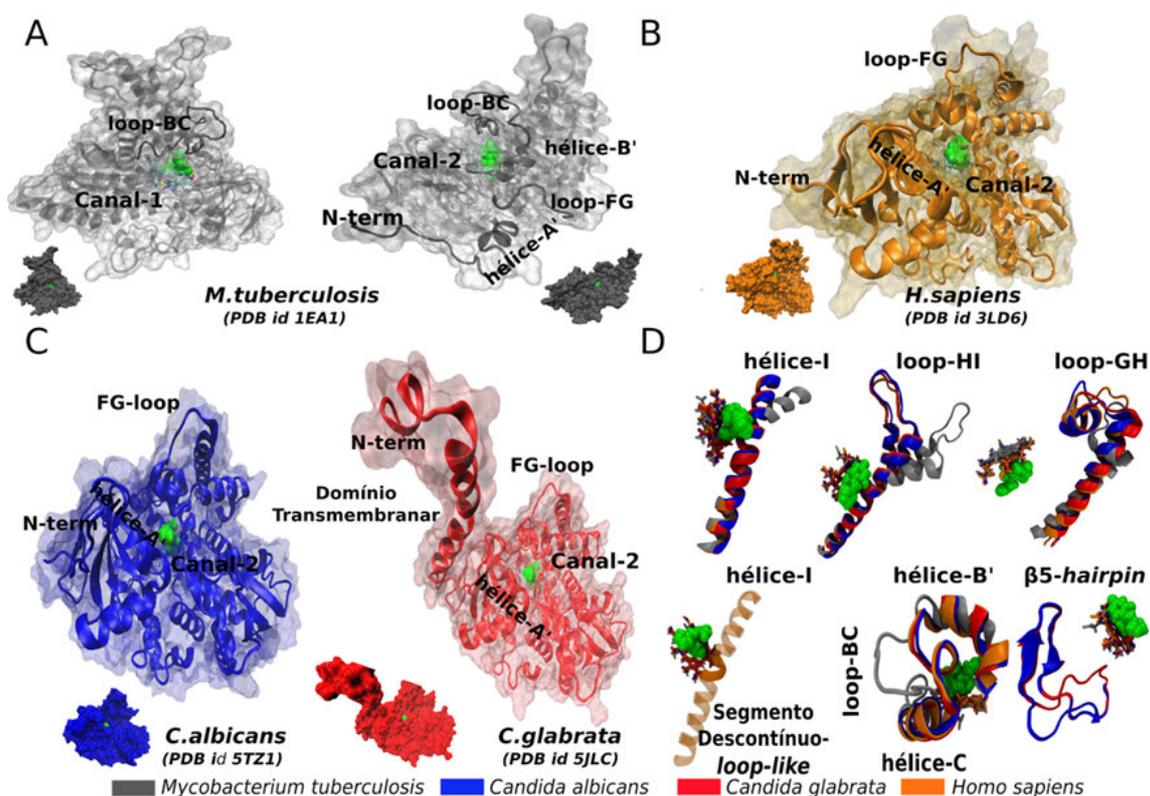


Figura 11 - Análise comparativa das estruturas do CYP51 deste estudo. A) Em CYP51-Mt (PDB id 1EA1) dois canais conectam o local de ligação com o solvente. O canal 2 é comum a todos os CYP51s e o Canal 1 é específico de CYP51-Mt. O canal 1 existe devido ao maior comprimento e flexibilidade do loop BC. B e C) A estrutura humana de CYP51 (PDB id 3LD6) e estruturas fúngicas CYP51-Ca (PDB id 5TZ1), CYP51-Cg (PDB id 5JLC) exibem o canal 2 em comum com CYP51-Mt. (C) CYP51-Cg tem uma hélice transmembrana adicional (T-anchor). (C) Superposição estrutural dos quatro ortólogos do CYP51 indicando as regiões de grande variabilidade: a hélice-I, o loop HI e a hélice-H, e o loop GH e a hélice G são deslocadas em CYP51-Mt em relação às enzimas fúngicas e humana; o loop BC de CYP51-Mt é mais longo o que leva à abertura do Canal 1; O β 5-hairpin, que é o segmento filo-específico das enzimas CYP51 fúngicas. O ligante é mostrado em verde na representação vdw e o grupo Heme é mostrado em representação sticks.

A presente caracterização estrutural destas enzimas também nos revelou outras características distintivas, filo-específicas relevantes para a inibição enzimática de CYP51, e podem ter importância funcional para o projeto de novos compostos inibitórios com alta especificidade: i) A presença de um domínio transmembranar helicoidal (*T-anchor*) na região N terminal de CYP51 eucarióticos, particularmente presente em CYP51 de fungos, como mostrado na Figura 11C, e mamíferos, que está ausente em CYPS procarióticos como

micobactérias; ii) A diferença na estrutura e posição das hélices H e I. Em CYP51-Mt as hélice H e I estão reposicionadas em relação à sua posição nos CYPs fúngicos e humano.

Como mostrado na Figura 11D, a porção N-terminal da hélice I exibe uma inclinação, afastando-se do núcleo estrutural da enzima em *M.tuberculosis* em relação à sua porção C-terminal. Como consequência do reposicionamento da hélice I, as hélices H e G, e as alças de conexão, exibem variações estruturais significativas dentro dos CYP51s aqui estudados. Essas diferenças estruturais levam à abertura, em CYP51-Mt, do Canal 1 (hélice B' e loop BC) de entrada ou saída do substrato/ligante; iii) O loop BC é ligeiramente mais curto e apresenta uma conformação fechada em CYP51s fúngicos e humano. Enquanto em CYP51-Mt uma longa sequência de resíduos e uma conformação aberta do loop BC é verificada como mostrado na Figura 11D. Como consequência o sítio catalítico da enzima micobacteriana é mais acessível ao solvente^{43,27,122}. iv) A enzima ortóloga humana apresenta uma descontinuidade na região da hélice I entre os resíduos de Gly312 e Ser316 (*loop-like*), conforme mostra a Figura 11D. A análise estrutural entre os ortólogos de CYP51 avaliados aqui sugere que esta área em forma de loop é formada devido à longa sequência de resíduos polares na região central da hélice I (-HTSSTTS-), correspondente à assinatura 2 na Figura 10. Em CYP51-Hs, os grupos OH desses resíduos polares interrompem a rede de ligações de hidrogênio normal da cadeia principal proporcionando uma maior flexibilidade nesta região.

Nas enzimas fúngicas e micobacteriana ao menos um ou dois resíduos apolares interrompem essa sequência de resíduos polares na área de assinatura II conforme mostra, a Figura 10. v) A presença do β 5-hairpin (o segmento único de CYP51 fúngico e até o momento não observado em qualquer outra enzima do citocromo P450, mostrado na Figura 10 e Figura 11D. Este segmento está localizado perto da superfície da proteína e é formado por uma sequência de inserção entre as regiões do *meander* e do *heme-bulge*, e revela importância funcional. Os CYP51s fúngicos requerem um parceiro doador de elétrons para desempenhar sua função, o citocromo P450 redutase NADPH (CPR)¹²². Acredita-se que o β 5-hairpin possa desempenhar um papel importante na interação do CYP51 fúngico com CPR^{27,43,124}.

3.1.2- Flutuações estruturais dos ortólogos de CYP51 e suas interações com o fluconazol

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para os quatro ortólogos CYP51-Hs, CYP51-Ca, CYP51-Cg e CYP51-Mt para avaliar as flutuações mais importantes em relação às suas respectivas estruturas cristalográficas. A variabilidade estrutural foi caracterizada pelo RMSD das estruturas utilizando o software MDLovoFIT⁹⁹. Este software realiza um alinhamento estrutural robusto, o qual gera automaticamente um subconjunto de resíduos para os quais a estrutura é mais conservada. Nas simulações dos quatro ortólogos complexados ao fluconazol observou-se que pelo menos 80% dos átomos de C α poderiam ser sobrepostos à estrutura cristalográfica com deslocamentos inferiores a 1Å. Isto indica que, em geral, as estruturas são estáveis na escala de tempo das simulações deste trabalho.

As Figuras 12A a 12D exibem sobreposições dos *snapshots* obtidos das simulações de MD, após alinhamento. Os 80% de resíduos correspondentes às regiões de menor flexibilidade estrutural são representados em azul, e os 20% de resíduos de maior diversidade conformacional compreendem as regiões mostradas em verde. A maior variabilidade estrutural de CYP51-Mt é evidente, particularmente nas regiões da hélice C, dos loops HI, -GH e -BC tal como mostrado na Figura 12A. A Figura 12E mostra que, especificamente para a região do loop BC, há uma diferença significativa entre CYP51-Mt e os outros ortólogos. A menor extensão do loop BC em CYP51s fúngicos e humano resulta em uma flexibilidade reduzida, a qual se assemelha com as regiões centrais da proteína. Em contrapartida, a região do loop BC em CYP51-Mt apresenta variações significativas exibindo desvios da ordem de 4-5 Å da sua respectiva conformação cristalográfica.

As regiões com maior mobilidade nas enzimas fúngicas envolveram as regiões do loop FG e o β 5-hairpin, como mostrado nas figuras 12B e 12C. Este *hairpin*, como apontado antes, é exclusivo de CYPs fúngicos, está localizado próximo da superfície da proteína, e aparentemente não afeta a ligação do substrato. Na enzima ortóloga humana as regiões de maior mobilidade estrutural

envolveram as hélices A', B', F, F', F'' e G e seu respectivo loop FG. O aumento da flexibilidade do loop FG e hélice F pode ser verificado na Figura 12D.

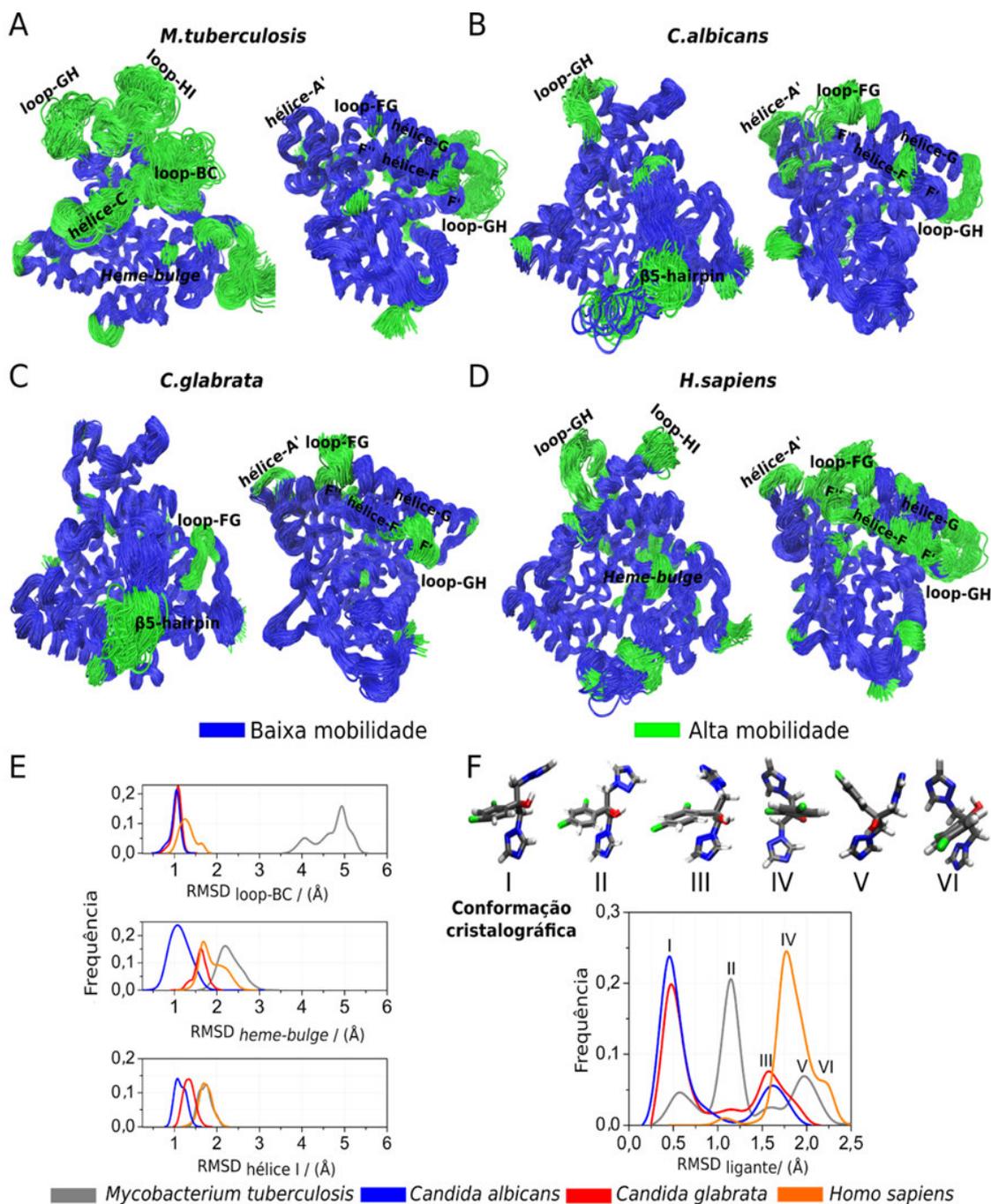


Figura 12 - Flutuações estruturais das estruturas de CYP51. A) CYP51-Mt, B) CYP51-Ca; C) CYP51-Cg, D) CYP51-Hs. Regiões de menor flexibilidade são mostradas em azul, e regiões de maior flexibilidade são mostradas em verde. E) RMSDs do loop BC, do bolso de ligação do heme, *heme-bulge* e da hélice I, mostrando as maiores flutuações estruturais dessas regiões em CYP51-Mt e CYP51-Hs em relação aos ortólogos fúngicos. F) Conformações do ligante no bolso de ligação: Seis diferentes conformações foram observadas, sendo a cristalográfica predominante em enzimas fúngicas, enquanto a conformação mais frequente em CYP51-Mt difere da estrutura cristalográfica por uma rotação de um dos anéis triazólico. A conformação mais frequente no CYP51-

Hs difere da estrutura cristalográfica por uma rotação dos anéis triazólico e 2,4-difluorofenil e pela inclinação da molécula em relação ao plano Heme.

Estas simulações mostram, portanto, que existe uma correlação significativa entre as regiões de baixa similaridade estrutural entre os quatro ortólogos de CYP51 e a suas flexibilidades estruturais. A diferença estrutural exibida na Figura 11D para o loop BC na estrutura de CYP51-Mt é associada a este loop ser altamente flexível. Esta peculiaridade estrutural e dinâmica da enzima micobacteriana leva à abertura do Canal 1 de possível associação e liberação do ligante.

O loop BC está próximo do sítio de ligação e sua flexibilidade é refletida pela dinâmica do fluconazol. Também perto do sítio de ligação, observamos a descontinuidade da hélice-I em CYP51-Hs. O loop BC nos ortólogos fúngicos são mais rígidos e, como mostrado na Figura 12F, os desvios estruturais do ligante da conformação cristalográfica, no bolso de ligação dos CYP51s fúngicos, são menores que os observados em CYP51-Mt e CYP51-Hs. Essas diferenças estruturais causam variações conformacionais nos modos de ligação do ligante. O fluconazol é capaz de assumir 6 conformações diferentes, conforme amostrado por seus RMSDs em relação à conformação cristalográfica (Figura 12F).

A conformação I é a cristalográfica e é completamente predominante nas simulações de CYP51-Ca e CYP51-Cg. A conformação mais freqüente em CYP51-Mt difere em cerca de 1,2Å de RMSD da conformação de enzimas fúngicas, mas a conformação cristalográfica também está presente. No CYP51 humano, por outro lado, o fluconazol assume conformações preponderantes que diferem em cerca de 2,2Å do modo de ligação cristalográfico do fluconazol. As conformações I e II diferem pelas rotações de um dos anéis triazólicos, enquanto as conformações III a VI resultam das rotações combinadas dos anéis triazólico e difluorofenil levando a diferentes confôrmeros. As conformações V e VI, que são as mais frequentes para o CYP51-Hs, são caracterizadas por uma inclinação da molécula no sítio ativo. Adiante mostraremos que essas diferenças conformacionais afetam as afinidades estimadas do fluconazol com cada ortólogo.

3.1.3- A inibição da atividade catalítica de ortólogos de CYP

Nesta seção, os modos de interação entre os quatro ortólogos de CYP51 e o ligante fluconazol serão apresentados. O fluconazol inibe a atividade de CYP51 formando uma ligação de coordenação axial com o átomo de ferro do grupo Heme, mas sua especificidade é dependente da interação dos grupos triazólico e difluorofenil com os resíduos do sítio de ligação conforme mostra a Tabela 6 e a Figura 13A. Os principais resíduos de CYP51 entre os quatro ortólogos que interagem com o fluconazol a menos de 4,0 Å e seus elementos de estrutura secundários correspondentes estão representadas na Tabela 6. Os aminoácidos conservados estão destacados em negrito.

Tabela 6 – Principais resíduos de CYP51 de *M.tuberculosis* (PDB:1EA1), *C.albicans* (PDB-5TZ1), *C.glabrata* (PDB-5JLC) e *H.sapiens* (PDB:3LD6) que interagem com o fluconazol a uma distância menor e igual a 4,0 Å.

Elementos de Estrutura Secundária	M.tuberculosis PDB:1EA1	C.Albicans PDB:5TZ1	C.glabrata PDB:5JLC	H.sapiens PDB:3LD6
Hélice B'	TYR76	TYR118	TYR127	TYR131
	PHE78	HIS120	HIS129	ARG133
	MET79	LEU121	LEU130	LEU134
	PHE83	PHE126	PHE135	PHE139
Hélice B' turn	PHE89	TYR132	TYR141	TYR145
Hélice C	ARG96	LEU139	LEU148	PHE152
	LEU100	LYS143	LYS152	LYS156
	THR176	PHE228	PHE237	PHE234
Hélice I	SER252	GLY303	GLY311	GLY307
	PHE255	MET306	MET314	LEU310
	ALA256	GLY307	GLY315	ALA311
	HIS259	HIS310	HIS318	HIS314
	THR260	THR311	THR319	THR315
Hélice K/ β1-4 loop	LEU321	LEU376	LEU381	ILE377
β4 hairpin	MET433	MET508	MET512	MET487
	VAL434	VAL509	VAL513	ILE488

Realizou-se também o cálculo da fração de tempo de simulação em que cada resíduo do sítio ativo de CYP51 permanece em contato com os anéis triazólico e difluorofenil do fluconazol. Os resíduos foram considerados em contato se a distância mínima entre qualquer um de seus átomos fosse menor

ou igual a 4Å. Verificou-se que sete resíduos estavam em contato com o ligante em pelo menos uma das estruturas e exibiam diferentes interações em cada ortólogo. A porcentagem de tempo dessas interações nas simulações é mostrada na Figura 13B.

O anel triazólico da estrutura do fluconazol se estende do grupo heme em direção ao canal 1 (hélices B' e I, folhas β , β 1-4 e β 4-1,2, e o loop que conecta a hélice k e a β 1-4). Este anel triazólico estabelece um empilhamento T com o anel fenólico do resíduo de tirosina na posição 76 (hélice B') (numeração de CYP51-Mt) similarmente ao observado nos respectivos ortólogos fúngicos Y118 em *C.albicans*, Y127 em *C.glabrata*. Na enzima humana este mesmo anel estabelece interações do tipo π - π *stacking* com o resíduo Y131. A interação do anel triazólico do fluconazol com estes resíduos, na região da hélice B' permite o seu correto posicionamento com o grupo heme, centro catalítico das enzimas CYP51.

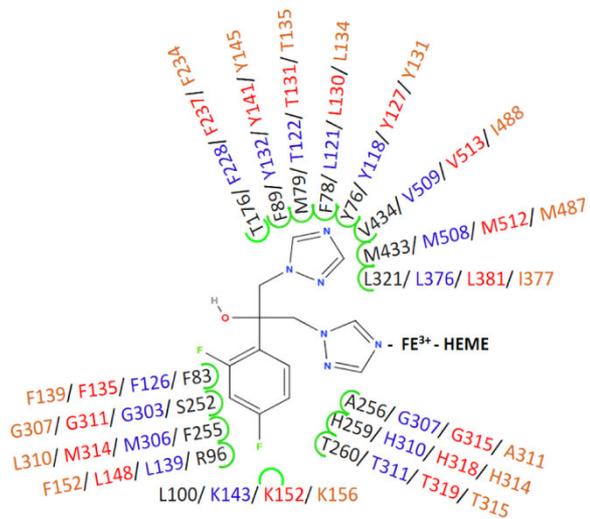
As interações entre o fluconazol e resíduos presentes no sítio de ligação que são essencialmente diferentes entre o ortólogo humano e as enzimas fúngicas são as apresentadas pelo resíduo F152 (no CYP51-Hs), que é substituído por L139 na CYP51-Ca e por L148 na CYP51-Cg. A interação fluconazol-F152, no entanto, não é estabilizada por interações diretas. Em vez disso, o resíduo F152 forma uma interação de empilhamento com Y145, que por sua vez forma uma ligação de hidrogênio com um dos grupos carboxilato do Heme (Figura 13E). Este empacotamento hidrofóbico não é possível nos outros ortólogos visto que a interação de empilhamento não é possível em variantes fúngicas (o resíduo Phe é substituído por um resíduo de Leu), e também porque o resíduo em CYP51-Mt é um resíduo carregado (R96).

Há fundamentalmente duas interações que são diferentes entre as enzimas fúngicas e micobacteriana. i) As interações hidrofóbicas do fluconazol com o resíduo aromático na posição 89 (F89 em CYP51-Mt, Y132/Y141 em CYP51-Ca, -Cg, respectivamente); ii) As interações com o resíduo de R96 em CYP51-Mt e de resíduos hidrofóbicos na posição correspondente a (L139/L148 em CYP51-Ca, -Cg, respectivamente). As interações hidrofóbicas do fluconazol com os resíduos polares Y132/Y141 das enzimas fúngicas e Y145 em CYP51-Hs são estáveis, como mostra a Figura 13B. Ao mesmo tempo, o resíduo F89, correspondente em CYP51-Mt, não estabeleceu contato com o ligante. O

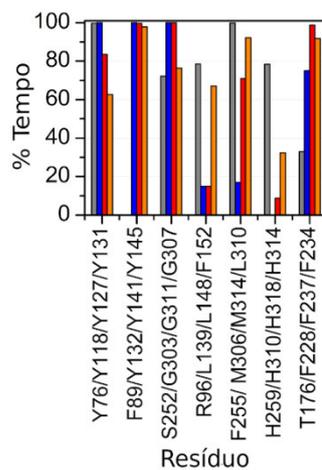
fluconazol interage persistentemente, no entanto, com o resíduo de R96 da CYP51-Mt, na mesma posição que o resíduo F152 em CYP5-Hs, o qual foi discutido acima. R96 estabelece interação hidrofílica adicional no sítio de ligação de CYP51-Mt. Esta interação polar é crucial para o modo de ligação diferencial do fluconazol em relação às enzimas fúngicas. Isto ocorre porque o resíduo em posições correspondentes em CYPs fúngicos são leucinas, assim, substituições hidrofóbicas. Os Resíduos de leucina nas posições L139 e L148 das enzimas fúngicas de Ca e Cg respectivamente estabeleceram contato com o ligante por pouco mais de 10% do tempo de simulação.

Nenhuma ligação de hidrogênio direta foi formada entre o fluconazol e os resíduos do sítio de ligação dos ortólogos de CYP51 avaliados aqui. Identificou-se, no entanto, que resíduos específicos presentes no sítio catalítico destas enzimas formam ligações de hidrogênio com o grupo propionato do Heme ocasionando discretas diferenças na disposição do sítio ativo destas enzimas. Especificamente, Tyr-118_(anel A), Tyr132_(anel D) em *C.albicans* os quais são substituídos por Tyr-127_(anel A), Tyr-141_(anel D) respectivamente em *C.glabrata* e os resíduos Tyr-76_(anel A), Arg-96_(hélice C) em *M.tuberculosis*. Tal como mostrado no primeiro painel da (Figura 13C), os hidrogênios polares das cadeias laterais dos resíduos de Tyr76/118/127/131 interagem com o grupo propionato do heme a uma distância de cerca de 2,9 Å. Essa interação é eventualmente perdida no ortólogo humano.

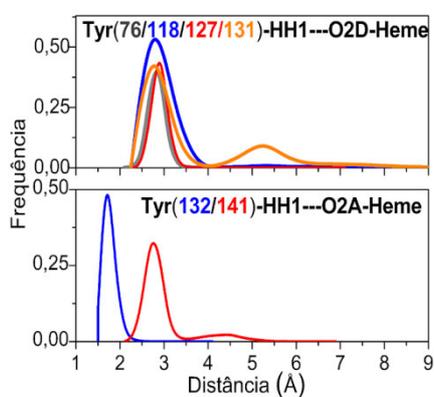
A



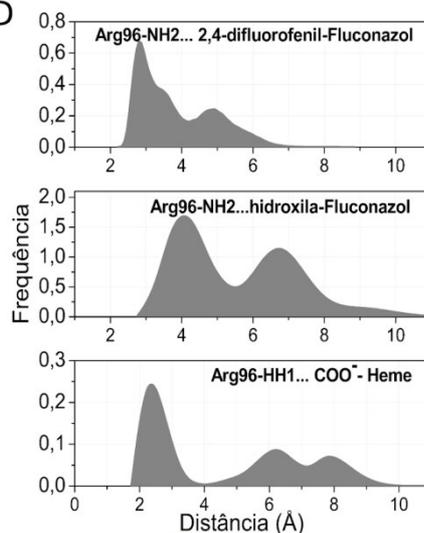
B



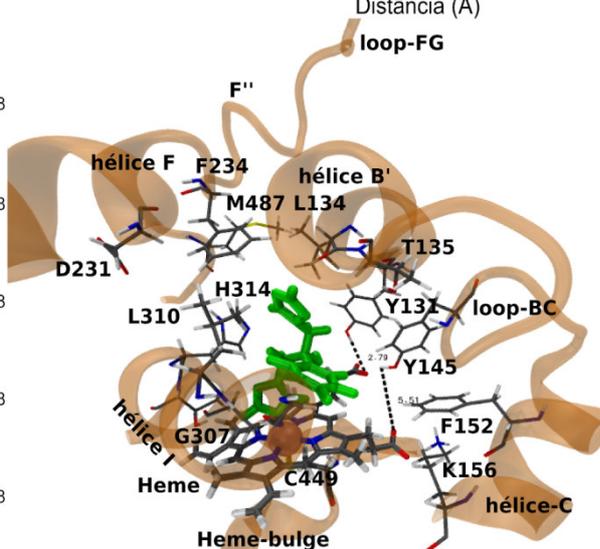
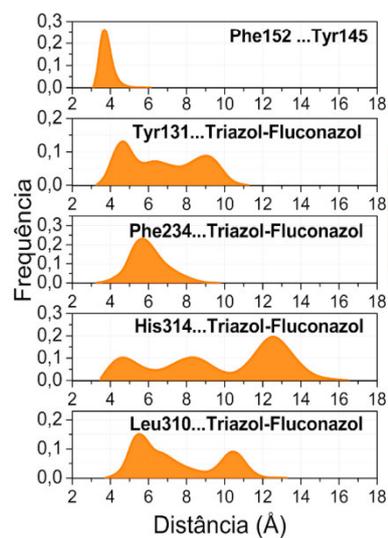
C



D



E



■ *Mycobacterium tuberculosis* ■ *Candida albicans* ■ *Candida glabrata* ■ *Homo sapiens*

Figura 13 - Resíduos do sítio ativo e suas interações com o fluconazol. A) Resíduos pertencentes ao sítio ativo de acordo com os modelos cristalográficos. Uma diferença importante entre as enzimas fúngicas e os ortólogos de Mt e Hs ocorre na posição Arg96/Leu139/Leu148/Phe152. B) Resíduos em contato com o fluconazol que durante as simulações apresentaram diferentes perfis de interação com o ligante. C) Distâncias de Tyr76/118/127/131 e Phe89/Tyr132/141/145 em relação aos átomos de carboxilato dos grupos HEME, que competem com as interações polares com o ligante. D) Interações de Arg96 de CYP51-Mt com o ligante e com os carboxilatos do HEME. Essas interações polares são exclusivas da enzima micobacteriana. E) Interações no sítio de ligação no CYP51-Hs: ocorre uma interação persistente entre os resíduos Tyr145 e Phe152; e os resíduos Tyr131, Phe234, His314 e Leu310 formam interações esporádicas, mas importantes com o fluconazol.

No segundo painel da Figura 13C, vemos que o resíduo de Tyr132 de CYP51-Ca forma uma ligação de hidrogênio com o grupo propionato do Heme que o distingue do seu modo de ligação em CYP51-Cg. O resíduo correspondente na CYP51-Mt é a F89, para o qual não se observou contato com o ligante ou com o grupo heme, mas no ortólogo humano, o resíduo correspondente Y145 interage com o ligante como em CYP51-Cg.

Finalmente, o resíduo Arg96 em CYP51-Mt, que é a diferença mais importante entre as quatro enzimas e é bastante dinâmico. O resíduo de R96 forma fortes interações polares com o grupo difluorofenil e com o grupo hidroxila do fluconazol. Também forma esporádicas interações do tipo ligação de hidrogênio com os grupos propionatos do Heme, como mostra a Figura 13D. Este resíduo de arginina é localizado na hélice C e proximidade do loop BC. Conforme determinado na seção anterior, o loop BC é reconhecido como uma das regiões mais móveis de CYP51-MT, o que resulta no seu comportamento dinâmico observado aqui. Portanto, a presença do resíduo carregado Arg96, onde enzimas fúngicas e humana apresentam um homólogo hidrofóbico, conduz a uma maior flexibilidade e interações polares adicionais no sítio ativo de CYP51-Mt.

Em resumo, a análise das interações específicas de resíduos do sítio de ligação com o ligante indica que interações adicionais ligante-proteína estão presentes nos ortólogos de CYP51-Hs e CYP51-Mt. Isto é aparentemente contra-intuitivo, uma vez que a afinidade do fluconazol pelas enzimas fúngicas é maior, de tal forma que poderia-se esperar encontrar interações proteína-ligante aumentadas nestas proteínas. No entanto, como iremos demonstrar,

importantes interações ligante-HEME são determinantes para as afinidades de ligação. As interações adicionais proteína-ligante nas enzimas humanas e micobacterianas, em vez de contribuírem para aumentar a afinidade de ligação, resultam do aumento da flexibilidade do sítio ativo e ocorrem à custa das interações do ligante com o HEME. Essas diferenças nas energias e flexibilidades de interação podem estar associadas às afinidades diferenciais observadas experimentalmente, como iremos discutir adiante.

3.1.4 - A energia de interação entre o fluconazol e ortólogos de CYP51

Os perfis das energias de interação (*não-ligada*) do fluconazol com o ambiente obtidas das simulações de MD neste trabalho indicam que a energia de interação total fluconazol-ambiente é mais favorável para CYPs fúngicos do que para micobactérias e humanos, conforme mostra a Figura 14A. As distribuições das energias indicam que há essencialmente dois padrões de interação de ligação: o fluconazol interage com o ambiente com uma energia média de -75 kcal/mol para as enzimas fúngicas, ou com uma energia de interação média de -60 kcal/mol para os ortólogos humano e micobacteriano.

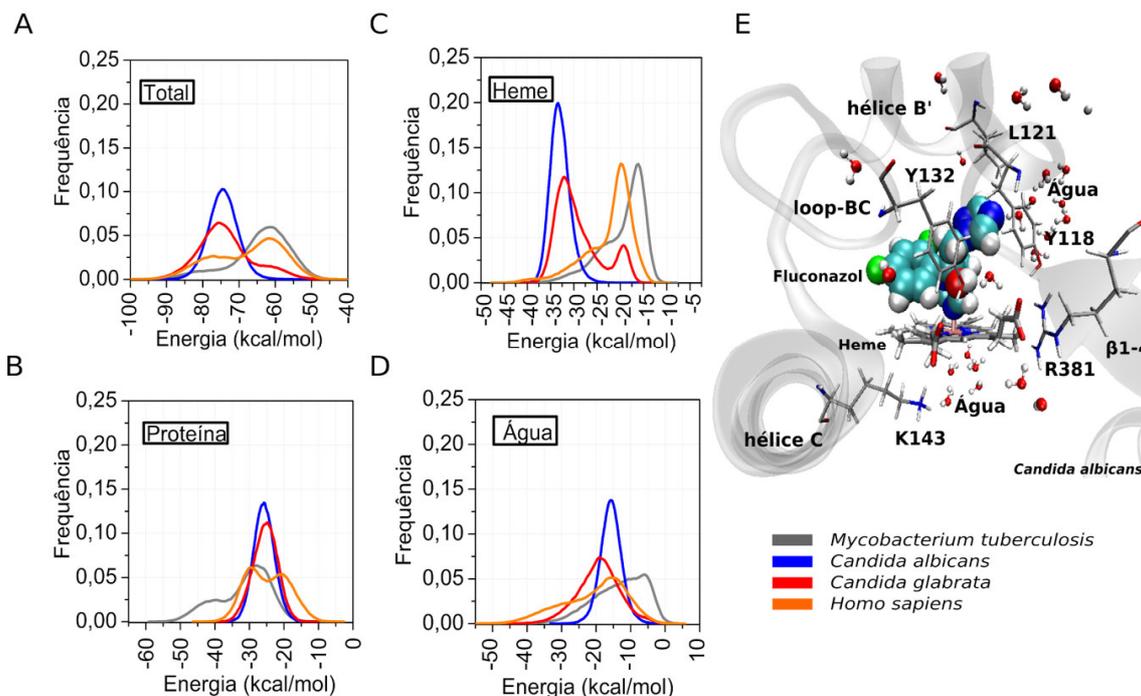


Figura 14 - Energias de interação entre o fluconazol e os componentes dos sistemas: A) Interações ligante-ambiente total. B) Interações ligante-proteína. C) Interações ligante-HEME. D) Interações ligante-água. E) Representação do sítio de ligação do CYP51-Ca que apresenta o ingresso de moléculas de água no sítio ativo na região próxima do loop BC, que compensa parcialmente as interações ligante-proteína mais fracas em relação a CYP51-Mt e CYP51-Hs, mas que levam à desestabilização da ligação.

Adicionalmente verificou-se que as energias de interação proteína-fluconazol são mais favoráveis em CYP51-Mt (Figura 14B), como esperado pela presença dos resíduos polares adicionais presentes neste sítio de ligação. Isto é consequência direta das interações do ligante com resíduos polares contidos no sítio de ligação de CYP51-Mt que não estão presentes em enzimas de fungos e humana, especificamente o resíduo R96. O fluconazol em CYP51-Mt interage com os resíduos da proteína alternando entre dois modos de ligação, um de baixa energia, e um modo de ligação de alta energia que imita suas interações com as enzimas fúngicas e humanas. As interações ligante-proteína de baixa energia atingem o pico em cerca de -42 kcal/mol, e no modo de alta energia elas atingem um pico em torno de -25 kcal/mol, tal como mostrado na Figura 14B. Assim, os modos de ligação diferem em cerca de 17 kcal/mol do ponto de vista das interações proteína-ligante. As energias de interação do ortólogo humano com o ligante são, em média, similares às das enzimas fúngicas. No entanto, os modos de ligação não são os mesmos, e isso pode ser inferido a partir do perfil de energia de interação (Figura 14B): para o ortólogo humano, dois modos de ligação competem uns com os outros com energias de interação ligante-proteína de -30 e -20 kcal/mol, enquanto que para enzimas fúngicas é observado um modo de ligação único com energias de -25 kcal/mol.

Portanto, por diferentes razões estruturais, a ligação do fluconazol aos ortólogos humano e micobacteriano é mais variável do que observado nas enzimas fúngicas. Em ambos os casos, o ligante perde interações com o HEME, como mostrado na Figura 14C. Novamente, dois modos de ligação são observados. Um modo de ligação de baixa energia com pico de aproximadamente -27 kcal/mol e um modo de alta energia de ligação com pico de aproximadamente -20 kcal/mol. O ligante em CYP51-Mt e CYP51-Hs habita mais frequentemente o modo de interação de alta energia, enquanto nas enzimas fúngicas ele preenche principalmente o modo de baixa energia (embora

em CYP51-Cg também seja encontrado um pico na região de alta energia). A diferença energética entre esses dois modos de ligação compensa quase exatamente a diferença de energia das interações proteína-ligante no caso de CYP51-Mt, indicando que essas interações são competitivas. Por conseguinte, as interações proteína-ligante ou ligante-HEME não podem ser utilizadas independentemente como indicadores da afinidade relativa do ligante às enzimas ortólogas avaliadas aqui.

As energias totais de interação (*não-ligadas*) do ligante são favoráveis para as enzimas fúngicas, como mostrado na Figura 14A. As interações do ligante com o HEME são determinantes para essas diferenças, embora sejam desestabilizadas por diferentes mecanismos nas enzimas humanas ou micobacterianas. No CYP51-Hs, a maior flexibilidade dos resíduos que compõem o sítio de ligação permite a entrada de água no bolso de ligação, e essas moléculas de água interagem efetivamente com o ligante, como mostrado na Figura 14D. Mais especificamente, as interações ligante-água exibem uma região de baixa energia em CYP51-Hs que não está presente em enzimas fúngicas. Essas moléculas de água interagem com o anel triazólico do fluconazol por ligações de hidrogênio. Essas interações compensam apenas parcialmente a perda de interações ligante-HEME em relação às enzimas fúngicas.

As interações ligante-água e ligante-Heme são mais fracas em CYP51-Mt e em conjunto explicam a mais baixa energia total (ligante-ambiente) em CYP51-Mt. Conforme ilustrado na Figura 14E, várias moléculas de água estão presentes no sítio de ligação dos CYP51s fúngicos, e formam interações hidrofílicas com o fluconazol.

As energias de interação do fluconazol com o ambiente são, portanto, mais favoráveis em enzimas fúngicas do que em CYP51-Mt e CYP51-Hs, consistentemente com as afinidades observadas experimentalmente. Esta vantagem energética resulta de uma intrincada competição de interações ligante-proteína, ligante-água e ligante-HEME. De modo que as interações ligante-Heme foram determinantes para a ligação mais forte ao fluconazol nas enzimas fúngicas.

Para sustentar a hipótese de que uma análise estrutural da 'pose' da ligação do ligante nas estruturas cristalográficas é suficiente para determinar as afinidades relativas, obtivemos estimativas de afinidade independentes usando

docking molecular. As pontuações de ancoragem foram -8,707 kcal/mol para CYP51-Mt, -8,100 kcal/mol para CYP51-Hs, -8,780 kcal/mol para CYP51-Cg e -9,112 kcal/mol para CYP51-Ca, respectivamente, conforme Tabela 7. Portanto, os escores de docking são qualitativamente consistentes com os resultados experimentais e com as energias de interação das simulações: a afinidade é maior para enzimas fúngicas e particularmente para CYP51-Ca.

É interessante notar que as poses mais importantes do docking estão associadas às conformações do ligante observadas nas simulações para todos os ortólogos de CYP51 avaliados aqui, exceto para o ortólogo de CYP51-Cg. A conformação de encaixe ótima para CYP51-Ca apresentou um RMSD em relação à conformação cristalográfica de apenas 1,125Å, consistentemente com a estabilidade dessa pose observada nas simulações. Em CYP51-Mt, observou-se também uma pose de encaixe correspondente à conformação cristalográfica. Entretanto, este modo de ligação, embora tenha sido observado nas simulações, não foi o mais frequentemente amostrado (Figura 12F). Finalmente, no ortólogo humano o ligante amostrou principalmente uma conformação com desvio de ~1,7Å da posição cristalográfica (Figura 12F), que é consistente com a conformação da pose do *docking* mais favorável encontrada.

Tabela 7 - Resultados do docking molecular do fármaco fluconazol em ortólogos da enzima CYP51 e afinidades experimentais.

CYP51	Energia Total (kcal/mol)	Energia Intermolecular (kcal/mol)	RMSD (Å)	Score (kcal/mol)	Kd exp
Homo sapiens	-0.432	-28.036	1.707	-8.100	30.5 μ M ⁶⁷
Mycobacterium tuberculosis	-2.441	-33.675	1.189	-8.708	10 μ M ^{39,68}
Candida glabrata	-3.775	-32.676	2.410	-8.780	-
Candida albicans	-11.898	-38.482	1.125	-9.112	56 nM ⁶⁷

Nota: Energia Total - Corresponde à energia de interação intermolecular ligante-receptor + intramolecular do ligante; Energia Intermolecular - Corresponde à energia intermolecular ligante-receptor, e o valor do RMSD mostrado é relativo à conformação cristalográfica do fluconazol. Kd é a constante de dissociação do ligante obtida experimentalmente.

3.1.5 - Discussão geral

As diferenças de afinidade do fluconazol em ortólogos de CYP51 presentes em *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Homo sapiens* são correlacionadas com as energias de interação do ligante com o ambiente. Estas diferenças podem ser associadas com a maior flexibilidade dos loops na região das hélices B' e C em CYP51-Mt e nas imediações das hélices F, G e H em CYP51-Hs, CYP51-Ca e -Cg. No entanto, estas diferenças estruturais de flexibilidade não resultaram em ausência de interações proteína-ligante, mas em uma competição das interações do ligante com a proteína, o grupo heme e as moléculas de água.

O fluconazol parece interagir mais fortemente com os átomos de proteína na enzima micobacteriana, simplesmente porque ela contém um resíduo carregado adicional no seu sítio de ligação (Arg96). No entanto, estas interações polares adicionais não se correlacionaram com uma efetiva estabilização do ligante, porque estas substituem as interações ligante-HEME e ligante-água das enzimas fúngicas. O ortólogo humano apresenta também interações ligante-ambiente menos favoráveis, consistentemente com as afinidades observadas. No entanto, neste caso, a desestabilização da ligação do fluconazol está associada à entrada de água no bolso de ligação, resultante de sua maior flexibilidade. Essas moléculas de água competem, como no CYP51-Mt, com interações ligante-HEME.

As maiores flexibilidades conformacionais do loop BC em CYP51-Mt e CYP51-Hs resultam em um considerável desvio da conformação cristalográfica do fluconazol no sítio de ligação destas enzimas. Além disso, esse loop é responsável pela existência de uma cavidade de escape adicional em CYP51-Mt.

Entre as enzimas fúngicas, a diferença de interação mais proeminente é a dos resíduos Tyr132/Tyr141 (Figuras 12B e 12C). A interação polar deste resíduo na CYP51-Ca é mais estável que na CYP51-Cg, pelo menos dentro da precisão das simulações realizadas. Essa diferença pode ser explorada para o desenvolvimento de inibidores de maior especificidade, pois a variante CYP51-Cg parece ser capaz de acomodar radicais ligeiramente maiores na posição do anel triazólico. Nesta mesma posição, o resíduo correspondente em CYP51-Mt

é uma Fenilalanina que não entra em contato com o ligante, reforçando assim que esta posição é um local potencial para explorar a variabilidade estrutural do ligante.

3.2 - Base molecular da resistência ao inibidor fluconazol em mutantes de Esterol 14 α -desmetilase-CYP51 de *Candida albicans*.

Mutações no gene ERG11, que codifica a enzima CYP51 de *Candida albicans*, alteram a capacidade do fluconazol de inibir a atividade desta enzima resultando em um aumento de resistência^{73,76,125,126}. Neste estudo avaliou-se teoricamente a influência de quatro substituições de aminoácidos: Y132F, Y132H, K143R e S405F, em diferentes locais do bolso de ligação, conforme ilustra a Figura 15. Na Tabela 8 são reportados alguns trabalhos experimentais nos quais as presentes mutações foram evidenciadas em isolados de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol.

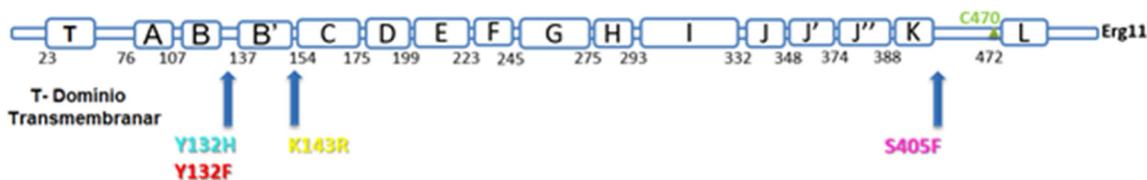


Figura 15 – Sequência do gene Erg11 que codifica a enzima Esterol 14 α -desmetilase de *C.albicans*. As mutações em cepas resistentes ao fluconazol encontradas experimentalmente estão indicadas por setas. A estrutura secundária está indicada por α -hélices nomeadas por letras de A até L. Também é visualizado o quinto ligante do heme, o resíduo de cisteína C470 e a α -hélice transmembranar T.

Tabela 8 - Mutações encontradas em isolados de espécies de *Candida albicans* associadas a resistência e aumento da concentração mínima inibitória (MIC) do quimioterápico fluconazol.

Mutação Erg11	Referência Bibliográfica	Nota
Y132F	12,67,77,128,138	Associada com resistência. Aumenta significativamente o MIC do fluconazol.
Y132H	60,67,76,126,129,130,136,137,138	Associado com resistência. Responsável por um aumento de 4 vezes no MIC do fluconazol. Efeito cumulativo com S405F.
K143R	60,127,131-134,138	Associado com resistência. Responsável por um aumento de 64 vezes no MIC de fluconazol.
S405F	60,127,130,132,135	Associado com resistência. Responsável por um aumento de 4 vezes no MIC do fluconazol. Efeito cumulativo com Y132H.

Nota: A sensibilidade de *Candida albicans* ao quimioterápico fluconazol é representada pela concentração inibitória mínima (MIC), que corresponde à menor concentração do fluconazol capaz de inibir o seu desenvolvimento e crescimento visível.

3.2.1 - Análise comparativa dos aspectos estruturais e dinâmicos da inibição da atividade catalítica em mutantes de CYP51 de *Candida albicans*.

Com o intuito de verificar as implicações que as alterações de resíduos de aminoácidos têm sobre a mobilidade da estrutura global da enzima P450 14- α -desmetilase-CYP51 de *Candida albicans*, algumas propriedades estruturais foram calculadas. Os diferentes complexos simulados foram monitorados quanto a seus desvios médios quadráticos das posições atômicas (RMSD) e média das flutuações quadráticas (RMSF) em função do tempo de simulação conforme equação 14. Tais parâmetros nos fornecem informações sobre a estabilidade estrutural e sobre as mudanças conformacionais que podem vir ocorrer ao longo de uma trajetória de MD.

$$RMSD(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(r'_i(t_i) - r_i(t_{ref}))]^2}{N}} \quad RMSF = \frac{1}{N} \sum_i \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^T [(r'_i(t_i) - r_i(t_{ref}))]^2}{T}}$$

Onde N é o número de átomos considerados na seleção; t_{ref} é o tempo de referência (geralmente o primeiro frame é usado como referência ($t = 0$)); t_i corresponde ao frame que está sendo analisado, $r'_i(t_i)$ é a posição do átomo selecionado no instante t_i , após superposição com a estrutura de referência,

onde o frame r_i é registrado no tempo t_{ref} . O procedimento é repetido para cada frame na trajetória de simulação. No cálculo do RMSF, T é o tempo total de simulação e a estrutura de referência é a estrutura média da proteína retirada da simulação.

Também foram avaliados os parâmetros estruturais como o raio de giro (Rg) e o número de contatos nativos, como indicativos de como a estrutura da proteína varia no tempo em relação a estrutura cristalográfica. O raio de giro é definido como uma média ponderada da distribuição das massas atômicas em relação ao centro de massa da proteína, mede a "compactação", nos fornecendo uma estimativa da variação do tamanho da proteína durante as simulações de MD, conforme equação 15.

$$R_g(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [r_i(t) - r_{CM}]^2}{N}} \quad (15)$$

Onde N é o número de resíduos considerados, $(r_i(t))$ são as coordenadas do resíduo i representados neste caso, pelos carbonos α da enzima no tempo j e r_{CM} é o centro de massa da enzima.

Por sua vez, o número de contatos nativos nos dá uma estimativa do número e grau de preservação das interações entre resíduos que existem na estrutura cristalográfica da proteína. Os contatos de uma enzima são obtidos a partir de um critério de contagem. Um par de resíduos é dito em contato se a distância entre os seus carbonos- α for menor que 7Å e se estiverem a uma distância maior que três resíduos na sua sequência primária. No cálculo de contatos nativos verifica-se se a contagem obtida da estrutura de referência, no caso a estrutura cristalográfica é mantida em cada passo da simulação, conforme mostram a Figura 16A e Tabela A5, em Anexo.

A superfície acessível ao solvente (SASA) também foi monitorada com o intuito de estimar a hidratação desta enzima na sua forma nativa e das estruturas mutadas. O cálculo da área de superfície acessível ao solvente de uma enzima foi obtido considerando os seus átomos como esferas rígidas com raios de Van der Waals, e verificando onde é possível "encaixar" uma molécula de solvente, neste caso, água com um raio de 0,14nm de formato esférico pela sua superfície, conforme mostram a Figura 16B e a Tabela A5, em anexo.

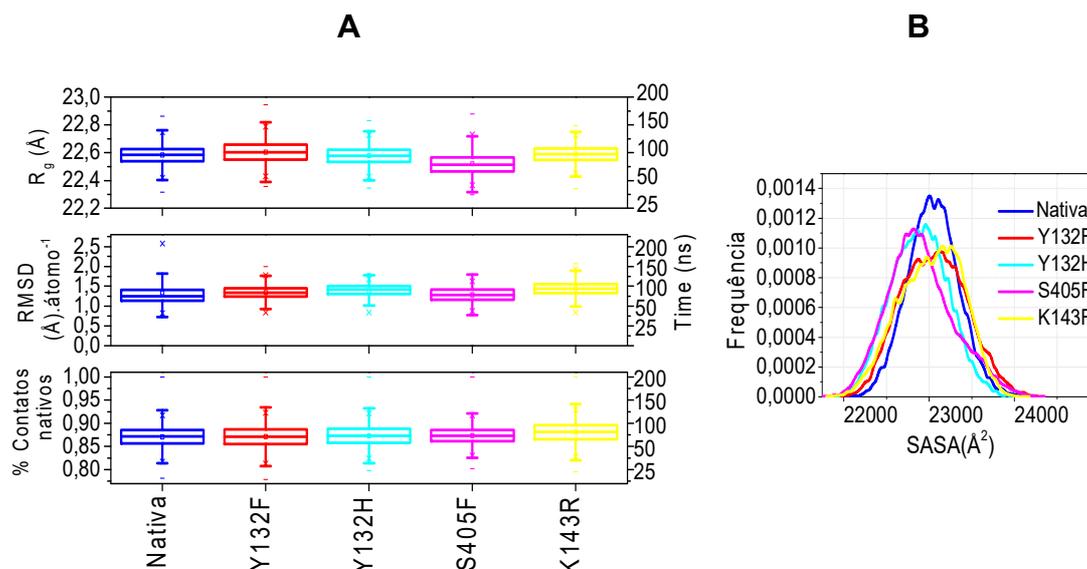


Figura 16 - Análise comparativa das propriedades estruturais RMSD, Raio de giro, Contatos nativos em (A) e área de superfície acessível ao solvente (B) entre a estrutura nativa e mutantes de CYP51 de *Candida albicans*.

A avaliação destas propriedades estruturais nos mutantes de CYP51 de *Candida albicans* revelaram pequenas variações em relação à estrutura cristalográfica. De forma geral, o cálculo dessas propriedades nos indicaram a conservação global de sua estrutura molecular e a estabilidade dos complexos simulados. Além disso, constatou-se que as alterações de aminoácidos desempenharam um papel na hidratação de CYP51-Ca evidenciada pela ligeira redução da superfície acessível ao solvente nos mutantes S405F e Y132H e pela sutil diminuição na compactação desta enzima no mutante S405F. Isto sugere que estes efeitos possam contribuir para o entendimento da mais baixa afinidade ao quimioterápico fluconazol em mutantes de CYP51-Ca.

No âmbito das simulações de MD realizadas neste estudo constatou-se a partir da avaliação do RMSF que a estrutura nativa de CYP51-Ca apresenta uma alta mobilidade estrutural nas regiões dos loops FG, GH e nas regiões próximas a hélice K e β 5-hairpin. No entanto a sua maior variabilidade conformacional em relação às estruturas mutantes reside nas regiões C-terminal da hélice K (425-435) e β 5-hairpin (435-440), tal como mostrado no primeiro painel, em azul, da Figura 17A. Verificou-se especificamente que essas regiões se apresentaram mais rígidas principalmente nos mutantes Y132H (linha ciano) e S405F (linha magenta) fato evidenciado pela ligeira redução dos valores de RMSF.

A substituição de uma Y na posição 132 por uma F (Y132F) e por uma H (Y132H) induziram uma maior diversidade conformacional nas regiões dos loops FG e GH. De modo similar, a substituição de uma Lys na posição 143 por uma Arg (K143R) induziu uma mobilidade notável nas regiões dos loops FG e GH em relação às estruturas nativa e mutante S405F. Verificou-se também em K143R uma perceptível mobilidade na região do β 5-hairpin entre os resíduos (440-450), hélice J (340-345) e na região do bolso de ligação do grupo heme, denominado de *heme-bulge*, conforme mostrado na linha em amarelo da Figura 17A. Y132F, Y132H também apresentaram uma considerável variabilidade conformacional na região do *heme-bulge*, embora em menor intensidade.

Os resíduos 132 (*nB'*) e 143 (hélice C) compõem a cavidade do bolso de ligação do fluconazol em CYP51-Ca e promovem suporte adicional ao centro catalítico de CYP51, o grupo Heme. Além disso, diversidades conformacionais nas regiões das hélices B', C e loops FG (canal de acesso ao substrato de CYP51-Ca) e GH são vistas por influenciar a abertura ou fechamento do canal de acesso ao substrato/inibidor no sítio catalítico de CYP51-Ca, portanto, a priori quaisquer alterações nessas posições podem influenciar a dinâmica da enzima e afetar sua afinidade ao fluconazol.

Em contrapartida, o resíduo 405 (β 1-3) se localiza fora do bolso de ligação do fluconazol em CYP51-Ca. A substituição de uma Ser na posição 405 por uma Phe, portanto, pode ou não afetar diretamente a afinidade do fluconazol ao sítio de ligação de CYP51-Ca. Conforme observado no último painel da Figura 17A, em magenta, verificou-se que S405F promoveu uma significativa redução na mobilidade da estrutural global de CYP51-Ca em contradição com as demais estruturas avaliadas.

De modo geral, verificou-se que as mutações avaliadas alteraram distintamente a flexibilidade estrutural de CYP51-Ca. Pequenas variações nas regiões da cavidade do bolso de ligação do fluconazol (hélices B', C; loops FG, GH; *heme-bulge*) e até mesmo em regiões proximais a superfície de CYP51-Ca (β 5-hairpin) foram verificadas. Fato também comprovado pelos distintos valores de RMSD e respectivas conformações I, II e III amostradas pelo fluconazol nas simulações de MD, conforme mostrado na Figura 17C.

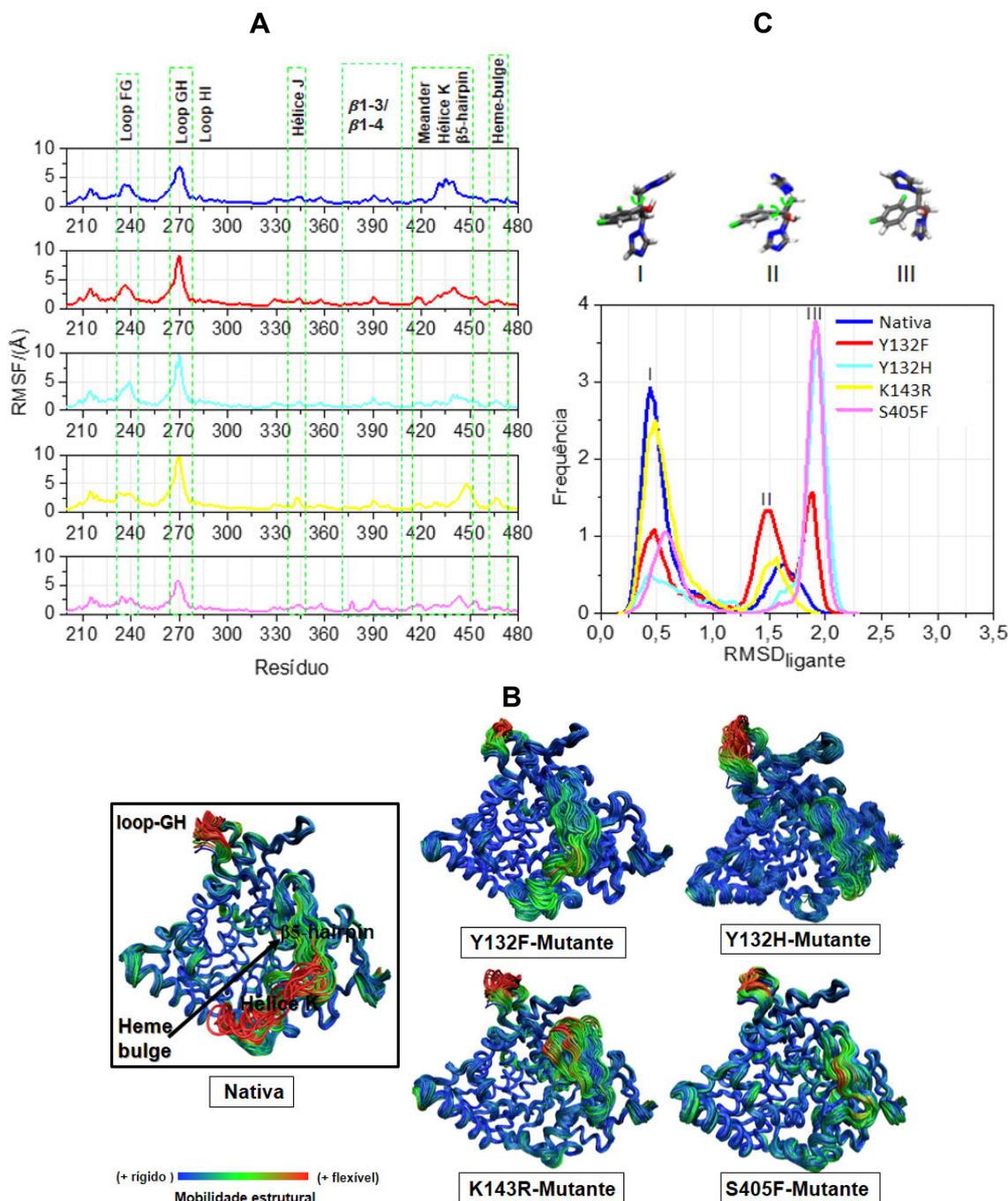


Figura 17 - Análise comparativa das propriedades dinâmicas: flutuações da média da raiz quadrada - RMSF entre a estrutura nativa e mutantes de CYP51-Ca em relação aos resíduos (210 a 480) em (A); Diversidade conformacional do ligante Fluconazol amostrados em simulações de MD ao longo de 200 ns da enzima CYP51 nativa e mutantes (Y132F, Y132H, K143R e S405F) de *Candida albicans* é mostrada em (B); Flutuações estruturais das estruturas de nativa e mutantes (Y132F, Y132H, K143R e S405F) de *Candida albicans* é mostrada em (C). Regiões de menor flexibilidade são mostradas em azul, e regiões de maior flexibilidade são mostradas em vermelho.

A conformação I corresponde à cristalográfica e foi amostrada em todas as simulações avaliadas aqui. Enquanto na estrutura nativa e K143R de CYP51-

Ca a conformação I foi a mais frequentemente amostrada, nos mutantes Y132H e S405F a conformação III foi preponderante. A conformação III difere em cerca de 1.5Å da cristalográfica e é caracterizada pelas rotações combinadas dos anéis triazólico e difluorofenil. Neste confôrmero, especificamente, foi verificada uma leve inclinação da molécula na região do sítio de ligação. A conformação II difere em ~1.0Å da estrutura cristalográfica do fluconazol e resulta da rotação de um dos anéis triazólico. A conformação II foi comumente amostrada nas estruturas avaliadas à exceção da estrutura S405F. Em Y132F as três conformações do fluconazol I, II e III foram exclusivamente amostradas.

3.2.2 - Aspectos gerais da inibição da atividade catalítica em mutantes de CYP51 de *Candida albicans*

A caracterização estrutural da cavidade do sítio de ligação de CYP51-Ca em relação a família CYP51 do citocromo P450, de modo geral, revelou que CYP51 apresenta resíduos de tirosina nas posições 132 (*nB'*) e 118 (hélice B), Leu121 na (hélice B') (assinatura $\alpha B'$) e Lis143 na hélice C conservados em CYP51 fúngicos. Os resíduos de Tyr132 e Tyr118 e Lis143 proporcionam um suporte adicional ao grupo heme no sítio de ligação destas enzimas, uma vez que os mesmos estabelecem ligações de hidrogênio com os grupos propionatos A e D do heme. O resíduo de tirosina na posição 132 e de lisina na posição 143 de *Candida albicans*, em região proximal do grupo heme têm sido descritos na literatura por causar variados graus de atividade e perda seletiva de atividade em CYP51-Ca^{119,128,136,137}. Acredita-se, a priori, que possíveis alterações no modo de ligação com o grupo heme, comprometa ou inviabilize a transferência de elétrons com o seu parceiro redox citocromo P450 redutase NADPH-CYP-P450, podendo resultar em perda/redução da atividade enzimática de CYP51.

O sítio de ligação do substrato, lanosterol, em CYP51-Ca é composto pelos seguintes resíduos conservados. H310 e Gly308 na Hélice I (assinatura αI), Leu376 (loop entre a Hélice K/ $\beta 1-4$), Met508 ($\beta 4$ -hairpin) e Cys470 (*heme-bulge*), os quais estão envolvidos no mecanismo de ação enzimático de CYP51. Sendo, portanto, determinantes na bioatividade de CYP51-Ca.

Com o intuito de explorar os estados de ligação em relação ao quimioterápico fluconazol e ao grupo heme realizou-se o cálculo da fração de

tempo de simulação em que cada resíduo do sítio ativo de CYP51 permanece em contato com os anéis triazólico e difluorofenil do fluconazol. Também foi quantificada a fração de tempo de simulação em que os resíduos de tirosina nas posições 118 e 132 permanecem em contato com o grupo heme. Os resíduos foram considerados em contato se a distância mínima entre qualquer um de seus átomos fosse menor ou igual a 4Å. Verificou-se que nove resíduos (Y118, L121, Y132, L139, F228, I304, M306, G308 e M508) estavam em contato com o fluconazol. A porcentagem de tempo dessas interações e que ocorreram em mais de 10% nas simulações em Y132F e Y132H é mostrada na Figura 18, em K143R na Figura 19 e S405F na Figura 20.

3.2.2.1 - *Mutantes Y132F e Y132H*

A alteração no resíduo de tirosina 132 (Y132F/H) impossibilitou a existência de uma ligação de hidrogênio estável com o grupo propionato do heme e, em vez disso, as cadeias laterais de fenilalanina e histidina interagiram com o ligante e o heme através de interações moleculares relativamente mais fracas. As diferenças mais notáveis nos modos de interação do fluconazol entre a estrutura nativa e mutantes (Y132F e Y132H) passíveis de ter influência na sua afinidade com a enzima CYP51 foram encontradas nos resíduos de Leu121 (hélice B') e Leu139 na hélice C, Phe228 localizada na hélice F, Ile304, Met306 e Gly308 localizados na hélice I e Met508 na β 4-hairpin conforme mostrado no gráfico da Figura 18A. De acordo com as simulações de MD o fluconazol apresentou três conformações distintas no sítio de ligação da estrutura de Y132F (linha vermelha na Figura 17C). De modo geral, o fluconazol apresentou interações hidrofóbicas mais persistentes com os resíduos Leu139, Met306 devido às suas conformações II e III e ocasionalmente interações π - π *stacking* com o resíduo Phe228. Uma sutil perda de interação com o resíduo Gly308 também foi verificada na região da hélice I.

Na estrutura Y132H observou-se que o fluconazol adotou as conformações I e III (linha ciano na Figura 17C) e apresentou uma menor superfície acessível ao solvente (Figura 16B). Prevaleceram interações hidrofóbicas com os resíduos do sítio de ligação. Interações hidrofóbicas entre os resíduos Met306, Phe228, Met508 e o anel triazólico do ligante devido à

prevalência com a conformação III do fluconazol foram verificadas. Do ponto de vista de interações dos resíduos Tyr118 e Tyr132 com o grupo heme verificou-se que Y132H apresentou uma sutil perda de interações polares, principalmente com o grupo propionato A do heme (segundo painel da Figura 18A e 18D).

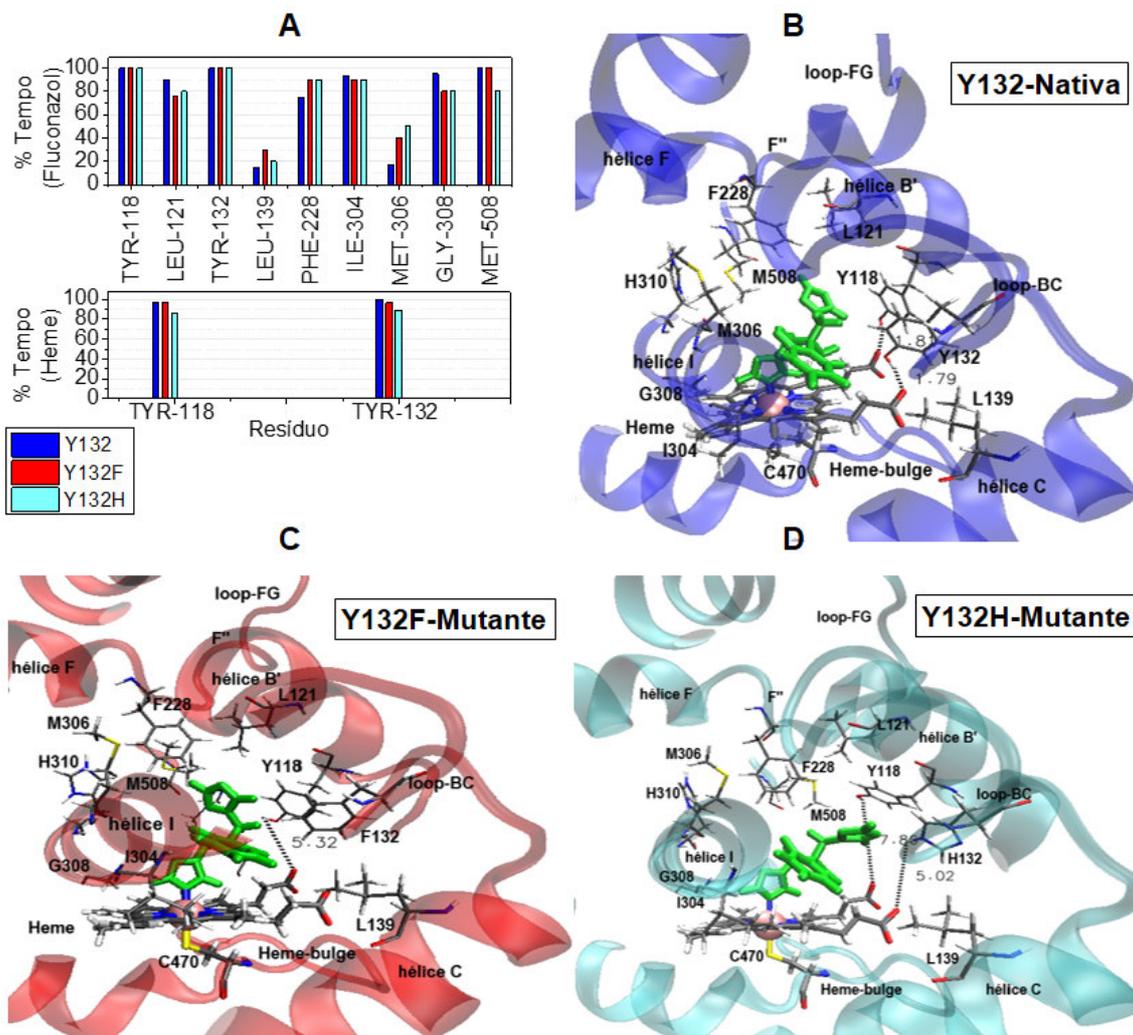


Figura 18 – Caracterização dinâmica das principais interações do quimioterápico fluconazol estabelecidas com os resíduos do sítio ativo de CYP51-Ca (nativa e mutantes: Y132/F/H a uma distância mínima de 4Å e que ocorreram em mais de 10% do tempo de simulação de MD. A avaliação da estabilidade das interações dos resíduos de tirosina em CYP51-Ca em relação ao grupo heme também foram avaliadas em (A); A representação das principais interações do fluconazol com os resíduos que compõem o sítio de ligação de CYP51-nativa (Y132) é mostrada em (B), Y132F em (C) e Y132H em D.

3.2.2.2 - Mutantes K143R e S405F

Em K143R, foram predominantemente amostradas as conformações I e II do fluconazol (linha amarela na Figura 17C). Verificaram-se interações hidrofóbicas mais persistentes com os resíduos Leu139 (hélice C) e Met306

(hélice I) e redução de interações hidrofóbicas com os resíduos conservados Leu121 e Tyr118 na hélice B' do tipo π -aquil e π - π stacking-com o anel triazólico do fluconazol, conforme mostrado na Figura 19.

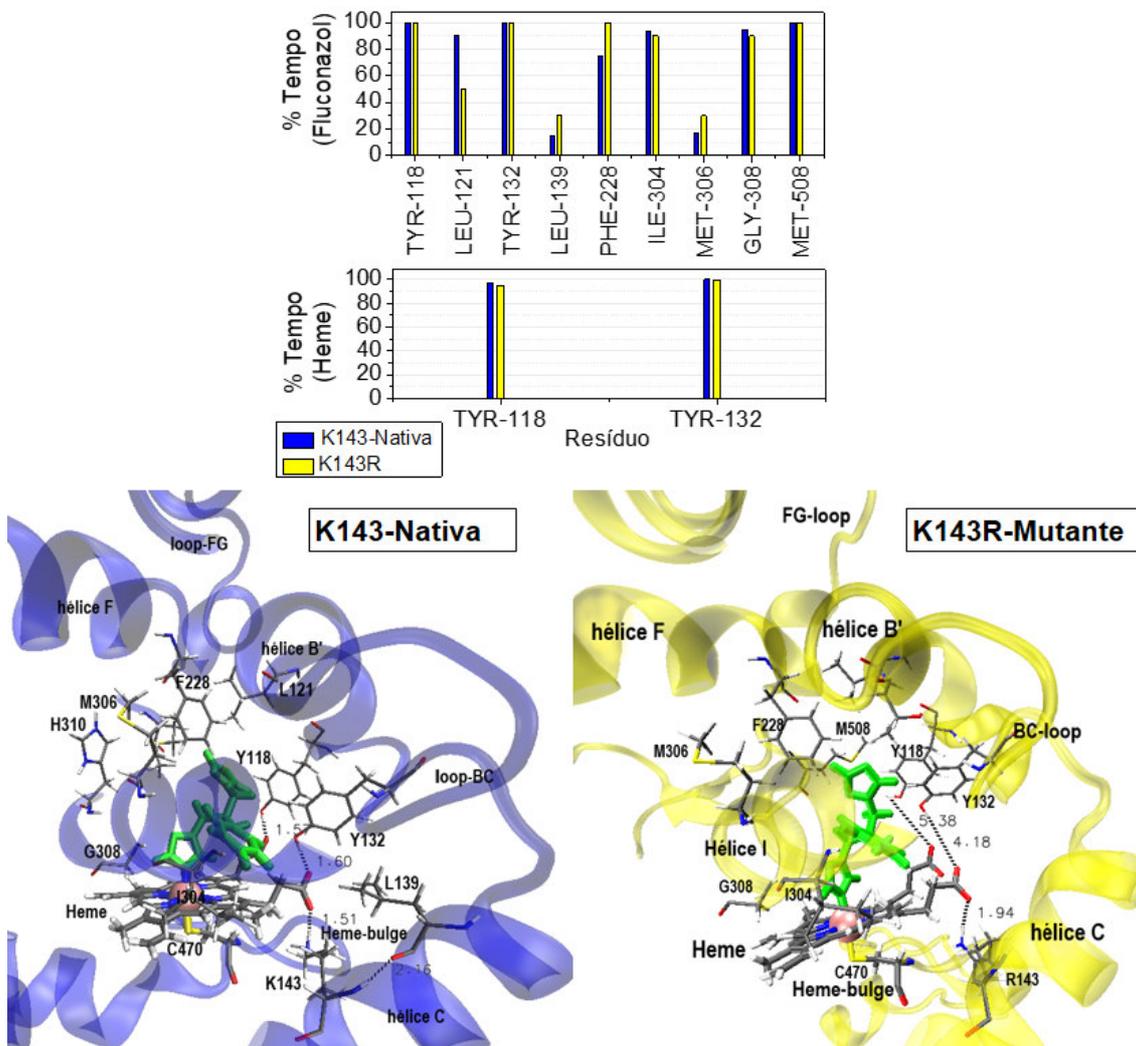


Figura 19 - Caracterização dinâmica das principais interações do quimioterápico fluconazol estabelecidas com os resíduos do sítio ativo de CYP51-Ca (nativa e mutante K143R a uma distância mínima de 4Å e que ocorreram em mais de 10% do tempo de simulação de MD. A avaliação da estabilidade das interações dos resíduos de tirosina em CYP51-Ca em relação ao grupo heme também foram avaliadas. A representação das principais interações do fluconazol com os resíduos que compõem o sítio de ligação de CYP51-nativa (a Esquerda) e mutante K143R (a direita) também podem ser visualizadas.

Notoriamente, o mutante S405F apresentou mobilidade reduzida quando comparada a da estrutura nativa e aos demais mutantes, conforme mostrado na Figura 17A. Observou-se que S405F apresentou uma certa rigidez estrutural, de modo que o modo de interação dos resíduos do sítio de ligação desta enzima

com a conformação III do fluconazol (linha magenta na Figura 17C) foram predominantemente amostradas. Acredita-se que a promoção da estabilização da estrutura de CYP51-Ca em S405F se deve a interações hidrofóbicas adicionais do grupo triazólico do fluconazol com os resíduos do sítio ativo Phe228 (hélice F) e proximidade do loop FG, Met306 (hélice I) e Leu139 (hélice C) com o grupo difluorofenil, conforme Figura 20).

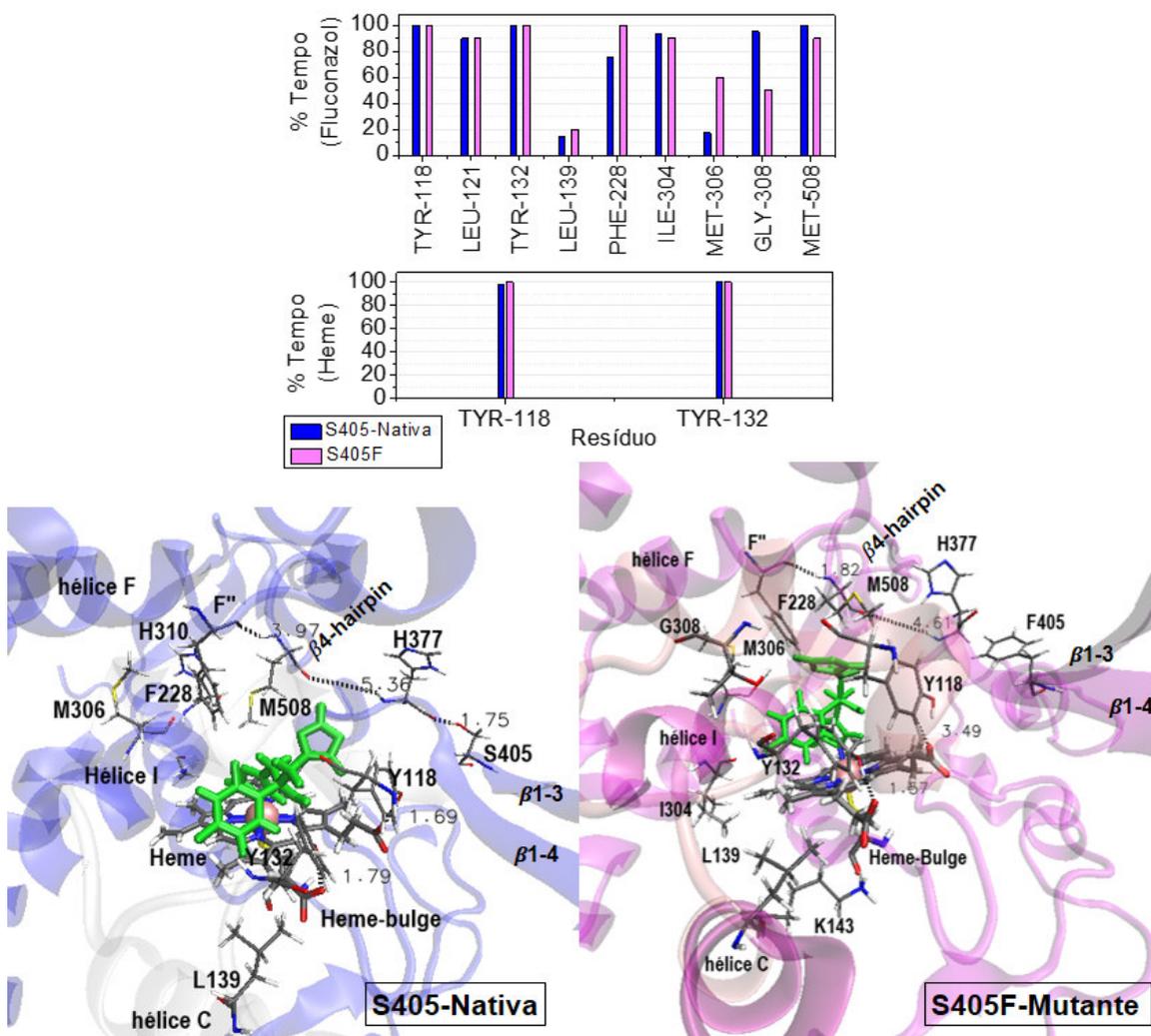


Figura 20 – Caracterização das principais interações do quimioterápico fluconazol estabelecidas com os resíduos do sítio ativo de CYP51-Ca (nativa e mutante S405F) a uma distância mínima de 4Å e que ocorreram em mais de 10% do tempo de simulação de MD. A avaliação da estabilidade das interações dos resíduos de tirosina em CYP51-Ca em relação ao grupo heme também foram avaliadas. A representação das principais interações do fluconazol com os resíduos que compõem o sítio de ligação de CYP51-nativa (a Esquerda) e mutante S405F (a direita) também podem ser visualizadas.

Observou-se em S405 a perda de uma ligação de hidrogênio estável entre S405 (β 1-3) e o resíduo H377 localizado na (β 1-4) enfraquecendo as interações

entre a β 1-3 e β 1-4 na estrutura de CYP51-Ca. Sugere-se também que a rigidez estrutural apresentada em S405F está associada à sua maior compactação e a sua menor superfície acessível ao solvente, observada em nossas análises estruturais (Figuras 16A e 16B respectivamente). A redução da cavidade do sítio de ligação desta enzima culminou com baixa mobilidade dos resíduos do sítio de ligação de CYP51-Ca. Conseqüentemente, limitou o acesso dos resíduos do sítio catalítico de CYP51-Ca a estados conformacionais de maior afinidade ao fluconazol em S405F. E também, limitou o acesso de moléculas de água até a região do sítio de ligação.

3.2.3 - Caracterização energética das interações entre mutantes de CYP51-Ca e o ligante fluconazol

Nesta seção a caracterização e a quantificação energética das interações entre o ligante fluconazol com o meio ambiente em mutantes da enzima CYP51 em *Candida albicans* serão apresentadas. Os perfis das energias de interação do fluconazol com o ambiente obtidos das simulações de MD neste estudo indicam que há essencialmente três padrões de interação do ligante com a enzima CYP51 de *Candida albicans*. O primeiro é observado na estrutura nativa e no mutante Y132F. Nestes, o fluconazol interage com energias médias de -75 kcal/mol e -73 kcal/mol, respectivamente. O segundo é característico do mutante K143R, com uma energia média de -66kcal/mol. Já o terceiro é característico dos mutantes Y132H e S405F e tem energias médias em torno de -55kcal/mol, conforme mostram a Figura 21 e a Tabela A6, em Anexo. Observou-se que as presentes mutações afetaram distintamente a afinidade de CYP51-Ca ao fluconazol, de modo que foi evidenciado um efeito compensatório entre interações com os resíduos proteicos, moléculas de água e principalmente com o grupo Heme.

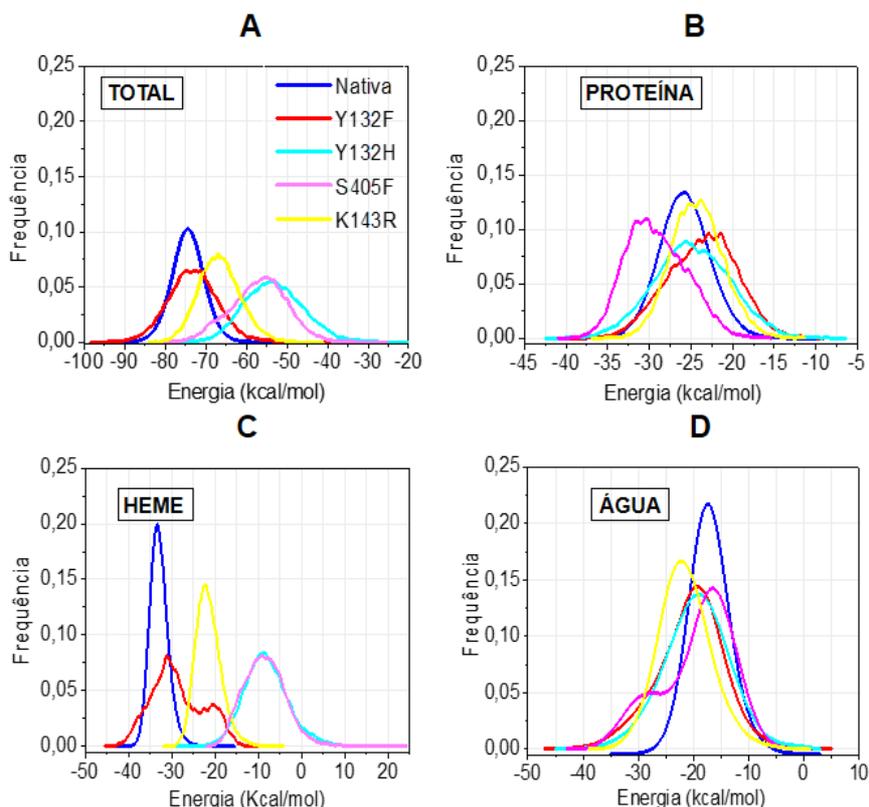


Figura 21 - Energias de interação entre o fluconazol e os componentes dos sistemas em CYP51-Ca nativa e os quatro mutantes. A) Interações ligante-ambiente total. B) interações ligante-proteína. C) interações ligante-HEME. D) interações ligante-água.

Verificou-se que as energias de interação proteína-fluconazol são mais favoráveis em S405F por cerca de -29 kcal/mol (Figura 21B). Isto é consequência da maior estabilidade de sua estrutura global conforme observado nas Figuras 16A e 17A. Em Y132F, Y132H e K143R, as energias de interação proteína-fluconazol são mais fracas que na estrutura nativa, conforme esperado. Por diferentes razões estruturais, a ligação do fluconazol aos mutantes de CYP51-Ca é mais variável do que observado em sua estrutura nativa. Em todas as estruturas avaliadas observou-se que o fluconazol perde interações com o grupo Heme, como mostrado na Figura 21C. Dois modos de ligação foram observados em Y132F um modo de baixa energia com pico em aproximadamente -29 kcal/mol, o qual se assemelha ao modo de interação frequentemente amostrado pela estrutura nativa (~ 33 kcal/mol) e um modo de alta energia com pico em aproximadamente -20 kcal/mol. Em K143R verificou-se um único modo de ligação com energia de -21 kcal/mol, semelhante ao modo de alta energia

observado em Y132F. Em S405F e Y132H também foi observado um único modo de ligação de alta energia porém, de ~ -8 kcal/mol

Em contrapartida, as energias de interação ligante-água são mais fracas na estrutura nativa de CYP51-Ca por cerca de -16 kcal/mol, conforme Figura 21D. Verificou-se que os complexos Y132F, Y132H e K143R apresentaram uma maior flexibilidade na região do canal de acesso ao sítio de ligação (loop FG e hélices B', C e F) em relação à estrutura nativa. A maior flexibilidade destas regiões foram vistas por influenciar a abertura deste canal e permitir a entrada de moléculas de água as quais interagem efetivamente com o fluconazol no bolso de ligação. Em S405F, no entanto, foram observados dois modos de interação. O modo de interação de alta energia foi preferencialmente amostrado e imita o modo mais rígido do sítio de ligação da estrutura nativa. Já o modo de mais baixa energia compensa apenas parcialmente a perda de interações ligante-heme.

Os diferentes padrões de interação entre o fluconazol e resíduos chave no sítio catalítico das estruturas mutantes de CYP51-Ca sugerem que as conformações 1 e 2 preferencialmente amostradas nos complexos da estrutura nativa, Y132F e K143R do fluconazol correspondem aos estados associados a maior afinidade ao fluconazol na estrutura de CYP51-Ca. A conformação 3 preferencialmente amostrada nos complexos Y132H e S405F corresponde aos estados de mais baixa afinidade ao fluconazol. As presentes observações nos levaram a deduzir que a força inibitória do quimioterápico fluconazol no sítio ativo da enzima nativa de CYP51-Ca é mais efetiva que nos mutantes, estando de acordo com as observações experimentais da Tabela 8.

Com o intuito de compreender as diferenças dos modos de ligação do fluconazol com o sítio de ligação de cada mutante de CYP51-Ca e estimar a sua energia de interação associativa com cada um destes sistemas, simulações de docking molecular também foram aplicadas. Os escores de docking indicam que o fluconazol deve se ligar menos favoravelmente aos mutantes de CYP51-Ca na seguinte ordem: CYP51-Ca nativa apresentou um (score= $-9,112$ kcal/mol) seguido de Y132F (score= $-8,408563$ kcal/mol); K143R (score= $-8,530$ kcal/mol); Y132H (score= $-8,489$ kcal/mol) e finalmente S405F (score= $-8,408$ kcal/mol), conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do docking molecular do quimioterápico fluconazol em mutantes da enzima CYP51 de *Candida albicans*.

CYP51-Ca	Energia Total (kcal/mol)	Energia Intermolecular (kcal/mol)	RMSD (Å)	Score (kcal/mol)
Nativa (<i>wild type</i>)	-11,898	-38,482	1,125	-9,112
Y132F	-13,515	-41,380	1,703	-8,563
Y132H	-11,295	-38,670	1,708	-8,489
K143R	-14,163	-41,331	1,679	-8,530
S405F	-12,179	-38,590	1,105	-8,408

Nota: Energia Total - Corresponde à energia de interação intermolecular ligante-receptor + intramolecular do ligante; Energia Intermolecular - Corresponde à energia intermolecular ligante-receptor, e o valor do RMSD.

As poses mais importantes do docking e suas respectivas pontuações obtidas neste estudo foram consistentes com as energias de interação (não ligadas) do fluconazol com o ambiente obtidas das simulações de MD. A conformação de ajuste mais favorável encontrada para a estrutura nativa de CYP51-Ca apresentou um RMSD de 1,125Å em relação à conformação cristalográfica, consistentemente com a estabilidade dessa pose observada nas simulações. Em S405F, observou-se também uma pose de encaixe correspondente à conformação cristalográfica, com RMSD de apenas 1,105Å. Todavia este modo de ligação, embora presente nas simulações, não foi frequentemente amostrado (Figura 17C). Já nos mutantes Y132F, Y132H e K143R as conformações de encaixe ótimas do fluconazol diferiram em cerca de ~ 1.7Å da conformação cristalográfica que é consistente com os modos de ligação amostrados nas respectivas simulações de MD. Entretanto, essas poses não correspondem ao modo de ligação do fluconazol mais frequentemente amostrado nas simulações (Figura 17C). Os resultados obtidos neste estudo, de toda forma, estão em concordância com os achados experimentais da mais baixa susceptibilidade a inibição em mutantes de CYP51-Ca ao fluconazol encontrados na literatura.

3.2.4 - Discussão geral

As mutações alteram a flexibilidade de CYP51 permitindo que o ligante adote diferentes conformações no bolso de ligação da enzima CYP51-Ca. Essas alterações estruturais são importantes para a compreensão da mais baixa afinidade ao fluconazol no sítio ativo das enzimas mutantes de CYP51-Ca em relação a estrutura nativa. Os diferentes padrões de interação entre o ligante fluconazol e os resíduos do sítio catalítico nas estruturas mutantes de CYP51-Ca sugerem que as conformações 1 e 2 do fluconazol amostraram os estados associados a maior afinidade, enquanto a conformação 3 exclusivamente amostrada nas simulações das estruturas mutantes (Y132F, Y132H e S405F), compõe um modo de ligação de mais baixa afinidade. As presentes observações nos levaram a deduzir que a ‘força inibitória’ do quimioterápico fluconazol no sítio ativo da enzima CYP51-Ca é consistente com a seguinte ordem: Nativa>Y132F>K143R>S405F≥Y132H.

Verificou-se que a alteração de resíduos com propriedades químicas semelhantes, como os resíduos aromáticos tirosina por fenilalanina, não comprometem totalmente a capacidade do fluconazol em inativar a atividade enzimática de CYP51. As mutações Y132/F/H afetam desfavoravelmente a afinidade de ligação do fluconazol a resíduos chaves presentes na região do sítio catalítico destas enzimas. Além disto compromete a estabilidade do grupo heme principalmente no mutante Y132H. A alteração de polaridade local através da troca do resíduo polar tirosina, imerso em uma região hidrofóbica, por outro com polaridade diferente como a fenilalanina (Y132F), promoveu uma sutil instabilidade conformacional local alterando a conformação da enzima em relação a sua estrutura nativa. Três distintos modos de interação com o fluconazol foram observados e foram resultantes do estabelecimento de interações mais fracas associadas à ligação exclusiva com a proteína e também pela perda de interação polar com o grupo Heme.

Verificou-se que a alteração em K143R adiciona um grupo maior à região do centro ativo com carga e hidrofiliidade semelhantes, porém com capacidade para formar um maior número de ligações de hidrogênio com resíduos circundantes e moléculas de água no sítio de ligação. A cadeia lateral da arginina é mais volumosa o que possivelmente gerou conflito estereoquímico e

instabilidade conformacional da estrutura proteica, evidenciada pelas maiores flutuações estruturais nas regiões da hélice J (340-345) β 5-hairpin (440-450) e *heme-bulge* (460-470) em relação a estrutura nativa, causando diminuição da afinidade do ligante na região do sítio de ligação de CYP51-Ca.

Em S405F, localizado fora da região do bolso de ligação (na região (β 1-3)) verificou-se que a troca de um resíduo polar pequeno como a serina por um resíduo apolar e com cadeia lateral volumosa como a fenilalanina impediu a formação de uma ligação de hidrogênio estável com o resíduo H377 localizado na (β 1-4), enfraquecendo as interações entre a β 1-3 e β 1-4 na estrutura de CYP51-Ca. Verificou-se em S405F uma considerável perda de mobilidade estrutural global em relação às demais estruturas, modificando principalmente o ambiente do grupo heme de CYP51-Ca. No entanto, verificou-se que as interações hidrofóbicas entre proteína-fluconazol foram mais favoráveis em S405F, aparentemente devido a menor mobilidade na região do bolso de ligação do ligante. Em contrapartida, verificou-se a predominância de interações mais fracas com o grupo Heme e com moléculas de água em relação aos demais mutantes. A baixa mobilidade da cavidade do sítio de ligação e de sua estrutura global e a diminuição da sua superfície acessível ao solvente restringiu o acesso a entrada de moléculas de água até o sítio de ligação de CYP51-Ca, impedindo que o fluconazol amostrasse conformações energeticamente mais favoráveis à inibição.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Simulações de dinâmica molecular foram usadas para explorar os modos de ligação do fluconazol nas enzimas CYP51 humana, micobacteriana e fúngica. As enzimas humanas e micobacterianas são mais flexíveis que as variantes fúngicas. O CYP51-Mt exibe flutuações estruturais importantes no loop BC, que permitem o acesso e/ou egresso de ligantes por vias que não estão presentes nos outros ortólogos. Isso resulta em um ligante com maior flexibilidade. No entanto, um resíduo polar no sítio de ligação do ortólogo micobacteriano leva a interações proteína-ligante mais fortes, em aparente contradição com as afinidades experimentais. No entanto, esta substituição é compensada por interações do ligante com o grupo HEME e com moléculas de água, de tal modo que as energéticas globais de ligação favorecem as enzimas fúngicas na ordem esperada das experiências. Um fenômeno semelhante é observado para o ortólogo humano: flexibilidades aumentadas do loop BC e da hélice-I conduzem a um modo de ligação do ligante dinâmico, no qual interações ligante-HEME são perdidas. Algumas dessas interações são substituídas por interações com moléculas de água, que acessam o bolso de ligação da enzima humana. Estes resultados sugerem que ligantes com grupos hidrofóbicos maiores serão estabilizados no bolso de ligação das enzimas humanas e micobacterianas, enquanto ligantes menores projetados para formar ligações polares específicas com o grupo carboxilato do grupo HEME devem ser projetados para aumentar a especificidade para enzimas fúngicas.

Já as simulações de MD dos mutantes da enzima CYP51-Ca complexadas ao fluconazol possibilitaram uma precisa investigação das propriedades dinâmicas destes sistemas. Nossas observações sugerem que as presentes mutações alteraram distintamente a flexibilidade estrutural de CYP51-Ca e parecem afetar a ligação do fluconazol de diferentes formas. Constatou-se uma sutil modificação do padrão de interação dos resíduos do sítio de ligação das variantes da enzima CYP51-Ca com o ligante fluconazol e com o grupo heme, que resultaram em perda de afinidade do ligante pela enzima e estabilidade do grupo heme. A caracterização estrutural, dinâmica e energética obtidas das simulações de MD dos mutantes em relação a estrutura nativa nos

sugere que as conformações I e II do fluconazol observadas preferencialmente na estrutura nativa e no mutante K143R estão associadas à maior afinidade. A conformação III do fluconazol não foi amostrada na estrutura nativa, entretanto, em Y132F, Y132H e S405 observou-se a predominância de interações dos resíduos do sítio de ligação da enzima com esta conformação. Simulações de MD apresentaram boa concordância com as pontuações de docking e com os achados experimentais encontrados na literatura.

PERSPECTIVAS

Para investigações futuras, sugere-se a aplicação de novas abordagens metodológicas com maior grau de acurácia para prever a afinidade de ligação do fluconazol aos diferentes ortólogos de CYP51. A aplicação da metodologia contida nesta tese, aplicada ao estudo do quimioterápico fluconazol, possibilita novas perspectivas de estudo com outros quimioterápicos, sejam eles da classe azólica ou não. Finalmente abordagens *ab initio* e simulações de QM/MM podem ser aplicadas aos quatro mutantes de CYP51-Ca para verificar como as alterações nas forças das ligações de hidrogênio (Y132H e K143R) ou perda de ligações de hidrogênio (Y132F) com o heme podem alterar o potencial redox do átomo de ferro do heme ou afetar a capacidade do ferro em coordenar o nitrogênio básico do anel triazólico do fluconazol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Bassi, A. Del Mal del segno calcinaccio o moscardino, malattia che afflige i bachi da seta, e sul modo di liberarne le bigattaje anche le più infestate, opera del dottore Agostino Bassi; 1835.
- (2) da Silva Lacaz, C. Tratado de Micologia Médica Lacaz; 2002.
- (3) Giolo, M. P.; Svidzinski, T. I. E. Fisiopatogenia, Epidemiologia E Diagnóstico Laboratorial Da Candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010, pp 225–234. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442010000300009>.
- (4) Robert, V.; Vu, D.; Amor, A. B. H.; van de Wiele, N.; Brouwer, C.; Jabas, B.; Szoke, S.; Dridi, A.; Triki, M.; Daoud, S. B.; Chouchen, O.; Vaas, L.; de Cock, A.; Stalpers, J. A.; Stalpers, D.; Verkley, G. J. M.; Groenewald, M.; dos Santos, F. B.; Stegehuis, G.; Li, W.; Wu, L.; Zhang, R.; Ma, J.; Zhou, M.; Gorjón, S. P.; Eurwilaichitr, L.; Ingsriswang, S.; Hansen, K.; Schoch, C.; Robbertse, B.; Irinyi, L.; Meyer, W.; Cardinali, G.; Hawksworth, D. L.; Taylor, J. W.; Crous, P. W. MycoBank Gearing up for New Horizons. *IMA Fungus*. 2013, pp 371–379. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.02.16>.
- (5) Robin, C. Des Végétaux Qui Croissent Sur L’homme et Sur Les Animaux Vivants /. 1847. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.119876>.
- (6) Robin, C. Histoire Naturelle Des Végétaux Parasites Qui Croissent Sur L’homme et Sur Les Animaux Vivants /. 1853. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.59045>.
- (7) Sidrim. *Micologia medica a luz de autores contemporaneos*; 2004.
- (8) Benchimol, J. L.; Sá, M. R. Adolpho Lutz - Dermatologia e Micologia - v.1, Livro 3; SciELO - Editora FIOCRUZ, 2004.
- (9) *Campbell Biology in Focus*. By Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, Robert B. Jackson, and Jane B. Reece. Boston (Massachusetts): Pearson. ISBN: 978-0-321-81380-0. 2014.
- (10) *The Yeasts*. 1984. <https://doi.org/10.1016/c2009-0-00558-3>.
- (11) Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia*; 2009.
- (12) Bow, E. J.; Evans, G.; Fuller, J.; Laverdière, M.; Rotstein, C.; Rennie, R.; Shafran, S. D.; Sheppard, D.; Carle, S.; Phillips, P.; Vinh, D. C. Canadian Clinical Practice Guidelines for Invasive Candidiasis in Adults. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2010, 21 (4), e122–e150.
- (13) Kurtzman, C. P. Fungi: Sources of Food, Fuel, and Biochemicals. *Mycologia*. 1983, p 374. <https://doi.org/10.2307/3792826>.

- (14) Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. Fifty Years of Drug Discovery from Fungi. *Fungal Diversity*. 2011, pp 3–19. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0116-y>.
- (15) Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R. O.; Denning, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)* 2017, 3 (4). <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- (16) Pfaller, M. A.; Andes, D. R.; Diekema, D. J.; Horn, D. L.; Reboli, A. C.; Rotstein, C.; Franks, B.; Azie, N. E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis due to Non-Albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. *PLoS One* 2014, 9 (7), e101510.
- (17) Pfaller, M. A.; Andes, D. R.; Diekema, D. J.; Horn, D. L.; Reboli, A. C.; Rotstein, C.; Franks, B.; Azie, N. E. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis due to Non-Albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. *PLoS One* 2014, 9 (7), e101510.
- (18) Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D.; Gurr, S. J. Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security. *Science* 2018, 360 (6390), 739–742.
- (19) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Levitz, S. M. Tackling Human Fungal Infections. *Science* 2012, 336 (6082), 647.
- (20) Giacomazzi, J.; Baethgen, L.; Carneiro, L. C.; Millington, M. A.; Denning, D. W.; Colombo, A. L.; Pasqualotto, A. C.; Association With The LIFE Program. The Burden of Serious Human Fungal Infections in Brazil. *Mycoses* 2016, 59 (3), 145–150.
- (21) Kontoyianni, M.; Lacy, B. Toward Computational Understanding of Molecular Recognition in the Human Metabolizing Cytochrome P450s. *Curr. Med. Chem.* 2018, 25 (28), 3353–3373.
- (22) Doğan, İ. S.; Saraç, S.; Sari, S.; Kart, D.; Gökhan, Ş. E.; Vural, İ.; Dalkara, S. New Azole Derivatives Showing Antimicrobial Effects and Their Mechanism of Antifungal Activity by Molecular Modeling Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, pp 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.035>.
- (23) K., S. J.; Ganguly, S.; Kumar, P.; Poddar, R.; Kumar, A. Homology Model, Molecular Dynamics Simulation and Novel Pyrazole Analogs Design of *Candida Albicans* CYP450 Lanosterol 14 α -Demethylase, a Target Enzyme for Antifungal Therapy. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2017, pp 1446–1463. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1185380>.
- (24) Gao, P.; Cui, Y.-L.; Wu, R.-L. Molecular Dynamic Modeling of CYP51B in Complex with Azole Inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2018, pp 1511–1519.

<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1328315>.

- (25) Keighobadi, M.; Emami, S.; Lagzian, M.; Fakhar, M.; Rafiei, A.; Valadan, R. Molecular Modeling and Structural Stability of Wild-Type and Mutant CYP51 from *Leishmania Major*: In Vitro and In Silico Analysis of a Laboratory Strain. *Molecules* 2018, 23 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030696>.
- (26) Lepesheva, G. I.; Waterman, M. R. Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in All Biological Kingdoms. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1770 (3), 467–477.
- (27) Podust, L. M.; Poulos, T. L.; Waterman, M. R. Crystal Structure of Cytochrome P450 14 α -Sterol Demethylase (CYP51) from *Mycobacterium Tuberculosis* in Complex with Azole Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, 98 (6), 3068–3073.
- (28) Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R. Cytochrome P450 Systems—biological Variations of Electron Transport Chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2007, pp 330–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.017>.
- (29) Jeffreys, L. N.; Girvan, H. M.; McLean, K. J.; Munro, A. W. Characterization of Cytochrome P450 Enzymes and Their Applications in Synthetic Biology. *Methods Enzymol.* 2018, 608, 189–261.
- (30) *Enzymes in Synthetic Biology*; Academic Press, 2018.
- (31) Lepesheva, G. I.; Waterman, M. R. CYP51--the Omnipotent P450. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004, 215 (1-2), 165–170.
- (32) Kelly, S. L.; Kelly, D. E. Microbial Cytochromes P450: Biodiversity and Biotechnology. Where Do Cytochromes P450 Come From, What Do They Do and What Can They Do for Us? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2013, 368 (1612), 20120476.
- (33) Nebert, D. W.; Wikvall, K.; Miller, W. L. Human Cytochromes P450 in Health and Disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013, p 20120431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0431>.
- (34) Brown, G. D. The Biosynthesis of Steroids and Triterpenoids. *Natural Product Reports*. 1998, p 653. <https://doi.org/10.1039/a815653y>.
- (35) Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R. Cytochromes P450: A Success Story. *Genome Biol.* 2000, 1 (6), REVIEWS3003.
- (36) Balding, P. R.; Porro, C. S.; McLean, K. J.; Sutcliffe, M. J.; Maréchal, J.-D.; Munro, A. W.; de Visser, S. P. How Do Azoles Inhibit Cytochrome P450 Enzymes? A Density Functional Study. *J. Phys. Chem. A* 2008, 112 (50), 12911–12918.
- (37) Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Química Medicinal - 3.Ed.: As bases moleculares da ação dos fármacos*; Artmed Editora, 2014.

- (38) Guardiola-Diaz, H. M.; Foster, L. A.; Mushrush, D.; Vaz, A. D. Azole-Antifungal Binding to a Novel Cytochrome P450 from *Mycobacterium Tuberculosis*: Implications for Treatment of Tuberculosis. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61 (12), 1463–1470.
- (39) McLean, K. J.; Dunford, A. J.; Sabri, M.; Neeli, R.; Girvan, H. M.; Balding, P. R.; Leys, D.; Seward, H. E.; Marshall, K. R.; Munro, A. W. CYP121, CYP51 and Associated Redox Systems in *Mycobacterium Tuberculosis*: Towards Deconvoluting Enzymology of P450 Systems in a Human Pathogen. *Biochemical Society Transactions.* 2006, pp 1178–1182. <https://doi.org/10.1042/bst0341178>.
- (40) Rabelo, V. W.; Santos, T. F.; Terra, L.; Santana, M. V.; Castro, H. C.; Rodrigues, C. R.; Abreu, P. A. Targeting CYP51 for Drug Design by the Contributions of Molecular Modeling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2017, 31 (1), 37–53.
- (41) McLean, K. J.; Belcher, J.; Driscoll, M. D.; Fernandez, C. C.; Le Van, D.; Bui, S.; Golovanova, M.; Munro, A. W. The *Mycobacterium Tuberculosis* Cytochromes P450: Physiology, Biochemistry & Molecular Intervention. *Future Med. Chem.* 2010, 2 (8), 1339–1353.
- (42) Strushkevich, N.; Usanov, S. A.; Park, H.-W. Structural Basis of Human CYP51 Inhibition by Antifungal Azoles. *J. Mol. Biol.* 2010, 397 (4), 1067–1078.
- (43) Hargrove, T. Y.; Friggeri, L.; Wawrzak, Z.; Qi, A.; Hoekstra, W. J.; Schotzinger, R. J.; York, J. D.; Guengerich, F. P.; Lepesheva, G. I. Structural Analyses of *Candida Albicans* Sterol 14 α -Demethylase Complexed with Azole Drugs Address the Molecular Basis of Azole-Mediated Inhibition of Fungal Sterol Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2017, 292 (16), 6728–6743.
- (44) Keniya, M. V.; Sabherwal, M.; Wilson, R. K.; Woods, M. A.; Sagatova, A. A.; Tyndall, J. D. A.; Monk, B. C. Crystal Structures of Full-Length Lanosterol 14 α -Demethylases of Prominent Fungal Pathogens *Candida Albicans* and *Candida Glabrata* Provide Tools for Antifungal Discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018, 62 (11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01134-18>.
- (45) Prasad, R.; Shah, A. H.; Rawal, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2016, pp 327–349. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_14.
- (46) Sanglard, D.; Coste, A.; Ferrari, S. Antifungal Drug Resistance Mechanisms in Fungal Pathogens from the Perspective of Transcriptional Gene Regulation. *FEMS Yeast Res.* 2009, 9 (7), 1029–1050.
- (47) Akins, R. A. An Update on Antifungal Targets and Mechanisms of Resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology.* 2005, pp 285–318. <https://doi.org/10.1080/13693780500138971>.

- (48) Krishnasamy, L.; Krishnakumar, S.; Kumaramanickavel, G.; Saikumar, C. Molecular Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2018. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2018/36218.11961>.
- (49) Martinez, R. An Update on the Use of Antifungal Agents]]>. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006. <https://doi.org/10.1590/s1806-37132006001300013>.
- (50) Mullard, A. FDA Approvals for the First 6 Months of 2015. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015, pp 517–517. <https://doi.org/10.1038/nrd4703>.
- (51) Wiederhold, N. P. The Antifungal Arsenal: Alternative Drugs and Future Targets. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2018, 51 (3), 333–339.
- (52) Ghannoum, M. A.; Perfect, J. R. *Antifungal Therapy, Second Edition*; CRC Press, 2019.
- (53) Pasko, M. T.; Piscitelli, S. C.; Van Slooten, A. D. Fluconazole: A New Triazole Antifungal Agent. *DICP* 1990, 24 (9), 860–867.
- (54) Menozzi, C. A. C.; Castelo-Branco, F. S.; França, R. R. F.; Domingos, J. L. O.; Boechat, N. Optimization of Fluconazol Synthesis: An Important Azole Antifungal Drug. *Revista Virtual de Química*. 2017, pp 1216–1234. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170071>.
- (55) Berkow, E.; Lockhart, S. Fluconazole Resistance in *Candida* Species: A Current Perspective. *Infection and Drug Resistance*. 2017, pp 237–245. <https://doi.org/10.2147/idr.s118892>.
- (56) Lupetti, A. Molecular Basis of Resistance to Azole Antifungals. *Trends Mol. Med.* 2002, 8 (2), 76–81.
- (57) White, T. C.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11 (2), 382–402.
- (58) Marichal, P.; Gorrens, J.; Laurijssens, L.; Vermuyten, K.; Van Hove, C.; Le Jeune, L.; Verhasselt, P.; Sanglard, D.; Borgers, M.; Ramaekers, F. C.; Odds, F.; Vanden Bossche, H. Accumulation of 3-Ketosteroids Induced by Itraconazole in Azole-Resistant Clinical *Candida Albicans* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43 (11), 2663–2670.
- (59) Shapiro, R. S.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011, 75 (2), 213–267.
- (60) Sagatova, A. A.; Keniya, M. V.; Wilson, R. K.; Monk, B. C.; Tyndall, J. D. A. Structural Insights into Binding of the Antifungal Drug Fluconazole to *Saccharomyces Cerevisiae* Lanosterol 14 α -Demethylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59 (8), 4982–4989.
- (61) McLean, K. J.; Clift, D.; Lewis, D. G.; Sabri, M.; Balding, P. R.; Sutcliffe, M.

- J.; Leys, D.; Munro, A. W. The Preponderance of P450s in the Mycobacterium Tuberculosis Genome. *Trends Microbiol.* 2006, 14 (5), 220–228.
- (62) Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Cannieux, M.; Greetham, D.; Jackson, C. J.; Marczylo, T.; Ugochukwu, C.; Kelly, D. E. An Old Activity in the Cytochrome P450 Superfamily (CYP51) and a New Story of Drugs and Resistance. *Biochem. Soc. Trans.* 2001, 29 (Pt 2), 122–128.
- (63) Castanheira, M.; Messer, S. A.; Jones, R. N.; Farrell, D. J.; Pfaller, M. A. Activity of Echinocandins and Triazoles against a Contemporary (2012) Worldwide Collection of Yeast and Moulds Collected from Invasive Infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2014, 44 (4), 320–326.
- (64) Ericson, J. E.; Kaufman, D. A.; Kicklighter, S. D.; Bhatia, J.; Testoni, D.; Gao, J.; Smith, P. B.; Prather, K. O.; Benjamin, D. K., Jr; Fluconazole Prophylaxis Study Team on behalf of the Best Pharmaceuticals for Children Act–Pediatric Trials Network Steering Committee; Fluconazole Prophylaxis Study Team on behalf of the Best Pharmaceuticals for Children Act–Pediatric Trials Network Steering Committee. Fluconazole Prophylaxis for the Prevention of Candidiasis in Premature Infants: A Meta-Analysis Using Patient-Level Data. *Clin. Infect. Dis.* 2016, 63 (5), 604–610.
- (65) Kale, P.; Johnson, L. B. Second-Generation Azole Antifungal Agents. *Drugs Today* 2005, 41 (2), 91.
- (66) BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www4.Anvisa.Gov.br/BularioEletronico>. Acesso em 06/06/2020.
- (67) Warrilow, A. G.; Parker, J. E.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Azole Affinity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Enzymes from *Candida Albicans* and *Homo Sapiens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 57 (3), 1352–1360.
- (68) Bellamine, A.; Mangla, A. T.; Nes, W. D.; Waterman, M. R. Characterization and Catalytic Properties of the Sterol 14 α -Demethylase from *Mycobacterium Tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96 (16), 8937–8942.
- (69) Akins, R. A.; Sobel, J. D. Antifungal Targets, Mechanisms of Action, and Resistance in *Candida Albicans*. *Antimicrobial Drug Resistance.* 2009, pp 347–407. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_29.
- (70) Sun, W.-W.; Wei-wei, S. U. N.; Ping-hui, G. A. O.; Wang, Y.; Jiang, Y.-Y. ATP-Binding-Cassette Transporters and Fluconazole-Resistance of Clinical *Candida Albicans* Strains. *Academic Journal of Second Military Medical University.* 2009, pp 1038–1041. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1008.2008.01038>.
- (71) Parker, J. E.; Warrilow, A. G. S.; Price, C. L.; Mullins, J. G. L.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Resistance to Antifungals That Target CYP51. *Journal of*

- Chemical Biology. 2014, pp 143–161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>.
- (72) Ji, H.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Zhu, J.; Song, Y.; Jianguo, L.; Zhu, J. A Three-Dimensional Model of Lanosterol 14 α -Demethylase of *Candida Albicans* and Its Interaction with Azole Antifungals. *J. Med. Chem.* 2000, 43 (13), 2493–2505.
- (73) Warrilow, A. G. S.; Mullins, J. G. L.; Hull, C. M.; Parker, J. E.; Lamb, D. C.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. S279 Point Mutations in *Candida Albicans* Sterol 14- α Demethylase (CYP51) Reduce In Vitro Inhibition by Fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56 (4), 2099–2107.
- (74) Chakrabarti, A. Drug Resistance in Fungi - an Emerging Problem. WHO Regional Health Forum. number 1. 2011, pp 97–103.
- (75) Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Kelly, D. E.; Manning, N. J.; Loeffler, J.; Hebart, H.; Schumacher, U.; Einsele, H. Resistance to Fluconazole and Cross-Resistance to Amphotericin B in *Candida Albicans* from AIDS Patients Caused by Defective Sterol $\Delta^5,6$ -Desaturation. *FEBS Lett.* 1997, 400 (1), 80–82.
- (76) Flowers, S. A.; Colón, B.; Whaley, S. G.; Schuler, M. A.; David Rogers, P. Contribution of Clinically Derived Mutations in ERG11 to Azole Resistance in *Candida Albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 59 (1), 450–460.
- (77) Strushkevich, N.; MacKenzie, F.; Arrowsmith, C. H.; Edwards, A. M.; Bountra, C.; Weigelt, J.; Usanov, S. A.; Park, H.; Structural Genomics Consortium. Crystal Structure of Human Lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51). 2010. <https://doi.org/10.2210/pdb3juv/pdb>.
- (78) Frenkel, D.; Smit, B.; Ratner, M. A. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications. *Phys. Today* 1997, 50 (7), 66–66.
- (79) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 2005, 26 (16), 1781–1802.
- (80) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Education, 2001.
- (81) Martínez, L.; Borin, A.; da Física (2007)., S. M. S. E. L. *Métodos de Química Teórica E Modelagem Molecular, Capítulo 12- Fundamentos de Simulação Por Dinâmica Molecular*; Editora Livraria da Física, 2007.
- (82) Henzler-Wildman, K.; Kern, D. Dynamic Personalities of Proteins. *Nature* 2007, 450 (7172), 964–972.
- (83) MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.;

- Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* 1998, 102 (18), 3586–3616.
- (84) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179–5197. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118 (9), 2309–2309.
- (85) Huang, J.; MacKerell, A. D. CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data. *J. Comput. Chem.* 2013, 34 (25), 2135–2145.
- (86) MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* 1998, 102 (18), 3586–3616.
- (87) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* 1967, 159 (1), 98–103.
- (88) Swope, W. C.; Andersen, H. C.; Berens, P. H.; Wilson, K. R. A Computer Simulation Method for the Calculation of Equilibrium Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules: Application to Small Water Clusters. *J. Chem. Phys.* 1982, 76 (1), 637–649.
- (89) Kalé, L.; Skeel, R.; Bhandarkar, M.; Brunner, R.; Gursoy, A.; Krawetz, N.; Phillips, J.; Shinozaki, A.; Varadarajan, K.; Schulten, K. NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *Journal of Computational Physics*. 1999, pp 283–312. <https://doi.org/10.1006/jcph.1999.6201>.
- (90) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* 1983, 79 (2), 926–935.
- (91) Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D., Jr. CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *J. Comput. Chem.* 2010, 31 (4), 671–690.
- (92) Vanommeslaeghe, K.; Prabhu Raman, E.; MacKerell, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded

- Parameters and Partial Atomic Charges. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012, pp 3155–3168. <https://doi.org/10.1021/ci3003649>.
- (93) Mayne, C. G.; Gumbart, J. C.; Tajkhorshid, E. The Force Field Toolkit: Software for the Parameterization of Small Molecules from First Principles. *Biophysical Journal*. 2013, p 31a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.209>.
- (94) Mayne, C. G.; Saam, J.; Schulten, K.; Tajkhorshid, E.; Gumbart, J. C. Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit. *Journal of Computational Chemistry*. 2013, pp 2757–2770. <https://doi.org/10.1002/jcc.23422>.
- (95) Gordon, J. C.; Myers, J. B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L. S.; Onufriev, A. H: A Server for Estimating pKas and Adding Missing Hydrogens to Macromolecules. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33 (Web Server), W368–W371.
- (96) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996, 14 (1), 33–38, 27–28.
- (97) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* 1995, 103 (19), 8577–8593.
- (98) Martínez, L. MDAnalysis; 2016.
- (99) Martínez, L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. *PLoS One* 2015, 10 (3), e0119264.
- (100) DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System; 2002.
- (101) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *Journal of Computational Chemistry*. 2004, pp 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- (102) Zoete, V.; Cuendet, M. A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. SwissParam: A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. *Journal of Computational Chemistry*. 2011, pp 2359–2368. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>.
- (103) Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. *J. Chem. Inf. Model.* 2012, 52 (12), 3144–3154.
- (104) Yu, W.; He, X.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D. Extension of the CHARMM General Force Field to Sulfonyl-Containing Compounds and Its Utility in Biomolecular Simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 2012, pp 2451–2468. <https://doi.org/10.1002/jcc.23067>.
- (105) Ghosh, J.; Marru, S.; Singh, N.; Vanommeslaeghe, K.; Fan, Y.; Pamidighantam, S. Molecular Parameter Optimization Gateway

- (ParamChem). In Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference on Extreme Digital Discovery - TG '11; 2011. <https://doi.org/10.1145/2016741.2016779>.
- (106) Mayne, C. G.; Saam, J.; Schulten, K.; Tajkhorshid, E.; Gumbart, J. C. Rapid Parameterization of Small Molecules Using the Force Field Toolkit. *J. Comput. Chem.* 2013, 34 (32), 2757–2770.
- (107) Frisch, Æ.; Frisch, M. J.; Clemente, F. R.; Trucks, G. W. Gaussian 09 User's Reference; 2009.
- (108) Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design* 2011, 7 (2), 146–157.
- (109) Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003, 32, 335–373.
- (110) Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions. *Journal of Molecular Biology.* 1982, pp 269–288. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90153-x](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90153-x).
- (111) Pinzi, L.; Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- (112) de Magalhães, C. S.; Almeida, D. M.; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking Highly Flexible Ligands. *Inf. Sci.* 2014, 289, 206–224.
- (113) Magalhães, C. S. de; de Magalhães, C. S.; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. A Genetic Algorithm for the Ligand-Protein Docking Problem. *Genetics and Molecular Biology.* 2004, pp 605–610. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572004000400022>.
- (114) Magalhães, C. S. de; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. Métodos de Docking Receptor-Ligante Para O Desenho Racional de Compostos Bioativos. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular* 2007, 654.
- (115) Krumrine, J.; Raubacher, F.; Brooijmans, N.; Kuntz, I. Principles and Methods of Docking and Ligand Design. *Methods Biochem. Anal.* 2003, 44, 443–476.
- (116) Lohning, A. E.; Levonis, S. M.; Williams-Noonan, B.; Schweiker, S. S. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17 (18), 2023–2040.
- (117) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* 2012, 52 (7), 1757–1768.
- (118) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.;

- Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *J. Cheminform.* 2012, 4 (1), 17.
- (119)Lepesheva, G. I.; Waterman, M. R. Structural Basis for Conservation in the CYP51 Family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2011, 1814 (1), 88–93.
- (120)Hargrove, T.; Wawrzak, Z.; Lepesheva, G. Crystal Structure of Sterol 14-Alpha Demethylase (CYP51) from *Candida Albicans* in Complex with the Tetrazole-Based Antifungal Drug Candidate VT1161 (VT1). 2017. <https://doi.org/10.2210/pdb5tz1/pdb>.
- (121)Sheng, C.; Chen, S.; Ji, H.; Dong, G.; Che, X.; Wang, W.; Miao, Z.; Yao, J.; Lü, J.; Guo, W.; Zhang, W. Evolutionary Trace Analysis of CYP51 Family: Implication for Site-Directed Mutagenesis and Novel Antifungal Drug Design. *J. Mol. Model.* 2010, 16 (2), 279–284.
- (122)Choi, J.; Roush, W. Structure Based Design of CYP51 Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 2016, 17 (1), 30–39.
- (123)Kenaan, C.; Zhang, H.; Shea, E. V.; Hollenberg, P. F. Uncovering the Role of Hydrophobic Residues in Cytochrome P450-Cytochrome P450 Reductase Interactions. *Biochemistry* 2011, 50 (19), 3957–3967.
- (124)Hargrove, T. Y.; Wawrzak, Z.; Lamb, D. C.; Guengerich, F. P.; Lepesheva, G. I. Structure-Functional Characterization of Cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus Fumigatus* and Molecular Basis for the Development of Antifungal Drugs. *J. Biol. Chem.* 2015, 290 (39), 23916–23934.
- (125)Oliveira-Carvalho, V.; Del Negro, G. M. B. Is the S405F Mutation in *Candida Albicans* ERG11 Gene Sufficient to Confer Resistance to Fluconazole? *J. Mycol. Med.* 2014, 24 (3), 241–242.
- (126)Kelly, S. Y132H Substitution in *Candida Albicans* Sterol 14 α -Demethylase Confers Fluconazole Resistance by Preventing Binding to Haem. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 180 (2), 171–175.
- (127)Chau, A. S.; Mendrick, C. A.; Sabatelli, F. J.; Loebenberg, D.; McNicholas, P. M. Application of Real-Time Quantitative PCR to Molecular Analysis of *Candida Albicans* Strains Exhibiting Reduced Susceptibility to Azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48 (6), 2124–2131.
- (128)Warrilow, A. G.; Nishimoto, A. T.; Parker, J. E.; Price, C. L.; Flowers, S. A.; Kelly, D. E.; David Rogers, P.; Kelly, S. L. The Evolution of Azole Resistance in *Candida Albicans* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) through Incremental Amino Acid Substitutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2019. <https://doi.org/10.1128/aac.02586-18>.
- (129)Warrilow, A. G. S.; Martel, C. M.; Parker, J. E.; Melo, N.; Lamb, D. C.; Nes, W. D.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Azole Binding Properties of *Candida Albicans*

- Sterol 14- Demethylase (CaCYP51). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54 (10), 4235–4245.
- (130) Favre, B.; Didmon, M.; Ryder, N. S. Multiple Amino Acid Substitutions in Lanosterol 14 α -Demethylase Contribute to Azole Resistance in *Candida Albicans*. *Microbiology* 1999, 145 (Pt 10), 2715–2725.
- (131) Goldman, G. H.; da Silva Ferreira, M. E.; dos Reis Marques, E.; Savoldi, M.; Perlin, D.; Park, S.; Godoy Martinez, P. C.; Goldman, M. H. S.; Colombo, A. L. Evaluation of Fluconazole Resistance Mechanisms in *Candida Albicans* Clinical Isolates from HIV-Infected Patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 50 (1), 25–32.
- (132) Perea, S.; López-Ribot, J. L.; Kirkpatrick, W. R.; McAtee, R. K.; Santillán, R. A.; Martínez, M.; Calabrese, D.; Sanglard, D.; Patterson, T. F. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida Albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45 (10), 2676–2684.
- (133) Marichal, P.; Koymans, L.; Willemsens, S.; Bellens, D.; Verhasselt, P.; Luyten, W.; Borgers, M.; Ramaekers, F. C. S.; Odds, F. C.; Vanden Bossche, H. Contribution of Mutations in the Cytochrome P450 14 α -Demethylase (Erg11p, Cyp51p) to Azole Resistance in *Candida Albicans*. *Microbiology* 1999, 145 (Pt 10), 2701–2713.
- (134) White, T. C.; Holleman, S.; Dy, F.; Mirels, L. F.; Stevens, D. A. Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida Albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46 (6), 1704–1713.
- (135) Sanglard, D.; Ischer, F.; Koymans, L.; Bille, J. Amino Acid Substitutions in the Cytochrome P-450 Lanosterol 14 α -Demethylase (CYP51A1) from Azole-Resistant *Candida Albicans* Clinical Isolates Contribute to Resistance to Azole Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42 (2), 241–253.
- (136) Kudo, M.; Ohi, M.; Aoyama, Y.; Nitahara, Y.; Chung, S.-K.; Yoshida, Y. Effects of Y132H and F145L Substitutions on the Activity, Azole Resistance and Spectral Properties of *Candida Albicans* Sterol 14-Demethylase P450 (CYP51): A Live Example Showing the Selection of Altered P450 through Interaction with Environmental Compounds. *The Journal of Biochemistry.* 2005, pp 625–632. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi073>.
- (137) Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Kelly, D. E. Y132H Substitution in *Candida Albicans* Sterol 14 α -Demethylase Confers Fluconazole Resistance by Preventing Binding to Haem. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 180 (2), 171–175.
- (138) Roilides, E.; Iosifidis, E. Acquired Resistance in Fungi: How Large Is the Problem? *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, 25 (7), 790–791.

- (139) Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011, 7, 539.
- (140) Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42 (Web Server issue), W320–W324.
- (141) Honorato Siqueira, T, Martínez, L. Molecular Simulations of Fluconazole Mediated Inhibition of Sterol Biosynthesis, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2020, 38 (6), 1659-1669.

ANEXO

Tabela A1 - Constantes da força de ligação e de torção de ângulos parametrizados para a estrutura do fluconazol.

Ligação	k_b	b_0 (Å)
CG301-CG2R61	257.147	1.490
Ângulo	k_θ	θ_0
OG311- CG301- CG321	97.379	106.346
OG311-CG301-CG2R61	90.123	110.179
CG301-CG2R61-CG2R61	87.572	120.737
CG301-CG2R61-CG2R66	165.157	122.458
CG301-CG321-NG2R51	156.200	112.037
CG321-NG2R51-CG2R53	100.862	127.833
CG321-CG301-CG2R61	114.735	110.684

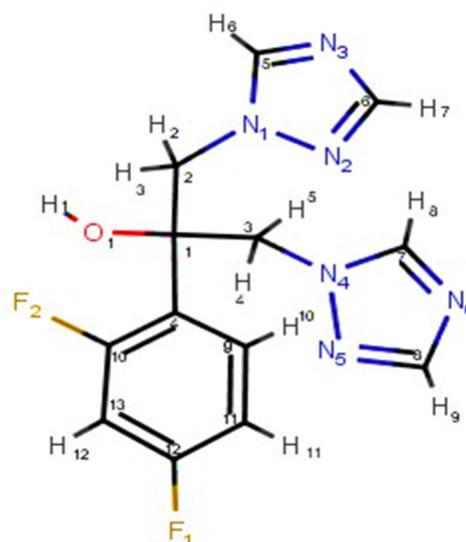


Tabela A2 – Constantes de força, K, o ângulo de fase δ ($^\circ$) e multiplicidade, n, dos diedros parametrizados para a estrutura do fluconazol.

Diedros	K (kcal/mol)	n	δ ($^\circ$)
OG311- CG301- CG2R61- CG2R66	1,7120	1	0
OG311- CG301- CG321- NG2R51	0,718	1	0
CG321- NG2R51- CG2R53- NG2R50	2,2530	1	0
CG301- CG2R61- CG2R61- CG2R61	2,9990	1	180
CG301- CG321- NG2R51- NG2R50	1,3680	1	180
CG321- NG2R51- NG2R50- CG2R53	2,7270	1	0

Tabela A3 – Otimização dos ângulos diedrais e suas correspondentes constantes de força, K, o ângulo de fase δ ($^{\circ}$) e multiplicidade, n, para a estrutura do fluconazol.

Diedros	K (kcal/mol)	n	δ ($^{\circ}$)
OG311 CG301 CG321 NG2R51	0,7180	1	0
OG311 CG301 CG2R61 CG2R66	1,7120	1	0
OG311 CG301 CG321 HGA2	0,6840	1	0
CG301 CG2R61 CG2R61 CG2R61	2,9780	1	0
CG321 CG301 CG2R61 CG2R61	2,4260	1	0
CG321 NG2R51 CG2R53 HG52	2,9990	1	180
CG301 CG2R61 CG2R61 HG61	2,9990	1	180
CG2R61 CG301 CG321 NG2R51	1,7060	1	180
CG321 CG301 CG321 NG2R51	0,1160	1	0
CG2R61 CG301 CG321 HGA2	0,9110	1	0
CG321 CG301 CG2R61 CG2R66	1,2640	1	0
HGP1 OG311 CG301 CG2R61	1,3040	1	0
HGP1 OG311 CG301 CG321	1,5680	1	180
CG301 CG2R61 CG2R66 FGR1	1,9420	1	0
CG321 NG2R51 CG2R53 NG2R50	2,2530	1	0
CG321 NG2R51 NG2R50 CG2R53	2,7270	1	0
OG311 CG301 CG2R61 CG2R61	1,2700	1	0
HGA2 CG321 NG2R61 CG2R53	0,2330	1	0
CG301 CG321 NG2R51 CG2R53	1,2680	1	0
CG301 CG321 NG2R51 NG2R50	1,3680	1	180
CG301 CG2R61 CG2R66 CG2R61	0,3680	1	180

Tabela A4 - Análise das energias de interação do fluconazol com o ambiente obtidas a partir de simulações de MD. O intervalo de interações observado em cada caso é indicado pelo desvio padrão das flutuações.

Energia (kcal/mol)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Homo Sapiens</i>
Total	-64,2±8,4	-74,4± 4,1	-73,7±7,6	-67,7± 9,6
Ligante-água	-12,8±7,6	-15,7±3,1	-19,3±6,2	-20,5±9,2
Ligante-proteína	-32,2±7,6	-25,7±3,0	-25,5±3,6	-24,8±6,1
Ligante-Heme	-19,2±4,9	-32,9±2,2	-29,0±5,0	-22,4 ±5,2

Tabela A5 - Análise comparativa das propriedades estruturais RMSD, Raio de giro, Contatos nativos e área de superfície acessível ao solvente entre a estrutura nativa e mutantes.

Parâmetros Estruturais	Nativa	Y132F	Y132H	K143R	S405F
Rg	22,58 ± 0,07	22,60 ± 0,08	22,58 ± 0,06	22,59 ± 0,06	22,52 ± 0,08
RMSD	1,33 ± 0,35	1,34 ± 0,19	1,38 ± 0,18	1,43 ± 0,23	1,28 ± 0,16
%Contatos nativos	0,87 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,88 ± 0,02	0,87 ± 0,02
Sasa	23047 ± 298	23057 ± 377	22889 ± 333	23023± 368	22906 ± 390

Tabela A6 - Análise das energias de interação do fluconazol com o ambiente obtidas a partir de simulações de MD. O intervalo de interações observado em cada caso é indicado pelo desvio padrão das flutuações.

CYP51- <i>Candida albicans</i>	Nativa		Mutada			
	Energia Interacional	Nativa (kcal/mol)	Y132F (kcal/mol)	Y132H (kcal/mol)	K143R (kcal/mol)	S405F (kcal/mol)
Total		-74,4±4,1	-73,1±6,4	-53,2±7,3	-66,6±5,2	-56,9±7,1
Ligante-água		-15,7±3,1	-20,7±6,4	-20,1±5,8	-20,8±4,14	-19,2±5,7
Ligante-Proteína		-25,7±3,0	-23,6±4,1	-24,9±4,5	-24,3±3,1	-29,2±3,6
Ligante-Heme		-32,9±2,2	-28,7±6,0	-8,18±5,14	-21,5±3,0	-8,5±4,8

Molecular simulations of fluconazole-mediated inhibition of sterol biosynthesis

Tayane Honorato Siqueira and Leandro Martínez

Institute of Chemistry and Center for Computing in Engineering & Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

To cite this article: Honorato Siqueira, T, Martínez, L. Molecular Simulations of Fluconazole-Mediated Inhibition of Sterol Biosynthesis, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020, 38 (6), 1659-1669.

To link this article: <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1614998>

Abstract

Invasive opportunistic fungal infections and antifungal drug resistance prompt the investigation of the underlying molecular mechanisms of the inhibition of the triazole drugs. The target of triazoles is the product of the ERG11 gene, the cytochrome P450 Sterol 14 α -demethylase (CYP51), which is part of the ergosterol biosynthetic pathway. In the current study, molecular dynamics (MD) simulations were performed to reveal the mechanisms of fluconazole inhibitory activities in orthologs of CYP51 present in humans (Hs), and in *M.tuberculosis* (Mt), *C.albicans* (Ca), and *C.glabrata* (Cg). The conformational diversity of the BC-loop in the CYP51-Hs and CYP51-Mt structures alter the catalytic site of these enzymes when compared to the fungal CYPs, resulting in greater conformational variability of the inhibitor. Overall interaction energies are consistent with the observed affinities, but are the result of the competitive interactions of the ligand with the protein residues, the HEME group, and water molecules. Specifically, protein-fluconazole interactions are more effective in CYP51-Mt due to polar interactions with the Arg96 residue. These interactions are, however, substituted in fungal enzymes by ligand-HEME interactions, which compensate for the loss of the polar bond and result in a more energetically favored binding. Therefore, the development of ligand with increased specificity to fungal enzymes should focus on the strengthening polar ligand-HEME interactions, while larger hydrophobic ligands are probably best suited to target mycobacterial and human enzymes. These differences and other ligand-binding site-specific interactions are presented and can inspire the design of new inhibitors with greater ortholog specificity.

Keywords: Fluconazole, selectivity, molecular dynamics simulations, Candida, cytochrome P450