

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
INSTITUTO METRÓPOLE DIGITAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA**

KATYANNA SALES BEZERRA

ESTUDO BIOQUÍMICO QUÂNTICO DE INTERAÇÕES ENTRE O RECEPTOR
ANDROGÊNICO, RNAr E MCL-1 E LIGANTES

NATAL – RN

2020

KATYANNA SALES BEZERRA

ESTUDO BIOQUÍMICO QUÂNTICO DE INTERAÇÕES ENTRE O RECEPTOR
ANDROGÊNICO, RNAr E MCL-1 E LIGANTES

Tese apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Bioinformática
como requisito para a obtenção do
título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Umberto Laino Fulco (DBF/UFRN)

NATAL – RN
2020

KATYANNA SALES BEZERRA

**ESTUDO BIOQUÍMICO QUÂNTICO DE INTERAÇÕES ENTRE O RECEPTOR
ANDROGÊNICO, RNAr E MCL-1 E LIGANTES**

Defesa de Doutorado apresentanda ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da
Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

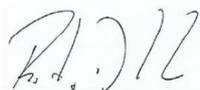
Área de concentração: Bioinformática
Linha de Pesquisa: Biologia de Sistemas
Orientador: Prof. Dr. Umberto Laino Fulco

Natal, 24 de março de 2020.

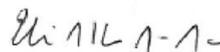
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Umberto Laino Fulco
Presidente
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Prof. Dr. Rodrigo Juliani Siqueira Dalmolin
Avaliador Interno
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte



Prof. Dr. Eudenilson Lins de Albuquerque
Avaliador Externo ao Programa
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte



Prof. Dr. Douglas Soares Galvão
Avaliador Externo à Instituição
Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Valder Nogueira Freire
Avaliador Externo à Instituição
Universidade Federal do Ceará

Bezerra, Katyanna Sales.

Estudo bioquímico quântico de interações entre o receptor androgênico, RNAr e MCL-1 e Ligantes / Katyanna Sales Bezerra. - 2020.

151f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto Metr pole Digital, Programa de P  Gradua o em Bioinformática, Natal, 2020.

Orientador: Dr. Umberto Laino Fulco.

1. Proteínas - Tese. 2. DFT - Tese. 3. Intera es - Tese. I. Fulco, Umberto Laino. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 577:004.021

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Agradeço à minha família pelo apoio, carinho e satisfação durante todos os momentos. À minha mãe e meu pai por absolutamente tudo, a eles toda minha gratidão. Às minhas irmãs Thayse e Kamila e minha Tia Vera Lúcia pelo desejo de que tudo sempre desse certo. Agradeço também às minhas sobrinhas Isabella e Caroline por proporcionarem momentos inesquecíveis.

Ao Prof. Dr. Umberto, pela paciência, pela compreensão e confiança empregada, sempre acreditando em mim mais do que eu mesma acreditava, serei eternamente grata por todos os conhecimentos que adquiri a partir dos esforços constantes que o senhor proporciona a todos os seus alunos. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Eudenilson por todo o conhecimento o qual compartilha generosamente.

Ao Prof. Dr. Jonas pela ajuda constante.

Aos colegas do laboratório de Biofísica e Simulação Computacional que compartilharam comigo esta jornada: Jéssica Vianna, Aranthya, Washington, Érika, Emmanuel, John, Anne, Mylene, Daniel, Lucas, Aline, Sabrynna, Xavier e Camila. Em especial minha amiga Jéssica pela amizade e confiança.

Ao Sr. Raimundo que com tanto zelo é um exemplo a ser seguido.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e contribuem para a minha formação como pessoa e como futura pesquisadora.

A todos, muito obrigada!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 Estrutura química (lado esquerdo) dos dois antagonistas e um agonista, onde: (a) CPA, (b) HFT e (c) RLL, subdivididos em três regiões (I, II, III) para CPA e HFT e quatro regiões (I, II, III, IV) para o RLL. Também são mostradas (lado direito) as suas densidades eletrônicas de DFT projetadas em uma isosuperfície de potencial eletrostático. 64

Figura 4.2 Energia de interação total (em kcal/mol) dos complexos RA-antagonistas e RA-agonista em função do raio de bolso de ligação r (em Å) calculado usando o funcional GGA B97D no esquema MFCC. 66

Figura 4.3 Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das energias de interação dos três complexos biológicos: (a) RA-CPA (em rosa), (b) RA-HFT (em azul) e (c) RA-RLL (em verde). Também são mostradas as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante, bem como as regiões e átomos dos ligantes que interagem com cada resíduo no local de ligação. Além disso, moléculas de água que podem interagir com os resíduos destacados também são representadas. 68

Figura 4.4 As principais interações comuns aos três complexos avaliados: (a) CPA, (b) HFT e (c) RLL. As linhas tracejadas correspondem às forças de dispersão de London (laranja), ligações de hidrogênio não convencionais (verde), alquil - π (rosa) e ligações de halogênio (ciano). 71

Figura 4.5 As principais interações comuns aos complexos (a) RA-CPA e (b) RA-HFT. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde). 75

Figura 4.6 As principais interações comuns aos sistemas complexos (a) RA-CPA e (b) RA-RLL. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e forças de dispersão de London (laranja). 76

Figura 4.7 As principais interações comuns aos sistemas complexos (a) RA-HFT e (b) RA-RLL. As linhas tracejadas correspondem às ligações de hidrogênio (azul) e às forças de dispersão de London (laranja).

77

Figura 4.8 As principais interações envolvendo cada sistema complexo individualmente: (a) CPA; (b) HFT; (c) RLL. As linhas tracejadas correspondem a hidrogênio não convencional (verde), forças de dispersão de London (laranja), pontes de sal (vermelho), ligações de halogênio (ciano), alquil - π (rosa) e π - π interações (amarelo).

80

Figura 5.1 Subunidade ribossomal 30S de *Thermus thermophilus* co-cristalizado com higromicina B (PDB ID: 1HNZ). (a) Os resíduos do bolso de ligação estão dentro do círculo pontilhado de raio r ao redor da droga. (b) O bolso de ligação da subunidade 30S para a higromicina B, que inclui os resíduos mais importantes do RNAr 16S ligados a esta droga: C1403, C1404, G1405, A1493, G1494, U1495, C1496 e U1498.

84

Figura 5.2 Exemplo de cálculo MFCC em que os efeitos de blindagem são importantes: o resíduo A1518 (R_i) é blindado pelos nucleotídeos G1405, U1406, C1496 e G1497 (R_j), localizados próximos à higromicina B (L).

86

Figura 5.3 Estrutura química única da molécula de higromicina B e suas regiões i (verde), ii (amarela) e iii (azul). A imagem no canto inferior direito mostra a densidade de elétrons da molécula hygB, projetada em uma isosuperfície de potencial eletrostático. Ele está em um ambiente neutro ou levemente alcalino (pH 7,2-7,4), onde aproximadamente 61.85% dos conformes hygB estão em um estado carregado positivamente.

89

Figura 5.4 Energias de interação em função do raio do bolso de ligação r , para o complexo higromicina B-30S. Cada curva apresenta resultados obtidos com um valor diferente da constante dielétrica: 4 (traço), 10 (ponto), 20 (ponto-traço) e 40 (ponto-traço). Como já relatado, o raio da bolsa de ligação corresponde à distância entre o centróide da higromicina B e o resíduo RNAr 16S mais distante considerado.

91

Figura 5.5 Painel gráfico que descreve os nucleotídeos energeticamente mais relevantes dentro de um grande bolso de ligação (18.0 Å), para uma constante dielétrica igual a 40. 94

Figura 5.6 Imagens representando todos os contatos (ligações de hidrogênio convencionais e não convencionais) entre os resíduos de RNAr 16S com a higromicina B, no bolso de ligação da subunidade 30S. As distâncias apresentadas estão em angstroms (Å). (b) Potencial eletrostático e densidade eletrônica projetada do complexo, destacando os principais resíduos. Uma alta (baixa) densidade de elétrons é representada na cor vermelha (azul), de acordo com a escala ao lado direito. 96

Figura 6.1 Estrutura química (lado esquerdo) dos compostos S63845 (a), AZD5991 (b) e AM-8621 (c) subdivididos em regiões. Também são mostradas (lado direito) as suas densidades eletrônicas de DFT projetadas em uma isosuperfície de potencial eletrostático. 107

Figura 6.2 Estrutura química (lado esquerdo) dos compostos ECY (a), E4Q (b) e E4K (c) e KJP (d) subdivididos em regiões. Também são mostradas (lado direito) as suas densidades eletrônicas de DFT projetadas em uma isosuperfície de potencial eletrostático. 108

Figura 6.3 Energia de interação total (em kcal/mol) dos complexos Ligante-MCL-1 em função do raio de bolso de ligação r (em Å) calculado usando o funcional GGA B97D no esquema MFCC. Duas constantes dielétricas são consideradas: 10 (a) e 40 (b). 111

Figura 6.4 Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das energias de interação de três complexos biológicos: (a) S63845 (em rosa), (b) AZD5991 (em amarelo) e (c) AM-8621 (em ciano). Também são mostradas as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante, bem como as regiões e átomos dos ligantes que interagem com cada resíduo no local de ligação. Além disso, moléculas de água que podem interagir com os resíduos destacados também são representadas. 113

Figura 6.5 Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das energias de interação de quatro complexos biológicos: (a) ECY (em verde), (b) E4Q (em laranja) e (c) E4K (em cinza) e (d) KJP (em azul). Também são mostradas as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante, bem como as regiões e átomos dos ligantes que interagem com cada resíduo no local de ligação. Além disso, moléculas de água que podem interagir com os resíduos destacados também são representadas. 114

Figura 6.6 Painel demonstrando os resíduos comumente mais relevantes a pelo menos quatro compostos. 117

Figura 6.7 Três principais interações para os compostos (a) S63845, (b) AZD5991 e (c) AM-8621. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e forças de dispersão de London (laranja). 120

Figura 6.8 Três principais interações para os compostos (a) ECY (b) E4Q. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e forças de dispersão de London (laranja). 121

Figura 6.9 Três principais interações para os compostos (a) E4K (b) KJP. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e forças de dispersão de London (laranja). 122

LISTA DE ABREVIACES

A	Aminoácido Alanina
Arg	Aminoácido Arginina
BIRD	<i>Binding site, Interaction energy and Residues Domain</i>
Cys	Aminoácido Cisteína
CaP	Câncer de Próstata
CRPC	Câncer de Próstata Resistente  Castração
Asp	Aminoácido Aspartato
DBD	Domínio de Ligação de DNA
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
DNA	cido desoxirribonucleico
Glu	Aminoácido Glutamina
RA	Receptor Andrognico
Phe	Aminoácido Fenilalanina
Gly	Aminoácido Glicina
GGA	Aproximação do Gradiente Generalizado
His	Aminoácido Histidina
HFT	Hidroxiflutamida
Ile	Aminoácido Isoleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Lys	Aminoácido Lisina
Leu	Aminoácido Leucina
LBD	Domínio de Ligação ao Ligante

Met	Aminoácido Metionina
MFCC	Fracionamento Molecular por Capas Conjugadas
MCL-1	Myeloid Cell Leukaemia-1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSA	Antígeno Prostático Específico
Pro	Aminoácido Prolina
PDB	Protein Data Bank
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico tipo mensageiro
RNAr	Ácido Ribonucleico
RNAt	Ácido Ribonucleico
Ser	Aminoácido Serina
Tyr	Aminoácido Tirosina
Val	Aminoácido Valina
Trp	Aminoácido Triptofano
Thr	Aminoácido Treonina

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Energias de ligação individuais de todos os nucleotídeos de RNAr 16S localizados em um raio até 18.0 a partir do centróide da molécula hygB. Resultados obtidos através da abordagem MFCC, usando constantes dielétricas de 1, 4, 10, 20 e 40.

RESUMO

Esta tese apresenta três pesquisas realizadas no campo da simulação *ab initio*, baseadas em princípios da Mecânica Quântica. O primeiro estudo retrata as particularidades das interações entre o receptor androgênico (RA) carregando uma mutação T877A, cuja qual promove promiscuidade no receptor, e dois fármacos antagonistas acetato de ciproterona e hidroxiflutamida (CPA e HFT) e um composto agonista (RLL). As energias de interação foram obtidas com base em métodos da química quântica baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) utilizando o método de Fragmentação com Capas Conjugadas (MFCC). Os resultados demonstram a relevância individual entre T877A-RA e os ligantes, apontando os principais resíduos que perfazem as interações. O segundo estudo apresenta a análise da interação entre RNA ribossômico 16S e a higromicina B (hygB) é um antibiótico aminoglicosídeo que afeta a translocação ribossômica, utilizando a estratégia MFCC à luz do DFT e parametrizações de constantes dielétricas. Os resultados apontaram que os nucleotídeos C1403, C1404, G1405, A1493, G1494, U1495, C1496 e U1498 tinham as energias de ligação mais negativas, tornando-os fortes candidatos para estabilizar o hygB em uma bolsa de ligação adequada da subunidade ribossômica 30S dos procariontes. Já o terceiro trabalho apresentado aqui investiga as interações entre a proteína anti-apoptótica MCL-1, a qual sua superexpressão tem a capacidade de bloquear a via de sinalização da apoptose permitindo o crescimento celular desordenado, e sete compostos químicos com potencial para inibir a proteína. A metodologia utilizada aqui também utiliza métodos quânticos baseados no DFT, além do MFCC. Os resultados apontaram que os resíduos Arg263, Met231, Val253 Phe270, Phe228, Phe254, Leu267 e Thr266 são de crucial importância para a ligação dos inibidores ao bolso hidrofóbico de MCL-1. Os métodos computacionais utilizados nos três estudos emergem como uma alternativa elegante e eficiente para o desenvolvimento de medicamentos.

Palavras-chave: DFT, MFCC, energias de interação, Receptor Androgênico, RNAr, MCL-1.

ABSTRACT

This thesis presents three researches carried out in the field of *ab initio* simulation, based on principles of Quantum Mechanics. The first study present the particularities of the interactions between the androgen receptor (AR) carrying a T877A mutation, which promotes promiscuity in the receptor, and two antagonist drugs cyproterone acetate and hydroxyflutamide (CPA and HFT) and an agonist compound (RLL). The interaction energies were obtained based on quantum chemistry methods based on Density Functional Theory (DFT) using the method Molecular Fragmentation with Conjugated Caps (MFCC). The results demonstrate the individual relevance between T877A-AR and the ligands, pointing out the main residues that make the interactions. The second study presents the analysis of the interaction between 16S ribosomal RNA and hygromycin B (hygB) is an aminoglycoside antibiotic that affects ribosomal translocation, using the MFCC strategy in light of the DFT and parameterization of dielectric constants. The results showed that nucleotides C1403, C1404, G1405, A1493, G1494, U1495, C1496 and U1498 had the most negative binding energies, making them strong candidates for stabilizing hygB in a suitable binding pouch of the 30S ribosomal subunit of prokaryotes. The third work presented here investigates the interactions between the anti-apoptotic protein MCL-1, which overexpression has the ability to block the apoptosis signaling pathway allowing for disordered cell growth, and seven chemical compounds with the potential to inhibit the protein . The methodology used here also uses quantum methods based on DFT, in addition to MFCC. The results showed that the residues Arg263, Met231, Val253 Phe270, Phe228, Phe254, Leu267 and Thr266 are of crucial importance for the binding of inhibitors to the hydrophobic pocket of MCL-1. The computational methods used in the three studies emerge as an elegant and efficient alternative for drug development.

Keywords: DFT, MFCC, interaction energies, Androgenic Receptor, rRNA, MCL-1.

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Escopo da Tese	20
2. Referencial Teórico	21
2.1 Câncer de próstata.....	21
2.1.1 Sintomas Triagem e Diagnóstico do Câncer de Próstata.....	22
2.1.2 Tratamento	25
2.1.3 Receptor Androgênico.....	26
2.1.4 Terapias Direcionadas à RA.....	29
2.1.5 Mutações no RA.....	31
2.2 Resistência à Antimicrobianos	33
2.2.1 RNA como Alvo Terapêutico de Antimicrobianos.....	35
2.2.2 Aminoglicosídeos	38
2.2.3 Higromicina B.....	40
2.3 Apoptose	40
2.3.1. BCL-2	44
2.3.2 MCL-1.....	45
2.3.3 Inibidores de MCL-1	47
2.4 Modelagem Molecular	48
2.4.1 Simulações Computacionais de Sistemas Biológicos	50
2.4.2 Mecânica Molecular	51
2.4.3 Métodos Semi-Empíricos	51
2.4.4 Mecânica Quântica.....	52
2.4.5 Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	52
2.5 Justificativa.....	54
3. Objetivos	57

3.1 Objetivos Gerais.....	57
3.2 Objetivos Específicos	57
4. Energias de Interação Entre dois Antiandrogênicos e um Agonista do Receptor Androgênico na presença da Mutação T877A no Câncer de Próstata: uma Análise Química Quântica.....	59
4.1. Materiais e Métodos	59
4.1.1 Obtenção das Estruturas Cristalográficas	59
4.1.2 Determinação do Estado de Protonação e Otimização da Estrutura	59
4.1.3 Determinação das Energias de Interação e Simulação Computacional.....	60
4.2 Resultados e Discussões	62
4.2.1 Energias de Interação dos Resíduos de Aminoácidos mais Relevantes.....	67
4.3. Conclusões.....	81
5. Energia de Interação do RNA com o Aminoglicosídeo Higromicina B Calculado Dentro de uma Estrutura DFT	83
5.1 Materiais e Métodos	83
5.2 Resultados e Discussões	88
5.3 Conclusões.....	99
6. Investigação das Energias de Interação entre a Proteína Anti-apoptótica MCL-1 e Inibidores	102
6.1 Materiais e Métodos	102
6.2 Resultados e Discussões	105
6.3 Conclusões.....	123
7. Conclusões e Perspectivas	125
Referências Bibliográficas	127
ANEXO I.....	147

1.1 Introdução

Atualmente o mundo vem enfrentando diversos desafios no campo da saúde. Estes problemas variam entre surtos de doenças contagiosas, doenças evitáveis por vacinação, aumento da resistência a antimicrobianos, altos índices de obesidade, poluição ambiental, além do impacto de doenças sistêmicas como o câncer, por exemplo.

No intuito de aprimorar o enfrentamento destas doenças a OMS (Organização Mundial da Saúde) divulgou um relatório listando as dez maiores problemáticas a serem estudadas e, conseqüentemente, combatidas. Entre estas doenças estão a resistência à antibióticos e o câncer (OMS,2019).

A resistência, pelas bactérias patogênicas aos fármacos antimicrobianos é, nos dias de hoje, uma das grandes ameaças à saúde em todo o mundo, estando cada vez mais difícil tratar infecções por meio de fármacos eficazes (Zaman *et al.*, 2017; Ventola, 2015).

A lista de infecções difíceis de serem tratadas devido a resistência é crescente, sendo a problemática levada à níveis perigosos, onde estima-se que 10 milhões de pessoas podem morrer por ano até 2050 (OMS, 2019). Apesar disso, poucos avanços têm sido observados no desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para combater o problema e atualmente tem-se enfrentado uma escassez de antibióticos.

O câncer é uma doença provocada pela multiplicação descontrolada de células do organismo (Braot, 2013; Rosales-hernandez, *et al*, 2009). As células cancerosas têm inibidos os mecanismos que regulam o crescimento e a multiplicação, devido normalmente a danos do material genético celular. Estes danos são causados, dentre outros fatores, por agentes externos, como o fumo, radiação solar, vírus ou alimentação. Atualmente, a doença é uma das principais causas de morte no mundo.

Estima-se que no Brasil, biênio 2019-2020, haverá a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. O perfil epidemiológico observado no

país demonstra que os tipos mais frequentes em homens serão próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Já em mulheres, os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago figurarão entre os principais tipos (INCA, 2019).

Atualmente, os tratamentos disponíveis contra o câncer, de maneira geral, não demonstram a eficácia pretendida, esclarecendo o grande interesse no desenvolvimento de novos agentes anticâncer. Mesmo com diversas opções no mercado farmacêutico, a complexidade da doença dificulta a descoberta de novos tratamentos (Begley; Ellis, 2012).

No enfoque destas problemáticas é necessário o conhecimento preciso da bioquímica estrutural dos compostos utilizados como agentes anticâncer, bem como seus mecanismos de ligação, levando a uma melhor compreensão da ação destas moléculas.

Assim, a utilização de ferramentas computacionais baseadas em modelagem molecular e, adicionalmente, química quântica, podem ser promissoras, visto que são uma alternativa simples e eficiente para o entendimento e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (Roche, 2008; Russo, 2002).

Logo, observa-se que o emprego de metodologias de modelagem molecular permite gerar conhecimentos sobre fatores estruturais, parâmetros geométricos e energéticos, propriedades eletrônicas fundamentais para o estudo de moléculas isoladas ou mesmo sistemas macromoleculares complexos. Diante disso, neste trabalho, são utilizadas técnicas quânticas de modelagem molecular no estudo das energias de interação de modelos biológicos complexos envolvendo o receptor androgênico e compostos antagonistas e um agonista, RNA e um aminoglicosídeo e a proteína antiapoptótica MCL-1 e inibidores.

1.1 Escopo da Tese

Esta tese compreende a descrição do trabalho desenvolvido pela discente Katyanna Sales Bezerra em seu doutoramento no campo da modelagem molecular, sendo executado no Laboratório de Biofísica e Computação Científica/DBF/CB/UFRN. O trabalho aqui demonstrado foi dividido entre as seguintes seções:

Em um primeiro momento é exposto o referencial teórico para toda a abordagem deste trabalho bem como os objetivos que concernem o mesmo.

A seguir, é apresentado o trabalho Energias De Interação Entre Dois Antiandrogênicos E Um Agonista Do Receptor Androgênico na Presença da Mutação T877A no Câncer de Próstata: Uma Análise Química Quântica, onde a partir de métodos da mecânica quântica baseada na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e na técnica MFCC (Fracionamento Molecular com *Caps* conjugado) foram desvendadas as interações energéticas entre dois antagonistas e um agonista do receptor androgênico (RA).

Logo depois são expostos os resultados do trabalho Energia Da Interação Do RNA com o Aminoglicosídeo Higromicina B Calculado Dentro de uma Estrutura DFT, no qual avaliamos as peculiaridades que envolvem a interação entre o RNAr e um aminoglicosídeo, também utilizando métodos quânticos como DFT e a técnica MFCC.

Seguindo a esquemática, em outro momento apresenta-se o trabalho Investigação das Energias de Interação Entre a Proteína Anti-Apoptótica MCL-1 e Inibidores, que descreve-se o emprego de métodos da bioquímica quântica baseada modelo DFT e da técnica MFCC para avaliar as interações entre a proteína MCL-1 e sete inibidores.

Por fim, são expostas as conclusões finais e perspectivas obtidas neste trabalho.

2. Referencial Teórico

2.1 Câncer de Próstata

É evidente que o câncer é um problema de saúde pública, principalmente entre os países em desenvolvimento, onde espera-se que, nas próximas décadas, o efeito do câncer na população chegue a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados para 2025. Em homens brasileiros, as maiores frequências de casos de câncer encontradas são próstata, pulmão, intestino e estômago. No Brasil, em 2018, 15.391 homens morreram vítimas do câncer de próstata (CaP) e espera-se que para cada ano do triênio 2020-2022 ocorram 65.840 novos casos da doença, correspondendo a um risco estimado de 62,95 casos novos a cada 100 mil homens (INCA, 2020).

A próstata é uma pequena glândula localizada na pelve masculina. Ela é responsável em produzir 40% a 50% dos fluidos que constituem o sêmen ou esperma (Calvete *et al.*, 2003). Esta glândula tem várias funções úteis: participa do controle da produção de urina da bexiga e na transmissão do líquido seminal durante a ejaculação, como glândula exócrina, contribui para o plasma seminal um espectro de pequenas moléculas e enzimas como fibrinolisinase, coagulase entre outras que facilitam a fertilidade e estão envolvidas na coagulação (Yin *et al.*, 2008). Além disso, o líquido prostático protege a viabilidade espermática, reduzindo a acidez da uretra, também promove e melhora a motilidade espermática. Como glândula endócrina, auxilia no metabolismo rápido da testosterona para diidrotestosterona androgênica mais potente e, portanto, também influencia funções hipotalâmicas e hipofisárias, e atua como um agente antibacteriano. A próstata é sede de três principais causas de morbidade em homens: hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata e prostatite (Cuzick *et al.*, 2014).

O câncer de próstata é uma doença heterogênea compreendendo a ação de fatores genéticos e ambientais, A etiologia do câncer de próstata não é totalmente compreendida. A doença está intimamente associada à idade do paciente, sendo este o fator de risco mais significativo para o desenvolvimento do CaP, com uma prevalência de aproximadamente 35% em homens entre 60-69 anos e 46% em homens de 70 a 81 anos (Yin *et al.*, 2008), já a incidência da doença é 1,56 vezes maior em negros quando comparado ao da população caucasiana.

Pacientes com histórico familiar de CaP apresentam um risco estimado em até 3,5 vezes maior de desenvolver a doença (Johns LE, Houlston, 2003), o risco relativo é maior em homens que tem parentes de primeiro grau acometidos pela doença. A história familiar é evidentemente importante, mas apenas 35% do risco familiar é atualmente explicado por genes conhecidos. Embora rara, a mutação BRCA2 confere um risco 8,6 vezes maior em homens com menos de 65 anos de idade, outras mutações tais como, BRCA1, HOXB13, NBS1 e CHEK28 são relatadas por promoverem aumento apreciável do risco em desenvolver CaP (Cuzick *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que o tabagismo é um fator de risco significativo para câncer de próstata fatal, assim como também há grandes evidências de que o excesso de peso ou a obesidade aumentam o risco de desenvolver a doença (Islami *et al.*, 2014). Além disso, também é relatada a influência da vasectomia no surgimento do câncer de próstata, isso provavelmente deve-se a alterações nos níveis do hormônio testosterona em homens submetidos a este tratamento (Honda *et al.* 1988; John *et al.* 1995).

2.1.1 Sintomas, Triagem e Diagnóstico Do Câncer De Próstata

O paciente com câncer de próstata precoce é geralmente assintomático, entretanto, os sintomas do CaP associados ao aumento da próstata podem ocorrer na doença

em estágio inicial e avançado, e incluem as seguintes características (Merriel; Funston; Hamilton, 2018):

- Micção frequente durante o dia e à noite
- Dificuldade em iniciar, manter ou interromper o fluxo da urina
- Fluxo de urina fraco ou interrompido
- Esforço para urinar
- Incapacidade de urinar (retenção urinária)
- Perda de controle durante a micção
- Dificuldade em urinar em pé
- Dor ao urinar ou ejacular
- Presença de sangue na urina ou no sêmen.

É necessário enfatizar que muitos destes sintomas também podem ser atribuídos à condições benignas da próstata.

Já os sinais e sintomas do câncer de próstata em estágio avançado (chamado câncer metastático da próstata) incluem também (Merriel; Funston; Hamilton, 2018):

- Dor nos ossos progressivamente intensa, principalmente na região lombar
- Perda de peso inexplicável
- Fadiga
- Falta de ar ao realizar atividades previamente bem toleradas
- Inchaço das pernas relacionado à obstrução do tecido linfático.

Atualmente observa-se que há um aumento nas taxas de incidência do CaP, principalmente em países desenvolvidos, isso deve-se, entre outras causas, a evolução dos métodos diagnósticos (Eastham, 2017). O método de triagem mais conhecido para a investigação da doença é a dosagem de PSA (Antígeno Prostático

Específico), uma serino protease que liquefaz o coágulo seminal, sendo produzida por células normais e malignas da próstata. Como tal, é específico da próstata, mas não é específico do câncer de próstata.

O PSA que circula no sangue é inativo e é encontrado, principalmente, em complexo com os inibidores de protease α 1-antitripsina e α 2-macroglobulina. O restante circula como PSA livre (não ligado), que é rapidamente eliminado do sangue por filtração glomerular com uma meia-vida estimada de 12 a 18 horas. A eliminação do PSA ligado aos inibidores da protease é lenta (meia-vida estimada de 1 a 2 semanas), e também é amplamente eliminada pelos rins (Carlsson *et al*, 2014).

O teste de PSA foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA em 1994 para a detecção precoce do câncer de próstata (Eastham, 2017). O uso generalizado do teste PSA aumentou significativamente a proporção de homens diagnosticados com câncer em estágio inicial, com mais de 80% dos cânceres diagnosticados recentemente sendo clinicamente confinados em órgãos. O PSA sérico está fortemente correlacionado com o risco e o resultado do câncer de próstata (Carlsson *et al*, 2014).

Apesar do PSA ser o marcador mais utilizado no auxílio ao diagnóstico do câncer de próstata, sozinho, seu nível elevado não define necessariamente que o indivíduo está acometido pelo câncer de próstata. O aumento nos níveis de PSA no CaP é causado pelo aumento da produção de PSA e pela ruptura do tecido entre a próstata e os capilares, permitindo assim a presença de mais PSA no soro, no entanto, outros fatores podem aumentar os níveis de PSA, tais como, manipulações da próstata (exame do toque retal, biópsia), prostatite, hiperplasia prostática benigna (BPH) e ejaculação (Kachur, 2018; Eggener; Cifu; Nabhan, 2015; Andriole; Marberger; Roehrborn, 2006). Em 2017 a *U.S. Preventive Services Task Force* (USPSTF) recomendou, a partir da emissão de uma diretriz, que homens com idade entre 55 a 69 anos devem ser informados sobre os benefícios e malefícios da

triagem para o câncer de próstata e oferecer testes de PSA, se assim o desejarem (USPSTF, 2016). Por outro lado, é importante enfatizar que o êxito do tratamento do câncer está imediatamente relacionado à detecção precoce da doença.

Outro exame utilizado para o rastreio do CaP é o toque retal, que consiste em um procedimento simples utilizado para examinar o reto inferior e outros órgãos internos. É uma maneira rápida e fácil de verificar a saúde da próstata do homem, sendo o teste mais utilizado para tal, apesar de suas limitações, já que somente as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadas, deixando de 40% a 50% dos tumores fora de alcance. As estimativas de sensibilidade deste exame variam entre 55% e 68% e seu valor preditivo positivo é estimado entre 25% a 28% (Merriel; Funston; Hamilton, 2018; INCA, 2002).

Ambas as recomendações de triagem visam equilibrar os benefícios da detecção do câncer de próstata para prevenir a mortalidade, porém, nenhum dos dois exames têm 100% de precisão. Assim, podem ser oportunos exames complementares (Kachur, 2018).

A biópsia é o único método eficiente na confirmação do câncer. A retirada de amostras de tecido da glândula para análise é feita com auxílio da ultrassonografia. Outros exames de imagem também podem ser auxiliares no diagnóstico, como tomografia computadorizada, ressonância magnética e cintilografia óssea (Kachur, 2018).

2.1.2 Tratamento

Devido à sua heterogeneidade, o tratamento do CaP tem demonstrado ser um desafio importante, para o qual seleção cuidadosa do regime de tratamento mais adequado é necessário. Atualmente, a seleção da terapia é baseada em estadiamento e estado geral de saúde do paciente. CaP localizado e de baixo risco é geralmente gerenciado por vigilância ativa. Para intermediários e especialmente

doença de alto risco, é necessária terapia mais invasiva, onde a cirurgia ou radioterapia são atualmente as opções padrão de tratamento. No cenário metastático, a terapia de privação à andrógenos é o tratamento principal, visando a sinalização do receptor androgênico (RA) (Helsen *et al.*, 2014).

Desde a década de 1940, as terapias, destinadas a bloquear a atividade da RA, vem sendo utilizadas, onde altas doses de estrogênio eram administradas com o intuito de criar um estado de privação de andrógenos no tumor (Huggins, 1942). Este método foi aprimorado ao longo dos anos e levou ao uso de agonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante que interferem no eixo hipotalâmico-hipofisário, levando à privação de andrógenos. Isso inicialmente leva a regressão do tumor, mas eventualmente o tumor se adapta aos baixos níveis de andrógeno, desenvolvendo uma maneira alternativa de ativar ou ignorar o RA (Higano; Crawford, 2011; Massard; Fizazi, 2011). Esta fase da doença é definida como câncer de próstata resistente à castração (CRPC).

2.1.3 Receptor Androgênico

O receptor de andrógeno (RA) é um membro da superfamília de esteroides e receptores nucleares, a qual é composta por mais de 100 membros. Entre essa grande família de proteínas, apenas cinco receptores esteroides são encontrados em vertebrados - estrogênio, progesterona, androgênio, glicocorticóide e receptores mineralocorticóides - são conhecidos (Singh; Gauthier; Labrie, 2000). A função de RA é regulada pela ligação de andrógenos, que inicia alterações conformacionais sequenciais do receptor que conseqüentemente afetam as interações proteína-receptor e interações DNA- receptor (Freedman, 1998).

É caracterizado como uma proteína solúvel que atua como um fator de transcrição intracelular representado por 919 aminoácidos, com o gene RA localizado no cromossomo X (Gao *et al.*, 2005). O gene RA está envolvido em muitas atividades biológicas, incluindo papéis importantes no desenvolvimento e

suporte dos sistemas biológico reprodutivo, cardiovascular, neuro-musculoesquelético, hemopoiético e imunológico.

RA é expresso principalmente em tecidos-alvo androgênicos, como próstata, tecido músculo esquelético, fígado e sistema nervoso central (SNC), com o mais alto nível de expressão observado na próstata, glândula adrenal e epidídimo (Keller; Ershler; Chang, 1996). Este receptor pode ser ativado pela ligação de andrógenos endógenos, incluindo testosterona e 5 α -di-hidrotestosterona (5 α -DHT). Fisiologicamente, o RA funcional é responsável pela diferenciação sexual no útero e alterações puberais masculinas. Nos homens adultos, o andrógeno é principalmente responsável por manter a libido, espermatogênese, massa e força muscular, densidade óssea mineral e eritropoiese. (Goodman *et al*, 2001). As ações do andrógeno nos tecidos reprodutivos, incluindo próstata, vesícula seminal, testículo e estruturas acessórias, são conhecidos como efeitos androgênicos, enquanto os efeitos de retenção de nitrogênio do androgênio nos músculos e ossos são conhecidos como efeitos anabólicos (Gao *et al.*, 2005).

Semelhante a outros receptores nucleares, estruturalmente o RA possui três domínios funcionais principais: um domínio N-terminal seguido por um domínio de ligação ao DNA (DBD) estritamente conservado, uma região de dobradiça curta e um domínio de ligação ao ligante na região C-terminal (LBD, do inglês *ligand binding domain*) (Nadal *et al*, 2017).

O domínio N-terminal da RA é variável e apresenta uma função moduladora, com a região DBD caracterizada por dois *zinc fingers* que reconhecem sequências específicas de DNA (Davey; Grossmann, 2016). Esses *zinc fingers* favorecem a ligação do gene RA às regiões promotora e potenciadora dos genes regulados por RA, permitindo a ativação das funções de domínios de ligação N-terminal e de ligação a ligantes, promovendo ou dificultando a transcrição desses genes. O domínio de ligação ao ligante consiste em onze hélices α e quatro folhas β curtas com uma cavidade central de ligação ao ligante. Os resíduos das hélices RA-LBD 3,

5 e 11 estão diretamente conectados ao ligante, enquanto os modelos de mutação mostram que a integridade do domínio de ligação ao ligante é essencial para um sistema complexo adequado de ligação ao ligante (Gao *et al*, 2005). Além desses domínios, duas funções de ativação transcricional fazem parte do RA: a função de ativação 1 (AF-1), localizada no domínio N-terminal que normalmente está ativo, e a função de ativação dependente de ligante 2 (AF-2), localizado no domínio de ligação ao ligante, caracterizado por uma superfície hidrofóbica composta por hélices 3, 4 e 12, de importância significativa para a instalação do local de ligação do co-regulador. Além disso, o último desempenha um papel importante nas interações que ocorrem entre os domínios de ligação da porção N-terminal e os ligantes (Davey *et al*, 2016, Slagsvold *et al*, 2000).

Assim como outros receptores esteróides, o RA não ligado está principalmente localizado no citoplasma e associado a um complexo de proteínas de choque térmico (HSPs) através de interações com o domínio de ligação ao ligante. Após a ligação de um agonista, o receptor passa por uma série de alterações conformacionais: as proteínas HSPs dissociam-se do RA, e este, por sua vez, sofre dimerização, fosforilação e translocação para o núcleo, mediado pelo sinal de localização nuclear (Gao *et al.*, 2005). O receptor translocado liga-se ao elemento de resposta androgênica (ARE), que é caracterizado pela sequência consenso de seis nucleotídeos 5'-TGTTCT-3' espaçada por três nucleotídeos aleatórios estando localizado na região promotora ou potenciadora dos alvos do gene RA. O recrutamento de outros coreguladores de transcrição (incluindo coativadores e corepressores) e a maquinaria transcricional garantem ainda a transativação da expressão gênica regulada por RA. Todos esses processos são iniciados pelas alterações conformacionais induzidas pelo ligante no domínio LDB (Heinlein; Chang, 2002; Shang *et al*, 2002; Gao *et al*, 2005).

Logo, o receptor androgênico é um elemento determinante para a transcrição nuclear na próstata, sendo expresso em todas as formas e estágios histológicos do

câncer de próstata. Atuando para regular a propagação das células cancerígenas ativando a quinase, além de permitir a expressão de inibidores do ciclo celular, proporcionando um controle negativo da proliferação celular (Culig *et al.*, 2000).

2.1.4 Terapias Direcionadas à RA

Como os andrógenos têm um papel central no desenvolvimento da próstata e carcinogênese da próstata, o RA é o alvo fundamental da terapia sistêmica para CaP (Taplin; Balk, 2004). O RA é um fator de transcrição dependente de ligante que é ativado quando os andrógenos estão presentes (Helsen *et al.* 2014). Em resposta à ligação de androgênio, ele pode iniciar a expressão de genes que contêm elementos de resposta, que são reconhecidos pelo receptor (Denayer *et al.*, 2010). De fato, em células da próstata, o receptor androgênico controla o equilíbrio entre a diferenciação e a proliferação celular. No tecido prostático normal, a ação do receptor esta ligada a diferenciação, já durante o CaP, desde a fase inicial ao avançado, a ação está gradualmente relacionada a proliferação. Essa mudança é acompanhada de uma regulação negativa de genes que suportam a diferenciação e, também, da regulação positiva de genes que promovem proliferação (Hendriksen *et al.*, 2006). Assim, o crescimento descontrolado de células associado ao CaP é refletido por uma mudança no programa de transcrição de RA em direção a um conjunto de genes proliferativos (Wang *et al.*, 2009).

Levando em consideração o fato de que os andrógenos e as vias de sinalização de RA são considerados os elementos oncogênicos cruciais na carcinogênese da próstata, eles constituem um alvo importante em relação ao seu tratamento (Massard *et al.*, 2011). No contexto metastático, a terapia de privação de andrógenos (ADT) é a terapia predominantemente utilizada, consistindo na redução dos níveis de hormônios androgênicos por meio de cirurgia ou medicamento usado para inibir o crescimento de células cancerígenas (Higano2011), o cenário farmacêutico, incluindo também o uso de castração química e antiandrogênicos. Castração química refere-se ao uso de agonistas do hormônio liberador do hormônio

luteinizante (LHRH), interferindo no testículo do eixo hipotálamo-hipófise, causando privação de androgênio.

Antiandrogênios ou antagonistas de RA impedem que os androgênios promovam sua função biológica por ligação direta, inibindo competitivamente a ligação do andrógeno ao receptor de androgênio (Helsen *et al.*, 2014). São úteis no tratamento de câncer de próstata, hiperplasia benigna da próstata, puberdade precoce e calvície masculina, assim como hirsutismo nas mulheres e acne em ambos os sexos. O mecanismo de ação dos antagonistas da RA impede a indução de uma série de mudanças conformacionais que protegem os RAs contra a degradação de proteínas, isso resulta em uma regulação negativa do receptor ou na incapacidade do RA em eliminar seus HSPs, bloqueando a homodimerização ou modificando as alterações conformacionais, de modo que a ligação dos coreguladores não seja mais possível. A alteração das mudanças conformacionais também pode resultar em um aumento do acesso do RA às fosfatases, o que impediria a fosforilação e a transativação do receptor (Sanderson, 2015).

Os antiandrogênicos são estruturalmente de duas classes diferentes: os esteroidais e os não esteroidais.

A classe de antiandrogênios esteroidais permite a inibição do *feedback* negativo do hipotálamo, levando a uma redução nos níveis plasmáticos de testosterona. Em analogia a estrutura dos andrógenos, os primeiros antiandrogênios esteroidais continham um esqueleto esteróide para garantir a ligação ao receptor. Vários antiandrogênios esteróides (acetato de ciproterona, acetato de megestrol e acetato de medroxiprogesterona) foram inicialmente utilizados para obter o máximo bloqueio androgênico em pacientes, no entanto, graves desvantagens como hepatotoxicidade, interferência na libido, além de efeitos colaterais cardiovasculares reduziram seu uso clínico (Helsen *et al.*, 2014).

O acetato de ciproterona (CPA) é um antiandrógeno esteróide que foi inicialmente desenvolvido como um agente sintético gestagênico que teria a função de atuar como contraceptivo, mas estudos levaram à sua identificação como um inibidor competitivo do receptor de andrógeno. O CPA (Cyprostat® ou Androcur®) é um derivado sintético da progesterona com atividade antiandrogênica e progestágena usada em situações em que existe dependência androgênica, sendo conduzido não apenas no câncer de próstata, mas também na acne grave, hirsutismo feminino e precoce puberdade, entre outros (Singh *et al.*, 2000). O tratamento com CPA mostrou resultados promissores quando administrado em monoterapia com privação de androgênio para o câncer de próstata avançado e é uma droga interessante para o tratamento da doença. Infelizmente, leva a efeitos colaterais indesejados, como hepatotoxicidade, aumento do risco de tromboembolismo, inibição da espermatogênese e problemas cardiovasculares (Chen *et al.*, 2017).

Quanto à classe de antiandrógenos não esteróides, as funções androgênicas são inibidas no hipotálamo e nos tecidos-alvo, de modo que os sinais de feedback negativo são bloqueados e a formação de testosterona é aumentada nos testículos (Chen; Clegg; Scherb, 2009). A flutamida (Eulexin® e Drogenil®) foi o primeiro antiandrogênio não esteróide a ser desenvolvido. É uma pró-droga cujo metabólito ativo (hidroxiflutamida) atua inibindo a ligação da testosterona e 5 α -dihidrotestosterona (DHT) para o receptor de androgênio.

2.1.5 Mutações do RA

A atividade de RA pode ser aprimorada não apenas por esteróides produzidos nos testículos e glândulas supra-renais, mas também por andrógenos que são sintetizados pelo próprio tumor (Helsen *et al.*, 2014). Dessa forma, o tumor suporta sua própria atividade de RA não controlada, levando ao CRPC. O termo CRPC foi introduzido com a constatação de que a produção de andrógenos é significativa na resistência das células do câncer de próstata à terapia de privação à andrógenos

(ADT). Esta condição é comumente encontrada em pacientes submetidos à terapia prolongada e é uma forma letal da doença com possibilidades limitadas de tratamento. Muitos mecanismos foram sugeridos na tentativa de elucidar o surgimento do CRPC. Uma das explicações possíveis explora a ocorrência de mutações RA, resultando em alterações constitutivas principalmente no domínio LDB (Taplin *et al.*, 1999). Em certos casos, essas mutações no RA tornam o receptor promíscuo, sendo ativado por uma grande quantidade de ligantes que levam à ativação anormal da sinalização do RA no CRPC (Zhou2010).

Essas mutações parecem ser o resultado da pressão seletiva induzida pelo próprio tratamento e, em alguns casos, os receptores mutantes podem ser ativados por ligantes alternativos, incluindo antiandrogênicos utilizados na terapia (Taplin *et al.*, 1999). A maioria das mutações identificadas até o momento no *cluster* da região LDB do receptor, parecem oferecer uma vantagem no crescimento celular devido à especificidade reduzida do ligante, aumento da sensibilidade a andrógenos e aumento da atividade constitutiva (Shi *et al.*, 2002). Alguns estudos têm determinado a ocorrência de respostas das células do câncer de próstata a vários ligantes do RA (Coutinho-Camillo *et al.*, 2006).

A mutação mais frequentemente relatada, associada ao câncer de próstata, é uma substituição de treonina por alanina em aminoácido 877 (T877A). A mutação T877A parece ser mais prevalente em pacientes que recidivam após o tratamento com o agente antiandrogênico hidroxifutamida (Taplin *et al.*, 1999) e, estudos *in vivo* demonstraram que quando comparado ao receptor do tipo selvagem (sem mutação), o receptor mutante aumentou a atividade transcricional na presença de outros hormônios esteróides, como estradiol e progesterona e também ao antiandrogênio como acetato de ciproterona (Brooke *et al.*, 2015).

2.2 Resistência à Antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é antiga caracterizando-se como um problema dinâmico e crescente. As causas globais desta problemática são superpopulação, migração, aumento do uso de antibióticos, pressão seletiva, além de saneamento e sistema de esgoto precário (Singer; Shaw; Rhodes; Hart, 2016). O tratamento com antibióticos é uma das principais abordagens da modernidade, entretanto, atualmente os estudos e pesquisas na área não conseguiram manter o ritmo da descoberta de antibióticos diante de patógenos emergentes resistentes (Marshall; Levy, 2011). Além disso, insucessos persistentes no desenvolvimento e descoberta de novos antibióticos, aliado ao uso imprudente de antibióticos são condições predisponentes associados ao surgimento da resistência (Nathan, 2004).

Nos dias atuais, a resistência antimicrobiana representa uma grave ameaça global de progressiva preocupação à saúde humana, animal e ambiental (Aslam *et al.*, 2018). Recentemente, um estudo evidenciou que o consumo global de antimicrobianos na pecuária proporcionarão impactos na economia e na saúde pública nos próximos anos, visto que projeta-se que até 2030 o uso de antimicrobianos utilizados em animais aumente em 67% nos países mais populosos do mundo (van Boeckel *et al.*, 2015).

Em grande parte, a ocorrência da resistência deve-se ao surgimento, disseminação e persistência de bactérias multirresistentes “*Multidrug-resistant*” (MDR) (Davies; Davies, 2010). Estes microrganismos existem no nicho animal, humano e ambiental moldando um compartilhamento interligado desses patógenos nessa tríade. As causas plausíveis do surgimento de cepas MDR incluem o uso excessivo de antibióticos em animais e humanos, a venda de antibióticos sem prescrição médica, o notável aumento no fluxo de viagens internacionais, falta de saneamento, bem como também higiene, e liberação de antibióticos não metabolizados ou seus resíduos destes no meio ambiente através de excretas

(Aslam *et al*, 2018). Esses fatores contribuem, conseqüentemente, para a pressão seletiva e o surgimento de infecções bacterianas por MDR.

Logo, uso efetivo de agentes antimicrobianos é extremamente prejudicado devido à possível resistência desenvolvida desde o momento inicial em que um determinado composto é utilizado. Isso é um fator complicador, principalmente, quanto à utilização de agentes antimicrobianos usados para tratar infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias. Assim, a problemática da resistência é grave e reconhecida globalmente. Apesar de várias recomendações e resoluções serem propostas, até o momento pouco progresso tem sido feito (Zaman *et al.*, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019) alertou que uma era pós-antibiótica resultará em infecções frequentes e pequenas lesões poderão resultar em morte se não agirmos contra a resistência aos antibióticos. Assim, o desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica é uma estratégia considerada eficaz no combate a bactérias resistentes, entretanto, vários fatores contribuem para a redução na busca por novos agentes antimicrobianos (Zaman *et al.*, 2017).

Um destes fatores refere-se à redução de investimentos na pesquisa por novas drogas antibióticas pelas indústrias farmacêuticas, isso ocorre porque hoje, estes medicamentos, não são mais considerados um investimento economicamente prudente para a indústria farmacêutica. Como os antibióticos são usados por períodos relativamente curtos e geralmente são curativos, eles não são tão lucrativos quanto os medicamentos que tratam condições crônicas, como diabetes, distúrbios psiquiátricos (Zaman *et al.*, 2017; Ventola, 2015).

Neste sentido, o declínio do investimento privado e a falta de inovação no desenvolvimento de novos antibióticos estão minando os esforços para combater infecções resistentes a medicamentos (WHO, 2014). Logo, levando-se em consideração a ameaça persistente da resistência antimicrobiana é necessária a

inovação em pesquisas que produzam soluções urgentes para o desenvolvimento de novos fármacos antibióticos ativos contra cepas resistentes.

2.2.1 RNA Como Alvo Terapêutico de Antimicrobianos

O ácido ribonucleico (RNA) é uma biomolécula dinâmica e diversificada que desempenha um papel cada vez maior e crucial na biologia celular. Por décadas, o RNA foi considerado um transportador passivo de informações da sequência de DNA, mas descobertas notáveis nos últimos anos levaram ao reconhecimento de seu papel fundamental em muitos aspectos da fisiologia celular, incluindo regulação de genes, síntese de proteínas, reações enzimáticas e infecção viral (Tor *et al.*, 2003).

A forma pela qual as células expressam suas informações genéticas é a síntese proteica, assim, as sequências de nucleotídeos existentes na molécula de DNA são copiadas na forma de RNA a partir do processo de transcrição, que, por sua vez, é traduzido em cadeias de aminoácido, que produzem proteínas. No decorrer da transcrição, uma das fitas do DNA atua como molde para a produção do RNA e, portanto, o sequenciamento nucleotídico desta é definido pela complementariedade com a fita-molde. Os nucleotídeos que compõem a molécula são covalentemente ligados a partir da enzima RNA-polimerase, que catalisa a construção das ligações fosfodiéster conforme os nucleotídeos são adicionados na direção 5'-3' (Alberts et al., 2008; Nelson; Cox, 2014).

O RNA é um polímero linear de fita simples, formado por nucleotídeos, que podem ser resultantes de componentes purinas e pirimidinas (adenina, guanina, citosina e uracila). Estes nucleotídeos possuem em sua estrutura três elementos característicos: base nitrogenada, pentose e fosfato. Esses componentes são ligados entre si por meio do grupo 5'-fosfato de uma unidade nucleotídica com o grupo 3'-hidroxil da unidade vizinha, construindo ligações do tipo fosfodiéster. O RNA que tem origem a partir da transcrição dos genes é chamado RNA mensageiro (RNAm), e carrega informações sobre as sequências de

aminoácidos a serem organizadas. Na tradução, há o auxílio do RNA transportador (RNAt), que funciona como um adaptador apto a reconhecer e ligar-se ao códon do RNAm e ao aminoácido correspondente. (Alberts *et al.*, 2008). A partir dessa fase o processo ocorre nos ribossomos, que são grandes complexos catalíticos, compostos por proteínas e RNA ribossomais (RNAr) que organizam-se em duas subunidades: uma menor, responsável por formar o complexo com o RNAt, intermediando o pareamento com os códons do RNAm, e uma subunidade maior, que catalisa a formação de ligações peptídicas que unem os aminoácidos, originando uma cadeia polipeptídica. (Alberts *et al.*, 2008; Nelson; Cox, 2014)

Iniciada a tradução, cada aminoácido é acrescentado à cadeia de alongamento, em um ciclo de reações incluindo, de maneira geral, três etapas: ligação do RNAt, formação das ligações peptídicas, e translocações nas subunidades maior e menor. Ao final destas etapas, o ciclo recomeça e novos aminoácidos podem ser incorporados à cadeia crescente, até que todo o RNAm seja traduzido.

Dessa maneira, a síntese proteica é um processo vital, e medicamentos que atuem em alguma de suas etapas conseguem retardar ou impedir a proliferação de microrganismos como bactérias.

Atualmente, os RNAs têm mostrado um amplo espectro de aplicação em diversas áreas da saúde humana, incluindo diagnóstico de doença, prognóstico e seleção terapêutica (Byron, 2016). Além disso, os RNAs têm sido vistos como alvos em potencial na descoberta de medicamentos, especialmente no tratamento de doenças infecciosas, câncer e doenças genéticas (Cooper; Wan; Dreyfuss, 2009; Stefaniak, 2015, Li *et al.*, 2010). Isso ocorre porque os RNAs apresentam duas grandes vantagens quando comparados a outras biomoléculas: (1) sua posição na via de expressão gênica, o que significa que a síntese de múltiplas proteínas pode ser inibida pela inibição de uma única molécula de RNA; e (2) sua estrutura tridimensional diversificada, que suporta o design e a manipulação de uma molécula

com um nível de simplicidade característico do DNA, enquanto exibe flexibilidade na estrutura e diversidade em função próxima à das proteínas (Guo, 2010).

Apesar do crescente conhecimento sobre as funções reguladoras das moléculas de RNA, os desafios contínuos dificultam o *design* de novos medicamentos. Um exemplo é a falta de informações estruturais, com informações atualmente provenientes principalmente da análise de seqüência primária (Pyle; Schlick, 2016). Além disso, os alvos de RNA permanecem amplamente inexplorados, assim como estudos específicos de RNA, cujos quais são necessários devido às suas propriedades físico-químicas exclusivas - que incluem flexibilidade incomum, carga altamente negativa e grandes bolsas de ligação plana. Atualmente, o alvo de RNA para drogas mais bem definido é o RNA ribossômico (RNAr).

Os ribossomos estão entre as máquinas moleculares mais conservadas e sofisticadas da célula sendo os componentes centrais do aparelho de síntese proteica. É composto por duas subunidades, uma pequena (30S em bactérias e 40S em eucariotos) e outra grande (50S em bactérias e 60S em eucariotos), que se unem para formar a partícula completa do ribossomo (70S em bactérias e 80S em eucariotos) (Stokes; Brown, 2015). Enquanto a pequena subunidade decodifica informações genéticas fornecidas pelo RNA mensageiro (RNAm), a subunidade grande liga-se covalentemente a aminoácidos transportados pelo RNA de transferência (RNAt) em uma proteína nascente. Durante a síntese proteica, o RNAm e o RNAt são movidos pelo ribossomo pelo processo dinâmico de translocação. O movimento sequencial de RNAts do sítio A (aminoacil) para o sítio P (peptidil), seguido de uma migração para o sítio E (saída), é acoplado ao movimento de seus códons associados no RNAm (Sergiev *et al.*, 2018). Muitos antibióticos têm como alvo o RNAr de procariontes e alterando sua tradução de proteínas. Entre estes compostos, os aminoglicosídeos têm sido utilizados com sucesso na terapia há mais de meio século (Hong; Zeng; Xie, 2014).

2.2.2 Aminoglicosídeos

Os antibióticos aminoglicosídeos têm sido um componente importante do nosso arsenal de medicamentos antibacterianos desde a década de 1940, especialmente para infecções gram-negativas graves. Todos os aminoglicosídeos compartilham propriedades físicas, químicas e farmacológicas semelhantes (Krause *et al.*, 2016). São potentes antibióticos de amplo espectro que atuam através da inibição da síntese de proteínas. As principais preocupações com o uso de antibióticos aminoglicosídeos são nefrotoxicidade e ototoxicidade.

Os aminoglicosídeos são ativos contra vários organismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo particularmente potentes contra membros da família Enterobacteriaceae, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*, *Providencia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.* e *Serratia spp.* (Ristuccia; Cunha 1985; Aggen *et al.*, 2010). Além disso, os aminoglicosídeos são ativos contra *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis* (Ikäheimo *et al.*, 2000), os agentes causadores de peste e tularemia, respectivamente. A classe também possui boa atividade contra *Staphylococcus aureus*, incluindo isolados resistentes à meticilina e vancomicina, *P. aeruginosa* e, em menor grau, *Acinetobacter baumannii* (Ristuccia; Cunha 1985; Aggen *et al.* 2010 ; Krause *et al.*, 2016).

Uma mudança do uso sistêmico desta classe de antibióticos começou na década de 1980 com a disponibilidade de cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas de terceira geração, que eram consideradas menos tóxicas e ofereciam cobertura mais ampla do que os aminoglicosídeos. No entanto, o aumento da resistência a essas classes de drogas, combinado com um conhecimento mais extenso das bases da resistência aos aminoglicosídeos, levou a um interesse renovado nos aminoglicosídeos ao desenvolvimento de novos agentes desta classe (Krause *et al.*, 2016).

Esta classe de antibióticos é caracterizada por apresentarem açúcares hidrofílicos multifuncionais que possuem várias funcionalidades amino e hidroxil. As porções amina são protonadas principalmente em meios biológicos, logo, esses antibióticos podem ser considerados espécies policationicas.

Quanto ao mecanismo de ação os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica por ligação, com alta afinidade, à subunidade bacteriana do ribossomo 30S, que é composta por 21 proteínas ligadas a uma subunidade 16S RNAr, próxima ao sítio A (Kotra; Haddad; Mobashery, 2000; Ryu; Rando, 2001). Embora os membros da classe dos aminoglicosídeos tenham uma especificidade modificada para diferentes regiões no sítio A, todos alteram sua conformação. Como resultado dessa interação, o antibiótico promove a má tradução, induzindo a leitura incorreta do códon e resultando em uma síntese proteica propensa a erros, permitindo que aminoácidos incorretos se agrupem em um polipeptídeo que é subsequentemente liberado para causar danos à membrana celular e em outros locais (Krause *et al.*, 2016). Alguns aminoglicosídeos também podem afetar a síntese de proteínas bloqueando o alongamento ou inibindo diretamente a iniciação (Kotra; Haddad; Mobashery, 2000). O mecanismo exato de ligação e os efeitos subsequentes variam de acordo com a estrutura química, mas todos os aminoglicosídeos são bactericidas e normalmente produzem um efeito pós-antibiótico prolongado.

Não obstante o uso prolongado, os principais problemas na prática clínica estão relacionados à toxicidade, o rápido aumento no surgimento de cepas bacterianas resistentes, afinidades de ligação relativamente modestas e a pequena seletividade demonstrada por esses compostos (Hamasaki *et al.*, 1998). Assim, técnicas que auxiliam na caracterização das interações ligante-RNAr são bem-vindas no desenho de medicamentos visando novos ligantes seletivos.

Atualmente, existem pelo menos 10 aminoglicosídeos disponíveis para uso clínico, disponíveis em todo o mundo, com cinco agentes principais em uso

disseminado (estreptomicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina e amicacina) (Krause *et al.*, 2016).

2.2.3 Higromicina B

A higromicina B (hygB) é um aminoglicosídeo inicialmente isolado de *Streptomyces hygroscopicus*, que atua contra células procarióticas e eucarióticas (Tai *et al.*, 2007). Este antibiótico inibe a síntese de proteínas bacterianas através da ligação à hélice 44 da subunidade ribossômica (30S), próximo ao local aminoacil-RNA_t (Moazed; Noller, 1987; Brodersen *et al.*, 2000). Porém, preferencialmente, o hygB atua na síntese proteica, impedindo a etapa de translocação da fase de alongamento e, ao contrário da maioria dos aminoglicosídeos, afeta a síntese proteica sem afetar significativamente a leitura incorreta *in vivo* (McGaha; Champney, 2007). Essa inibição monofásica da síntese de proteínas indica que o hygB provavelmente interage em um único local no ribossomo. Além disso, foi observado que o hygB impede a montagem da subunidade 30S devido à inibição pelo bloqueio da síntese de 16R RNAr.

Mesmo sendo aprovado para uso na medicina veterinária, sabe-se que seus derivados podem se acumular nos organismos de animais, normalmente destinados ao consumo humano, sendo potencialmente tóxicos se ingeridos (Ali, 2003).

2.3 Apoptose

Além do maquinário de reparo do ciclo celular, as células danificadas, onde o dano está além do reparo, podem induzir uma resposta de morte celular programada altamente específica para a célula, sendo a apoptose a forma mais comum de morte celular fisiológica em formas multicelulares. A apoptose é um processo de morte celular controlada, pelo qual a ativação de vias específicas de sinalização da morte leva à exclusão de células do tecido (Elmore, 2007; Kerr, 2002).

O processo de apoptose é caracterizado por ser evolutivamente conservado no qual há eliminação ativa de células durante o desenvolvimento. Seus perfis

fenotípicos incluem fragmentação do DNA e condensação da cromatina, encolhimento celular e formação de corpos apoptóticos, que são eliminados por fagocitose sem a necessidade de iniciar uma resposta inflamatória sistêmica. A realização da apoptose requer nova expressão gênica e síntese proteica. Este processo de morte celular progrediu como um mecanismo crítico, equilibrando a proliferação celular e remodelando ativamente os tecidos durante o desenvolvimento (Elmore, 2007; Kerr; Wyllie; Currie, 1972).

Assim como a diferenciação e crescimento, a morte celular é um aspecto essencial do ciclo de vida de uma célula eucariótica, o controle do número de células é consequência da equiparidade entre perda e ganho de células (Hengartner, 2000).

Os mecanismos que compõem apoptose são altamente sofisticados e complexos, compreendendo uma cascata de eventos moleculares dependente de energia. Atualmente, os estudos indicam a existência de duas vias apoptóticas principais: a via extrínseca e a via intrínseca. Entretanto, há evidências de que as duas vias estão ligadas e que as moléculas de uma via podem influenciar a outra (Elmore, 2007).

A via extrínseca da apoptose é caracterizada pelos tipos I e II tipo I. A sinalização extrínseca do tipo I da apoptose é mediada pela ativação dos chamados "receptores de morte", caracterizados por serem receptores de superfície celular que transmitem sinais apoptóticos após a ligação com ligantes específicos. Estes receptores pertencem à superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR, do inglês *tumor necrosis factor receptor*), incluindo TNFR-1, o receptor Fas/CD95 e os receptores TRAIL DR-4 e DR-5. Todos os membros da família TNFR consistem em subdomínios extracelulares ricos em cisteína que permitem que eles reconheçam seus ligantes com especificidade, resultando na trimerização e ativação do respectivo receptor de morte (Elmore, 2007; Igney; Krammer, 2002). A sinalização subsequente é mediada pela porção citoplasmática do receptor de morte que possuem uma sequência conservada denominado domínio de morte (DD, do inglês

death domain). Moléculas adaptadoras tais como FADD ou TRADD possuem seus próprios DDs pelos quais eles são recrutados para os DDs do receptor de morte ativado, formando o complexo de sinalização indutora de morte (DISC, do inglês *death inducing signalling complex*). Além de seu DD, o FADD também contém um domínio efetor de morte (DED, do inglês *death effector domain*) que através interação homotípica DED-DED recruta procaspase-8 para o DISC (Singh *et al.*, 2010; Martinvalet; Zhu; Lieberman, 2005). A concentração de várias moléculas de procaspase-8 no DISC leva à sua ativação autocatalítica e liberação de caspase-8 ativa. As caspases-8 ativas processam o efetor de caspases que, subsequentemente, cliva substratos resultando na morte celular. Células que promovem a indução destes produtos e, principalmente, induzem a apoptose dependente de caspases são classificadas como células do tipo I (Elmore, 2007; Kang *et al.*, 2002).

Já na via extrínseca do tipo II, a sinalização proveniente do receptor ativado não consegue gerar uma cascata de sinalização dependente de caspase forte o suficiente para a execução da própria morte celular. Neste caso, o sinal precisa ser amplificado vias apoptóticas dependentes de mitocôndrias. A conexão entre a cascata de sinalização de caspases e as mitocôndrias é realizada pelo membro da família BCL-2, Bid. O Bid é clivado pela caspase-8 e em sua forma truncada, transloca-se para as mitocôndrias onde atua em conjunto com membros da família BCL-2 pro-apoptótica, Bax e Bak, para induzir a liberação do citocromo c e outros fatores pro-apoptóticos mitocondriais no citosol (Elmore, 2007; Kang *et al.*, 2002; Hengartner, 2000). O citocromo citosólico c se liga ao Apaf-1 monomérico que, a partir de uma alteração conformacional dependente de dATP (do inglês *Deoxyadenosine triphosphate*), oligomeriza-se para formar um apoptossoma, um complexo que desencadeia a ativação do iniciador procaspase-9. A caspase-9 ativada inicia subsequentemente uma cascata de caspase envolvendo caspases efetoras, como por exemplo, as caspase-3, caspase-7 e caspase-6, resultando finalmente na morte celular (Hengartner, 2000).

Enquanto isso, a via intrínseca ocorre após danos ao DNA, onde há um aumento no nível de Bax e uma diminuição no nível de BCL-2, o que causa a mitocôndria uma liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c. Esses fatores causam a ativação da procaspase-9, seguida por efetores apoptóticos. Recentemente, verificou-se que, em resposta a danos no DNA, é necessária a ativação da caspase-2 antes da permeabilização mitocondrial e liberação do citocromo c (Elmore, 2007). A expressão de ciclina-D3 e caspase-2 em células humanas induz potencialmente a apoptose. Após a liberação do citocromo c, ele se liga ao fator de ativação da protease apoptótica Apaf-1 (do inglês *apoptotic protease activating factor 1*) e forma um complexo ativo simétrico 'apoptossoma' de maneira dependente do nucleotídeo dATP/ATP. O apoptossoma recruta posteriormente procaspase-9 para formar uma enzima ativa, que ativa ainda mais as caspases da cascata, o que leva a morte celular programada (Singh *et al.*, 2010).

Apesar da descrição destas vias, os mecanismos moleculares que levam à excisão controlada de células nos tecidos por apoptose não são totalmente compreendidos.

Levando-se em consideração sua importância, durante a última década, a apoptose atraiu muitas atenções devido à sua potencial aplicação na terapêutica de várias doenças humanas. Para manter a função de todo o organismo, milhões de células morrem e proliferam todos os dias. Assim, a morte por apoptose é essencial para a regulação do crescimento do organismo e manutenção da homeostase tecidual. Quando há desequilíbrio entre morte e proliferação celular, há susceptibilidade na ocorrência de doenças, tais como, algumas patologias agudas (acidente vascular cerebral, ataque cardíaco, insuficiência hepática), câncer, síndromes neurodegenerativas, diabetes entre outras (D'Arcy, 2019).

2.3.1 BCL-2

A família BCL-2 tem sido identificada por seu papel essencial na apoptose. Logo após a descoberta do BCL-2 no cenário do linfoma de células B na década de 80, várias proteínas homólogas foram identificadas. Os membros da família BCL-2 são considerados como tal devido aos seus domínios de homologia com BCL-2 (BH) e envolvimento na regulação da apoptose (Warren; Wong-Brown; Bowden, 2019). Os domínios BH proporcionam as interações dos membros da família e podem apresentar função pró ou anti-apoptótica. De modo especial, essas proteínas são categorizadas em uma das três subfamílias; proteínas anti-apoptóticas, pró-apoptóticas e formadoras de poros (pró-apoptóticas). A caracterização da subfamília tem sido especificamente baseada no domínio BH e transmembranar e na categoria da função que assumem (Roberts et al., 2012).

A função da família BCL-2 na regulação apoptótica é descrita a partir dos membros anti-apoptóticos e pró-apoptóticos existentes em um estado de fluxo competitivo para influenciar a ativação dos executores formadores de poros. A proporção de membros da subfamília pró e anti-apoptóticos presentes em uma célula pode ser alterada por várias vias de sinalização, transmitindo efetivamente informações sobre o estresse celular, como nutrientes disponíveis, danos ao DNA e processamento de proteínas (Warren; Wong-Brown; Bowden, 2019; Vaux; Cory; Adams, 1988).

Os domínios de BH são considerados centrais na padronização de subfamílias, pois facilitam a interação dos membros da família. O BH3 foi apontado como um domínio importante, pois demonstrou ser vital para a interação do BCL-XL anti-apoptótico e executores BAK, bem como para sua atividade apoptótica. Em particular, o domínio BH3, é central para a função apoptótica das proteínas nesta família. Este se liga a quatro bolsas hidrofóbicas (P1-P4) dos membros anti-apoptóticos da família BCL-2, incluindo MCL-1, sequestrando assim a proteína apoptótica contendo BH3 e impedindo sua capacidade de ativar apoptose. Os

domínios BH3 consistem em uma α -hélice anfipática contendo quatro resíduos hidrofóbicos que se ligam às proteínas anti-apoptóticas. O domínio BH3 é crucial para o correto dobramento de uma bolsa hidrofóbica, na qual os membros do BCL-2 podem interagir. Consequentemente, demonstrou-se que mutações pontuais ou deleções do domínio BH3 reduzem significativamente a atividade pró-apoptótica de várias proteínas exclusivas do BH3 (Boise *et al.*, 1993). Um inibidor de molécula capaz de deslocar a proteína pro-apoptótica contendo BH3 do membro da família anti-apoptótica poderia restaurar a sinalização da apoptose dentro de uma célula cancerígena (Lee *et al.*, 2019).

Além do entendimento quanto ao fluxo competitivo, existem várias hipóteses sobre como os membros da família BCL-2 interagem, incluindo interações diretas e indiretas entre os membros da família. Cada uma das proteínas somente BH3 ou anti-apoptóticas possui padrões de ativação, localização e resposta a estímulos específicos de morte ou sobrevivência. A seletividade de ligação entre membros das diferentes classes de proteínas BCL-2 também varia. Da mesma forma, os membros da família BCL-2 pró-apoptóticas podem se ligar e limitar seletivamente a atividade de BAX ou BAK. Todas essas interações podem variar entre os tipos de células e estágio de desenvolvimento, e isso pode causar o delineamento dos papéis dos membros da família BCL-2. Dentre as isoformas de BCL-2 pertencentes à classe anti-apoptótica estão: BCL-X, MCL-1, BCL-2 α e BCL-2 β (Roberts *et al.*, 2012).

2.3.2 MCL-1

A proteína MCL-1 (do inglês *myeloid cell leukaemia-1*) é um membro anti-apoptótico da família de proteínas BCL-2, originalmente identificada em 1993 na diferenciação de células mielóides (Hird; Tron, 2019; Kozopas *et al.*, 1993). Desde então, o MCL-1 tem demonstrado ser expresso em vários tipos celulares e emergiu como um membro chave dessa família de moléculas de controle da apoptose.

O gene humano MCL-1 está localizado no cromossomo 1q21. A proteína MCL-1 é composta por 350 aminoácidos e contém domínios BH (Kozopas *et al.*,

1993). Os domínios BH são sequências curtas que mediam as interações proteína-proteína entre membros da família e são importantes para a regulação da apoptose (Hird; Tron, 2019). MCL-1 contém domínios BH3 (P1, P2e P3) na porção N-terminal, mas não apresenta o domínio BH4 presente em BCL-2 E BCL-X. Assim como muitos outros membros da família BCL-2, o MCL-1 também contém um domínio C-terminal transmembranar (TM) que tem como função localizar MCL-1 em várias membranas intracelulares, principalmente na membrana mitocondrial externa (Yang et al., 1995). Essa localização é consistente com a função de MCL-1 no controle de eventos mitocondriais importantes durante apoptose. A porção N-terminal de MCL-1 contém dois domínios PEST, o qual é rico em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina. A proteína MCL-1 tem uma meia-vida curto nas células, geralmente na faixa de algumas horas (Craig, 2002; Hird; Tron, 2019).

MCL-1 é expresso em uma ampla variedade de tipos celulares, com variações específicas para cada tecido e diferenciação nos níveis de expressão. No sistema linfóide, MCL-1 é abundantemente expressa no compartimento das células B do centro germinativo (Krajewski et al., 1995). A rápida indução e degradação desta proteína sugere que ela desempenha um papel importante no controle apoptóticos em vários tipos de células em resposta a mudanças ambientais rápidas (Craig, 2002). Consistente com isso, a proteína MCL-1 é essencial para a embriogênese (Michels; Johnson; Packham, 2005) e para desenvolvimento e manutenção de linfócitos B e T em animais (Opferman *et al.*, 2003), também desempenhando papel crítico na sobrevivência de células malignas.

A superexpressão de MCL-1 em camundongos transgênicos demonstrou uma alta incidência de linfoma, demonstrando que esta molécula pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de neoplasias (Michels; Johnson; Packham, 2005). A MCL-1 é amplamente expressos em células malignas humanas e dados sugerem esta pode ser usada como marcador prognóstico/preditivo útil (Kitada et al., 1998). Como o bloqueio da função de MCL-1 é suficiente para promover apoptose em células cancerígenas, o MCL-1 pode ser um alvo importante para novas terapias

anticâncer (Michels; Johnson; Packham, 2005). Além de seu papel na malignidade em neoplasias, a regulação positiva de MCL-1 vem sendo implicada na sobrevivência inadequada de células infectadas por vírus ou bactérias e em condições inflamatórias, sugerindo que interferir na ação desta proteína pode ser terapêuticamente benéfica em muitas outras doenças (Sly et al., 2003). Dada a associação entre apoptose defeituosa e câncer, não é surpreendente que muitas pesquisas com MCL-1 estão no contexto do tratamento contra o câncer.

2.3.3 Inibidores de MCL-1

Existem várias razões pelas quais os inibidores do MCL-1 são, atualmente, muito estudados. Uma das razões está centrada no fato de que MCL-1 é encontrado em uma das regiões mais amplificadas no câncer (Michels; Johnson; Packham, 2005). Outro fator é a variedade de tipos tumorais dependentes de MCL-1, incluindo, entre outros, leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiplo (MM), carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão de células não pequenas. Sem dúvida, o desenvolvimento de inibidores de MCL-1 é uma nova fonte potencial de medicamentos anticâncer. Nesse sentido, houve uma atividade estável nos últimos dez anos quanto à busca por agentes que promovessem a inibição desta proteína (Hird; Tron, 2019).

Os compostos conhecidos, até os dias atuais, que promoveram a inibição de MCL-1 em estudos *in vivo* e *in vitro* pode ser descritos como inibidores de MCL-1 derivados de ácido indol 2-carboxílico e compostos ácidos não indóis. Um exemplo de derivado de ácido indol 2-carboxílico é o AZD5991, um inibidor macrocíclico potente e seletivo para MCL-1 (Akçay et al., 2016; Johannes et al., 2017; Tron et al., 2018). AZD5991 é um ligante subnanomolar de MCL-1 humano, estudos apontaram que a inibição de MCL-1 por AZD5991 causou rápida interrupção da ação de MCL-1 resultando na ativação da via apoptótica mitocondrial e, conseqüentemente, morte celular em células sensíveis. AZD5991 mostrou atividade preferencial em linhas celulares hematológicas e subconjuntos de células malignas no câncer de pulmão

de células não pequenas e câncer de mama (Caenepeel *et al.*, 2018; Kotschy *et al.*, 2016). Além disso, ensaios *ex vivo* demonstraram que o AZD5991 também é ativo na indução de apoptose em células de pacientes com MM (Tron *et al.*, 2018). A segurança e a atividade clínica do AZD5991 estão sendo avaliadas em ensaios clínicos de fase 1 em pacientes com MM, Linfoma não Hodgkin (LNH), Linfoma de Células T (LCT), Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), Leucemia Linfocítica Pequena (LLP) e Síndrome de Richter (Hird; Tron, 2019).

Como exemplo de inibidores de MCL-1 formados por compostos ácidos não indóis podemos citar o AM-8621 e o S63845. Estudos confirmaram a atividade do AM-8621 demonstrando que esse composto interrompe a interação entre MCL-1 e BCL-2 pró-apoptótico resultando na apoptose dependente de Bax e morte celular. Maior sensibilidade a AM-8621 foi observado em linhas celulares hematológicas, incluindo MM, LMA (Leucemia Mielóide Aguda), Linfoma de células B e subconjuntos de LLA (Leucemia Linfóide Aguda) e linfoma de Burkitt (Hird; Tron, 2019). Estudos em *design* de medicamentos produziram o composto S63845, o primeiro inibidor de MCL-1 potente e seletivo com atividade *in vivo* relatado na literatura (Kotschy *et al.*, 2016). Ensaios celulares demonstraram que S63845 induz apoptose dependente de Bax/Bak e mata linhas celulares hematológicas (MM, LMC, LMA, LLA) (Kotschy *et al.*, 2016), esses achados foram traduzidos como uma resposta antitumoral *in vivo*. Em outro estudo, a infusão de S63845 uma vez ao dia por 5 dias consecutivos causou regressão completa de tumor subcutâneo MM e LMA em modelos de rato (Kotschy *et al.*, 2016). Atualmente este composto está em fase 1 de avaliação e testes clínicos.

2.4 Modelagem Molecular

Os modelos servem, antes de tudo, para simplificar a análise de fenômenos que são de grande importância, propiciando uma ilustração didática de circunstâncias muito complicadas, que não são facilmente acessíveis. Neste sentido, a modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e

visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos que permitem estabelecer relações entre a estrutura e as propriedades da matéria (Kitano, 2002).

A aplicação de modelos teóricos para representar e manipular a estrutura de moléculas, estudar reações químicas e estabelecer relações entre a estrutura e propriedades da matéria constituem o domínio de atuação da modelagem molecular (Freitas, 1998). A técnica também permite a análise conformacional, cálculos de propriedades estéreo-eletrônicas e análises de variações estruturais que auxiliam na interpretação das correlações entre as estruturas químicas de uma série de compostos com a variação da atividade farmacológica. (Drews, 2000; Drews, 2003).

Os métodos utilizados em modelagem molecular baseiam-se nas leis físicas que governam os átomos e moléculas, permitindo simular o seu comportamento (DREWS, 2000). Assim, se quisermos entender a nível molecular de que modo uma proteína, por exemplo, realiza a sua tarefa no nosso organismo, a simulação pode nos fornecer pistas sobre quais domínios de uma proteína estão diretamente envolvidas nessa tarefa, bem como as consequências da modificação desses domínios. A partir deste fundamento, estudos realizados por meio da modelagem em moléculas isoladas ou complexos droga-receptor permitem prever e descrever várias características destas estruturas, expondo dados que estejam próximos aos valores determinados experimentalmente (Santamaria *et al.*, 1998), tais como propriedades geométricas e energéticas, propriedades termodinâmicas e propriedades eletrônicas (Leach, 2001).

Há muitas opções quanto aos métodos de cálculo a serem aplicados em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados (Boyd, 1990).

A utilização de métodos computacionais no estudo de proteínas tem se tornado uma prática rotineira nos dias atuais. Entretanto, é necessário enfatizar que

o uso de modelagem molecular não é uma tarefa simples. O processo de modelagem dessas moléculas, devido à sua complexidade, emprega um grande conjunto de métodos computacionais de modo sistemático, de forma a facilitar e otimizar o processo. É nesta abordagem que a modelagem molecular se faz importante. Devido aos baixos custos operacionais e grande versatilidade, suas metodologias são fundamentalmente aplicadas na predição das estruturas terciárias e no processo de enovelamento de proteínas (Dill *et al.*, 2007).

2.4.1 Simulações Computacionais de Sistemas Biológicos

Estudos computacionais e teóricos de moléculas biológicas vêm avançando consideravelmente nas últimas duas décadas. Esses avanços foram, de certo modo, alcançados devido ao crescente número de estruturas disponíveis de proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, e também, pelas significativas melhorias metodológicas que tem sido feitas na área da física e que são relevantes para a análise de moléculas biológicas. Esses progressos tem permitido que estudos computacionais de processos bioquímicos sejam realizados com maior precisão e em condições que possibilitem a comparação direta com estudos experimentais. A combinação desses avanços com a evolução do poder computacional contribui para a expansão da aplicabilidade de métodos computacionais para biomoléculas (Sherrill, 2010; March; Matthai, 2009).

As metodologias que podem ser aplicadas durante uma análise através da simulação computacional dependerá da complexidade do sistema, do tipo de informação que se quer obter, além da avaliação do custo e poder computacional. Quanto maior o rigor teórico, maior a acurácia do resultado e maior o custo computacional. Como consequência, simulações de sistemas contendo um grande número de átomos geralmente empregam métodos clássicos de análise, permitindo uma maior velocidade de cálculo, contudo perdendo em exatidão (Brooijmans; Kuntz, 2003). Entretanto, apesar de limitados a sistemas com reduzido número de átomos, os métodos quânticos, pelo fato de incluírem a informação eletrônica em

seus cálculos, possuem a capacidade de apresentar grande exatidão em seus resultados (Cho *et al.*, 2009) e tem sido de grande importância para estimar as energias de interação entre proteína e ligantes (Zhou *et al.*, 2010).

Os métodos utilizados nas análises computacionais podem ser de três tipos: Mecânica Molecular, semi-empíricos e Mecânica Quântica.

2.4.2 Mecânica Molecular

A Mecânica Molecular baseia-se na visão clássica da estrutura molecular como um conjunto de esferas unidas por molas com constantes de força características. Os movimentos eletrônicos são ignorados e a energia do sistema é calculada somente em função das posições nucleares (Boyd, 1990). A mecânica molecular, portanto, considera o sistema estacionado no espaço, e não como conjuntos de átomos em movimento. Neste método a energia total de uma molécula é calculada pela soma das contribuições energéticas associadas a distâncias e ângulos de ligação, interações de van der Waals e interações eletrostáticas. Estas contribuições originam-se das diferenças de energia entre o valor padrão de cada parâmetro (com base em medidas experimentais) e o valor calculado para a molécula analisada. Para cada um destes critérios, associam-se correções energéticas em caso de afastamento dos valores padrão (Dewar *et al.*, 1985). Um campo de força é definido como uma coleção de parâmetros que entram nos cálculos das correções energéticas, derivadas das comparações com resultados de experimentos e de resultados de cálculos mais elaborados (Boyd, 1990).

2.4.3 Métodos Semi-Empíricos

Nos métodos semi-empíricos algumas informações são aproximadas ou completamente omitidas do Hamiltoniano que descreve o sistema, enquanto que algumas parametrizações são feitas para corrigir os erros oriundos da omissão de alguns termos, e gerando um melhor resultado quando comparado com dados experimentais. A vantagem destes métodos é que eles são muito mais rápidos que

os cálculos *ab initio*, e se a molécula a ser calculada for semelhante às moléculas da base de dados utilizada para parametrizar o método, os resultados podem ser muito bons. Contudo, se a molécula a ser calculada for significativamente diferente daquelas presentes no conjunto de parametrização, as respostas poderão não ser adequadas. Apesar de terem sido projetados especificamente para a descrição de moléculas inorgânicas, esses métodos tem sido bem sucedidos também na descrição de moléculas orgânicas (Thiel, 2005).

2.4.4 Mecânica Quântica

Nos métodos da Mecânica Quântica (também conhecidos como *ab initio*), os elétrons são explicitamente representados no cálculo, permitindo a derivação de propriedades que dependem da distribuição eletrônica e a análise de processos químicos como quebra e formação de ligações, este método toma-se como ponto de partida, para a resolução dos problemas, a equação de Schrödinger (Sant'anna, 2009). Neste método não se considera a repulsão elétron-elétron associada (correlação eletrônica), sendo seu efeito líquido incluído no cálculo como uma interação média do sistema. Também, a função de onda é formada a partir de combinações lineares de orbitais atômicos ou a partir de combinações lineares de funções de base. O desenvolvimento de métodos baseados na densidade eletrônica, como a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), associado ao aumento do poder computacional, permite análise de sistemas biológicos de alta complexidade através de cálculos quânticos, ou pela combinação destes com métodos de mecânica molecular para formar métodos híbridos, conhecidos como Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) (Vreven *et al.*, 2003).

2.4.4.1 Teoria do Funcional Da Densidade (DFT)

Na década de 60, Walter Kohn publicou, juntamente com Pierre Hohenberg, um artigo onde apresentavam uma reformulação da mecânica quântica baseada, não em funções de onda, mas na densidade eletrônica.

Esta teoria apresenta como objetivo principal obter informações a cerca de propriedades do estado fundamental das moléculas sem a necessidade da função de onda multieletrônica. Para o correto estabelecimento da dependência da densidade em relação à energia, dois teoremas foram estabelecidos por Hohenberg-Kohn. No primeiro teorema enfatiza-se a existência de uma relação entre as energias, incluindo a energia total e a densidade, assim, denota-se que a energia é um funcional da densidade. O segundo teorema demonstra que, o funcional da densidade atende ao formalismo do princípio variacional, portanto, a energia dada é sempre maior ou igual à energia obtida usando o funcional de densidade (Hohenberg; Kohn, 1964).

Sucessivamente, Kohn e Sham (1965), melhoraram o método aplicando equações de densidade alto-consistentes, para conjuntos de orbitais, estabelecendo com precisão o sistema real. Nas equações o termo da energia de troca e correlação é apresentado como um funcional da densidade considerando-se as interações elétron-elétron (Kohn; Sham, 1965).

Esta teoria é usada para estudar a estrutura eletrônica de sistemas de muitos corpos, em particular átomos, moléculas e sólidos. Atualmente, o DFT está entre os mais populares e versáteis métodos disponíveis para o estudo de química computacional e física do estado sólido (Kaduk *et al.*, 2012).

As aproximações mais utilizadas na construção dos funcionais de troca-correlação são as aproximações de densidade local (LDA - do inglês, *Local Density Approximation*) e a de gradiente generalizado (GGA - do inglês, *Generalized Gradient Approximation*). A LDA considera a energia de troca-correlação, como sendo a energia de troca-correlação para um gás de elétrons uniforme com a densidade ρ , que é conhecida de forma precisa. Assim, para LDA a energia de troca-correlação de um elétron em um dado ponto depende da densidade eletrônica nesse ponto, em vez de depender da densidade eletrônica em todos os pontos do espaço. Já a aproximação do gradiente generalizada (GGA) é um pouco mais

complexa do que a LDA, já que envolvem o gradiente da densidade. Nesta aproximação a energia de troca-correlação por elétron é substituída por uma função local da densidade eletrônica e do gradiente da densidade. Com o termo do gradiente da densidade eletrônica presente no funcional de troca-correlação espera-se que uma melhor descrição dos sistemas não homogêneos seja obtida (Burke, 2012; Atkins; Frieman, 2005).

2.5 Justificativa

Levando-se em consideração as informações apresentadas, denota-se a importância de estudos que investiguem as peculiaridades envolvendo a interação de sistemas fármaco-receptor. A busca por novos agentes que possam tratar de forma eficaz o câncer de próstata, resistência bacteriana e problemáticas que envolvem a apoptose irregular fundamenta a ideia deste trabalho.

Com base no exposto, podemos inferir que o receptor de andrógeno desempenha um papel importante na expressão de genes reguladores na próstata e em uma variedade de tecidos. Portanto, essa proteína é alvo dos principais medicamentos atualmente utilizados no tratamento da doença e é de grande interesse no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer de próstata. As particularidades encontradas na interação de agentes antiandrogênicos, na presença da mutação T877A no receptor androgênico, são extremamente importantes para o entendimento do mecanismo que envolve a alteração na função dos fármacos.

Atualmente, um número limitado de antibióticos está disponível para o tratamento de cepas multirresistentes de bactérias infecciosas, e a resistência até mesmo aos mais novos agentes antimicrobianos está aparecendo (Hancock, 2005). O aumento da resistência a antibióticos em populações microbianas exigiu a busca de alvos celulares alternativos para agentes antimicrobianos novos e existentes. Existem muitos antibióticos disponíveis que inibem a tradução em células bacterianas por ligação ao RNA, entretanto, em comparação com outras

macromoléculas, o RNA vem recebendo pouca atenção e poucos relatos investigam as interações ligante-RNA (Bryskier, 2005). Neste sentido, a compreensão quanto as regras subjacentes ao reconhecimento do RNAm pelo aminoglicosídeo hygB, é extremamente útil como base para o *design* de antagonistas potentes e seletivos da função do RNA.

Em outra vertente, a apoptose é a morte celular natural, que tem por finalidade manter o equilíbrio do desenvolvimento celular e a homeostase. Em muitos cânceres, por exemplo, o processo normal de eliminação de células indesejadas apresenta uma desregulação no processo apoptótico, levando ao crescimento descontrolado de tumores e ao desenvolvimento de resistência à quimioterapia. Drogas que restauram a apoptose podem matar seletivamente células cancerígenas a partir da ativação da via de sinalização da morte celular.

Logo, como o objetivo da terapia, a apoptose deve ser uma maneira satisfatória de curar algumas doenças, não apenas o câncer, mas também a obesidade, doenças degenerativas de neurônios e assim por diante. Dada a importância da apoptose, os fármacos que tem como alvo base a apoptose tem sido ostensivamente investigados nos últimos anos e espera-se que em um futuro próximo estes agentes estejam disponíveis para uso.

Levando-se em consideração os progressos consideráveis na descoberta de técnicas de simulação, que permitem um melhor conhecimento das interações específicas que ocorrem entre diferentes moléculas e seus respectivos receptores, é possível o conhecimento específico da bioquímica que envolve complexos droga-receptor com diferentes características químicas. Assim, este trabalho propõe investigar as interações bioquímicas quânticas da interação entre diferentes complexos.

Nesta perspectiva, o uso dos métodos da Mecânica Quântica pode ser uma boa ferramenta para o estudo de novas abordagens farmacológicas e, principalmente, quando se pretende avaliar um problema de forma eficiente e com

alta precisão (Cui *et al.*, 2016). A avaliação e compreensão deste mecanismo pode ser a chave para o design racional de novos fármacos. Logo, a simulação quântica utilizando DFT, infere ser uma ferramenta importante para a avaliação destas peculiaridades encontradas em vários sistemas biológicos.

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho pretende, como objetivo geral, apresentar uma investigação bioquímica quântica para determinar a interação entre o receptor androgênico com uma mutação T877A e os agentes antiandrogênicos acetato de ciproterona e hidroxiflutamida, além de um composto com ação agonista (RLL). Bem como também, realizar uma análise estrutural bioquímica *in silico* de um aminoglicosídeo em complexo com o RNAr e entre a proteína anti-apoptótica MCL-1 e inibidores.

Visa-se aqui investigar as interações intermoleculares dos ligantes avaliados com o local de ligação das proteínas, a fim de se obter informações importantes quanto aos resíduos de aminoácido que mais interagem com estes ligantes.

Logo, objetiva-se identificar os resíduos de maior importância nesta ligação, avaliando também as peculiaridades que envolvem os complexos fármacos-receptores aqui estudados.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar as energias de interação entre os resíduos dos receptores e os compostos analisados.
- Identificar os resíduos mais importantes quanto a afinidade fármaco-receptor.
- Mapear a energia de interação dos complexos utilizando diferentes constantes dielétricas.
- Descrever com base na Teoria da Densidade Funcional (DFT) as interações mais pertinentes entre os complexos avaliados, caracterizando os tipos de interação que acontecem e avaliá-los de acordo com a sua importância.

- Realizar uma comparação dos dados obtidos com os dados descritos na literatura.

4. Energias de Interação Entre dois Antiandrogênicos e um Agonista do Receptor Androgênico na presença da Mutação T877A no Câncer de Próstata: uma Análise Química Quântica

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Obtenção das Estruturas Cristalográficas

Para realizar os cálculos neste estudo, usamos a estrutura cristalográfica de raios-X da mutação T877A co-cristalizada com os dois antagonistas dos receptores de andrógenos, acetato de ciproterona (esteroidal) e hidroxifutamida (não esteroidal) e um agonista, o (2S)-3- [(4-cianonaftalen-1-il) oxí] -N- [4-ciano-3- (trifluorometil) fenil]-2-hidroxi-2-metilpropanamida (RLL). Esses sistemas complexos foram obtidos a partir do banco de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank* (RCSB/PDB). Este repositório contém informações sobre estruturas 3D de moléculas biológicas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. Os cristais obtidos são identificados nos códigos (resolução): 2OZ7 (1.8 Å), 2AX6 (1.5 Å) e 3RLL (1.7 Å), respectivamente (Bohl *et al.*, 2007, Bohl *et al.*, 2005, Duke *et al.*, 2011).

4.1.2 Determinação do Estado de Protonação e Otimização da Estrutura

Os estados de protonação dos ligantes, bem como os aminoácidos da proteína no pH fisiológico, foram verificados usando o código *MarvinSketch* versão 17.24 (*Marvin Beans Suite - ChemAxon*) e o pacote Propka 3.1 (Propka, 2011), respectivamente. Átomos de hidrogênio e cadeias laterais de aminoácidos, não resolvidos por difração de raios-X e, portanto, inexistentes nos arquivos cristalográficos, foram inseridos nas estruturas e submetidos à otimização clássica da geometria durante a fixação dos outros átomos. Essa otimização foi realizada usando o campo de força clássico CHRAMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*), que é configurado especificamente para moléculas orgânicas, resultando em uma maior precisão dos cálculos (Momany1992). Os critérios

utilizados para a tolerância de convergência foram 10^{-5} kcal/mol (variação total de energia), 10^{-3} kcal/mol (raiz quadrada média do gradiente RMS) e 10^{-5} Å (deslocamento atômico máximo).

4.1.3 Determinação das Energias de Interação e Simulação Computacional

A energia de ligação entre as drogas antiandrogênicas e o receptor de androgênios foi calculada usando um esquema baseado em MFCC dentro de uma estrutura de DFT (Albuquerque *et al.*, 2014). O método MFCC tem sido bastante utilizado para obter cálculos de energia de ligação entre complexos proteína-ligante e proteína-proteína (Bezerra *et al.*, 2018, Lima-Costa *et al.*, 2018; Bezerra *et al.*, 2019). Essa técnica possibilita analisar um grande número de aminoácidos em uma proteína a um custo computacional pequeno e é de importância significativa no estudo de sistemas biológicos complexos. A estratégia de fracionamento foi inicialmente usada para fornecer um cálculo *ab initio* eficiente, dividindo a energia de interação entre moléculas de proteína em quantidades individuais de interação que podem ser facilmente calculadas (Gordon *et al.*, 2012, Zhang; Zhang, 2003). Notavelmente, a proteína é quebrada em fragmentos de aminoácidos cujas extremidades recebem porções de seções vizinhas denominadas capas. Assim, a energia de interação entre uma proteína e um ligante pode ser obtida através de combinações de energias de interação entre fragmentos individuais do sistema analisado, permitindo também uma representação do ambiente local durante a fragmentação individual.

Aqui, destacou-se os ligantes antiandrogênicos como L e o resíduo que interage com L como R_i , denotando o i -ésimo resíduo de aminoácido. O limite de $C_1 (C_{i+1})$ é formado a partir do resíduo vizinho covalente ligado ao grupo de resíduos de amina R_i ao longo da cadeia proteica, fornecendo uma melhor descrição do componente eletrônico do meio. Para essas estruturas fragmentadas, a energia da interação entre o ligante e os fragmentos individuais, $E(L-R_i)$, é calculada de acordo com:

$$E(L - R_i) = E(L + C_{1-i} R_i C_{i+1}) - E(L + C_{1-i} C_{i+1}) - E(C_{1-i} R_i C_{i+1}) + E(C_{1-i} C_{i+1})$$

Eq.(1)

onde o primeiro termo, $E(L + C_{1-i} R_i C_{i+1})$, é a energia total do sistema formado pelo ligante e pelo resíduo; o segundo termo, $E(L + C_{1-i} C_{i+1})$, é a energia total do sistema formado pelas capas e pelo ligante. Além disso, o terceiro termo, $E(C_{1-i} R_i C_{i+1})$, é a energia total do resíduo com as capas, enquanto o quarto e último, $E(C_{1-i} C_{i+1})$, é a energia das capas com ligações oscilantes hidrogenadas.

Os cálculos energéticos para cada resíduo no local de ligação foram realizados usando o código Gaussian G09 (Frisch *et al.*, 2009), dentro do formalismo da DFT utilizando o funcional B97D (Grimme, 2006) que inclui termos de dispersão para melhorar a descrição de interações não-covalentes. Este funcional foi utilizado também em conjunto com a correção de dispersão D3 sob vácuo e o modelo de solvatação COSMO para calcular as energias de ligação de alguns complexos proteína-ligante dentro do esquema MFCC (Antony; Grimme, 2012).

Sabe-se que a maioria das interações biomoleculares ocorre em um ambiente eletrostático e, portanto, é importante considerar os efeitos das moléculas circundantes em muitos casos. Portanto, usamos o modelo de *Continuous Polarizable Continuum Model* (CPCM) (Cossi *et al.*, 2003) com a constante dielétrica ϵ igual a 10, 20 e 40, para representar o ambiente em torno de cada fragmento obtido pelo esquema MFCC. Para a exoansão dos orbitais de Kohn-Sham para todos os elétrons, selecionamos o conjunto triplo-zeta cc-pVTZ para os cálculos. O motivo dessa escolha se deve à importância da correlação eletrônica nas interações não covalentes, levando a requisitos específicos com base nos conjuntos de base utilizados nos cálculos, sendo o mais frequente os conjuntos de bases consistentes em correlação de Dunning (Dunning *et al.*, 1989). Uma variedade de testes mostra

que o cc-pVTZ geralmente supera significativamente o cc-pVDZ (Goldey; Dutoi; Head-Gordon, 2013). Além disso, estudos usando funcionais híbridos e duplos híbridos realizados em um conjunto de estruturas moleculares mostram que cc-pVTZ fornece uma descrição bem equilibrada deles (Alsunaidi; Wilson, 2016).

Para evitar a ausência de interações importantes, uma avaliação completa da convergência para a energia de ligação foi produzida de acordo com o raio da bolsa de ligação ao ligante, estabelecendo um limite para o número de resíduos de aminoácidos a serem investigados. Para isso, foi adicionado a energia de interação individual desses resíduos de aminoácidos, esferas imaginárias, com um raio de bolso r centrado no ligante e considerado igual a $R/2$, com $R=1, 2, 3, 4, \dots, n$, sendo n o próximo número natural na sequência. Assim, o raio da bolsa de ligação r alcança convergência sempre que a variação de energia no raio consecutivo for menor que 10%.

4.2 Resultados e Discussões

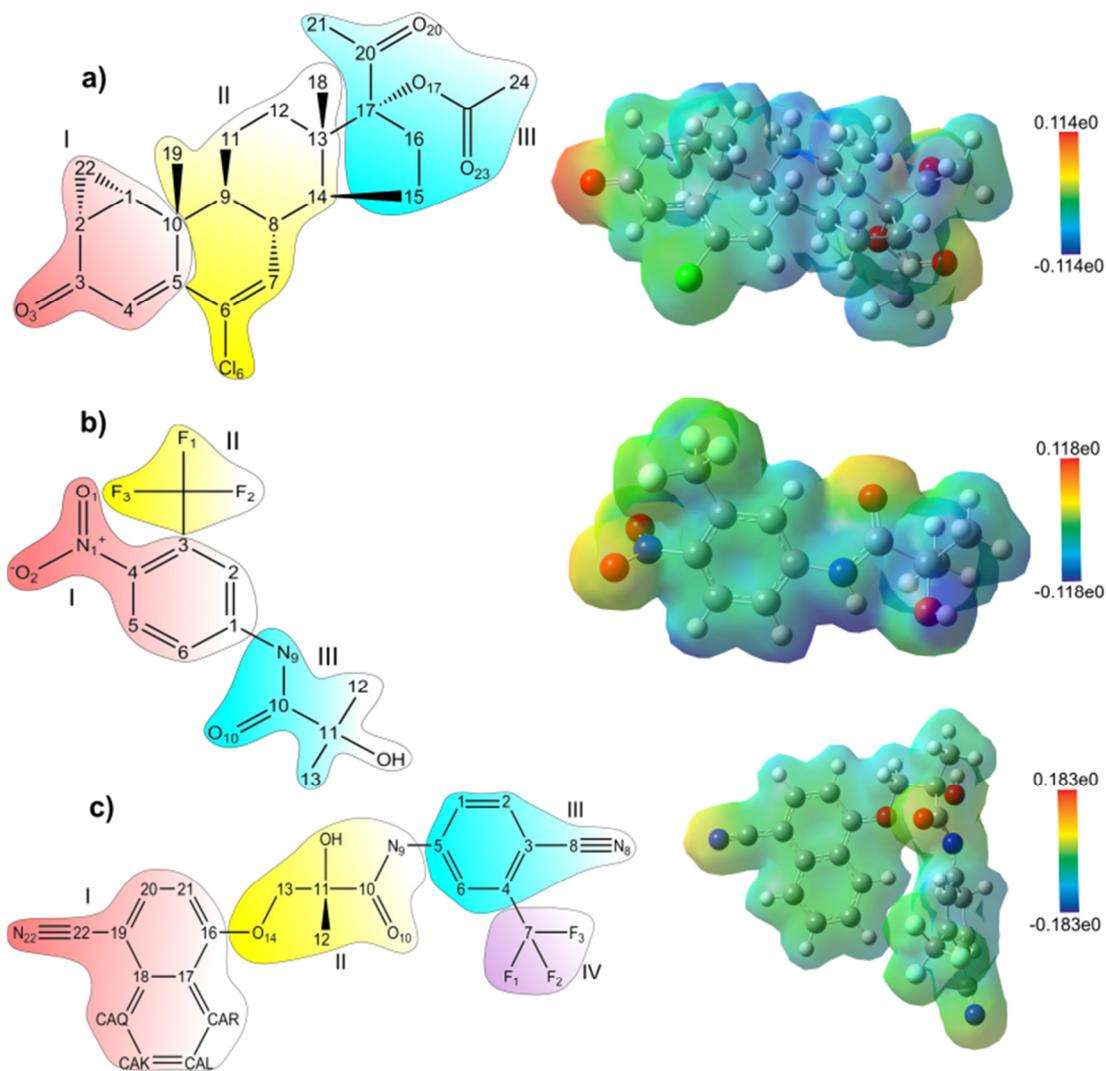
Devido à sua ampla heterogeneidade, o tratamento do câncer de próstata provou ser um obstáculo significativo, portanto, a escolha cuidadosa da abordagem de tratamento mais relevante é fundamental. Nos casos em que a doença atinge o estágio metastático, a terapia de privação de androgênio é a terapia predominantemente usada em vista da sinalização do receptor de androgênio (Klotz, 2012).

No entanto, a partir do surgimento de mecanismos como as mutações RA, essa terapia pode fornecer evolução tumoral em um ambiente desprovido de androgênio. Isso ocorre porque algumas dessas mutações podem levar à especificidade reduzida do ligante com o receptor RA. A mutação T877A é mais frequentemente encontrada em amostras de células de pacientes com câncer de próstata refratário. Essa mutação é mais comumente encontrada em pacientes que

recidivam após o tratamento com o antiandrógeno hidroxiflutamida, ainda mais quando estudos relatam que a presença dessa variação no aminoácido 877 aumenta a atividade transcricional de ação na presença de hormônios estradiol e progesterona, bem como nos antiandrogênicos acetato de ciproterona e hidroxiflutamida (Brooke, 2008). De fato, ensaios com células de linhagem dependentes de hormônios (LNCaP) confirmaram que o acetato de antiandrogênicos ciproterona e a hidroxiflutamida promovem o crescimento de células tumorais na presença da mutação T877A (Brooke, 2015). Embora vários estudos avaliem as bases estruturais da RA-LBD, a conversão antagonista-agonista devido à mutação T877A não é clara (Zhou *et al.*, 2010)

Para melhor descrever as interações que ocorrem em cada um dos ligantes com o receptor RA, dividimos os três ligantes em regiões com o objetivo de simplificar a investigação (Figura 4.1), portanto: CPA e HFT foram divididos em três regiões (I, II, III), enquanto o RLL foi dividido em quatro regiões (I, II, III, IV).

Figura 4.1 Estrutura química (lado esquerdo) dos dois antagonistas e um agonista, onde: (a) CPA, (b) HFT e (c) RLL, subdivididos em três regiões (I, II, III) para CPA e HFT e quatro regiões (I, II, III, IV) para o RLL. Também são mostradas (lado direito) as suas densidades eletrônicas de DFT projetadas em uma isosuperfície de potencial eletrostático.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os três compostos analisados estão em estado neutro (pH 7.5), o que pode ser verificado a partir da imagem mostrada na Figura 4.1 (direita), onde está exposta a distribuição eletrônica de densidade de CPA, HFT e RLL, uma vez que todas as moléculas apresentam uma característica predominantemente neutra (cor verde).

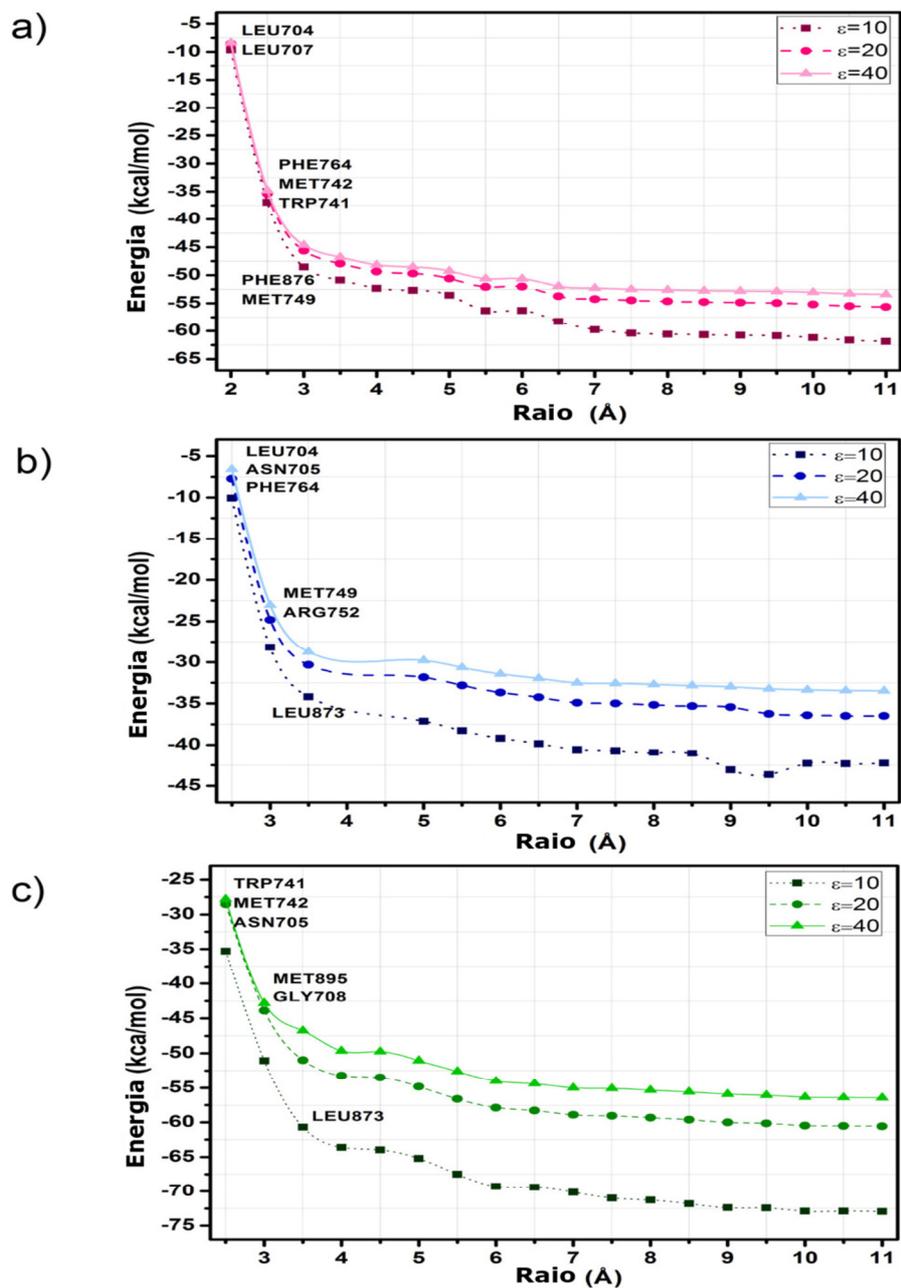
As energias de interação, bem como os critérios de convergência considerados, foram avaliados para cada um dos três ligantes, onde cada um foi devidamente definido por seus raios de bolso de ligação r (em Å) e por sua energia de interação relacionada (em kcal/mol). Para a análise das interações de ligação entre os complexos RA-antagonista e RA-agonista, é necessário observar todos os resíduos de aminoácidos atraentes e repulsivos relevantes que possam interferir nos sistemas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

A energia total de ligação para cada raio na bolsa de ligação (local) foi obtida da soma das colaborações individuais dos resíduos de aminoácidos, avaliando a convergência. Levando em consideração a energia de interação da atração (energia negativa) ou repulsão (energia positiva) para cada resíduo de aminoácido relevante, foi realizada uma análise onde havia um raio ideal na bolsa de ligação, para a qual não haveria variação significativa. (menos de 10%) da energia total de ligação observada após um aumento no raio.

A Figura 4.2 representa a energia total calculada das interações complexas da RA com os ligantes CPA (Figura 4.2a), HFT (Figura 4.2b) e RLL (Figura 4.2c) em função do raio r , considerando as constantes dielétricas $\epsilon=10$, $\epsilon=20$ e $\epsilon=40$. Pode ser visto na imagem que a convergência ocorre no raio 7.0 (Å), 8.0 (Å) e 8.5 (Å) (levando em consideração $\epsilon=40$) para CPA, HFT e RLL, respectivamente. No entanto, para estimar a contribuição de um número considerável de resíduos para a análise e garantir a avaliação de todos os resíduos importantes para as interações entre os sistemas, realizamos os cálculos até o raio 11 (Å), compreendendo um total de 116 (CPA), 110 (HFT) e 127 (RLL) interações para os complexos.

A análise da energia total de interação no local de ligação da RA para os compostos utilizados neste estudo demonstrou os seguintes valores, incluindo a ordem $\epsilon=10 > \epsilon = 20 > \epsilon = 40$: para CPA -61.83 kcal/mol > -55.65 kcal/mol > -53.42 kcal/mol, para HFT -42.26 kcal/mol > -36.35 kcal/mol > -33.53 kcal/mol e, finalmente, para RLL -72,.93 kcal/mol > -60.56 kcal/mol > -56.45 kcal/mol.

Figura 4.2 Energia de interação total (em kcal/mol) dos complexos RA-antagonistas e RA-agonista em função do raio de bolso de ligação r (em Å) calculado usando o funcional GGA B97D no esquema MFCC. Três constantes dielétricas são consideradas: $\epsilon = 10, 20$ e 40 . Os resíduos de aminoácidos destacados são os responsáveis pelas maiores energias de ligação.



Fonte: Elaborado pela autora.

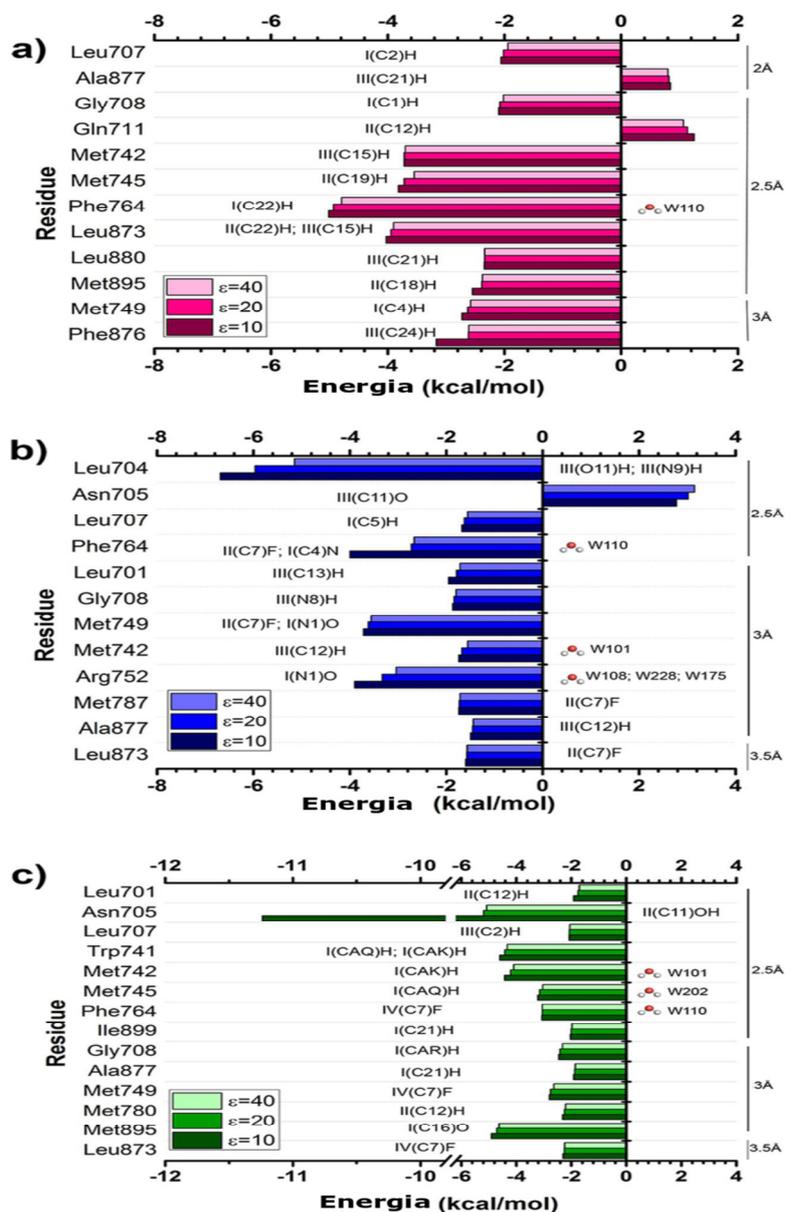
Pode-se observar na Figura 4.2a que para CPA as maiores variações de energia ocorreram nos raios 2.5 (Å) e 3.0 (Å), correspondendo à influência dos valores energéticos dos resíduos Phe764, Met742 e Trp741 a 2,5 (Å) e Phe878 e Met749 para 3.0 (Å). Em relação à HFT, a maior variação ocorreu nos raios 3.0 (Å), sob maior influência dos resíduos Met749 e arg752 e 3.5 (Å) com maior ação do Leu873. Da mesma forma, para a RLL, as maiores variações também ocorreram nos raios 3 (Å) e 3.5 (Å), pois nesses raios os resíduos Met895 e Gly708 (3.0 (Å)) e Leu873 (3.5 (Å)) foram mais importantes no contexto da variação entre os raios.

4.2.1 Energias de Interação dos Resíduos de Aminoácidos Mais Relevantes

As interações de uma droga com seu local de ação no sistema biológico são determinadas pelo efeito entre as forças intermoleculares de atração e repulsivo, com resíduos de aminoácidos do local do receptor. Assim, o conhecimento das interações específicas que ocorrem entre os aminoácidos do ligante e do local do receptor no receptor é de grande importância para a elucidação dos mecanismos complexos que envolvem os sistemas. Nesta subseção, apresentamos os resultados específicos para cada interação aminoácido-ligante em um raio de 11.0 (Å).

A Figura 4.3 mostra os painéis gráficos contendo as energias de interação entre os ligantes CPA (Figura 4.3a), HFT (Figura 4.3b) e RLL (Figura 4.3c) e os aminoácidos mais relevantes para cada ligante. Os gráficos descrevem as seguintes análises: a energia de interação (em kcal/mol) do resíduo com o ligante representado pelas barras horizontais, denotando valores quantitativos para as constantes dielétricas calculadas; no lado esquerdo do gráfico, os resíduos mais importantes que contribuem para a ligação de complexos; e as regiões e átomos do ligando mais próximos de cada resíduo no local de ligação; bem como representadas no lado direito, estão as moléculas de água envolvidas em cada ligação e o raio de interação em que o resíduo é encontrado (em Å).

Figura 4.3 Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das energias de interação dos três complexos biológicos: (a) RA-CPA (rosa), (b) RA-HFT (azul) e (c) RA-RLL (verde). Também são mostradas as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante, bem como as regiões e átomos dos ligantes que interagem com cada resíduo no local de ligação. Além disso, moléculas de água que podem interagir com os resíduos destacados também estão inseridas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos recentes baseados no esquema MFCC dentro da estrutura DFT indicaram que simulações realizadas para uma constante dielétrica $\epsilon=40$ tendem a demonstrar melhores resultados, não apenas revelando uma melhor concordância com dados experimentais, mas também fornecendo uma melhor convergência da energia total de interação (Dantas *et al.*, 2015; Ourique *et al.*, 2016). Em vista disso, serão discutidos aqui os resultados obtidos para os valores apresentados pela constante dielétrica $\epsilon=40$.

Para interações entre o complexo RA-CPA (Figura 4.3a em rosa), os resíduos mais importantes, em ordem decrescente são: Leu704 (-6.25 kcal/mol) > Phe764 (-4.79 kcal/mol) > Leu873 (-3.90 kcal/mol) > Met895 (-2.38 kcal/mol) > Leu880 (-2.34 kcal/mol) > Gly708 (-2.02 kcal/mol) > Leu707 (-1.94 kcal/mol) > Ala877 (0.80 kcal/mol) > Gln711 (1.07 kcal/mol).

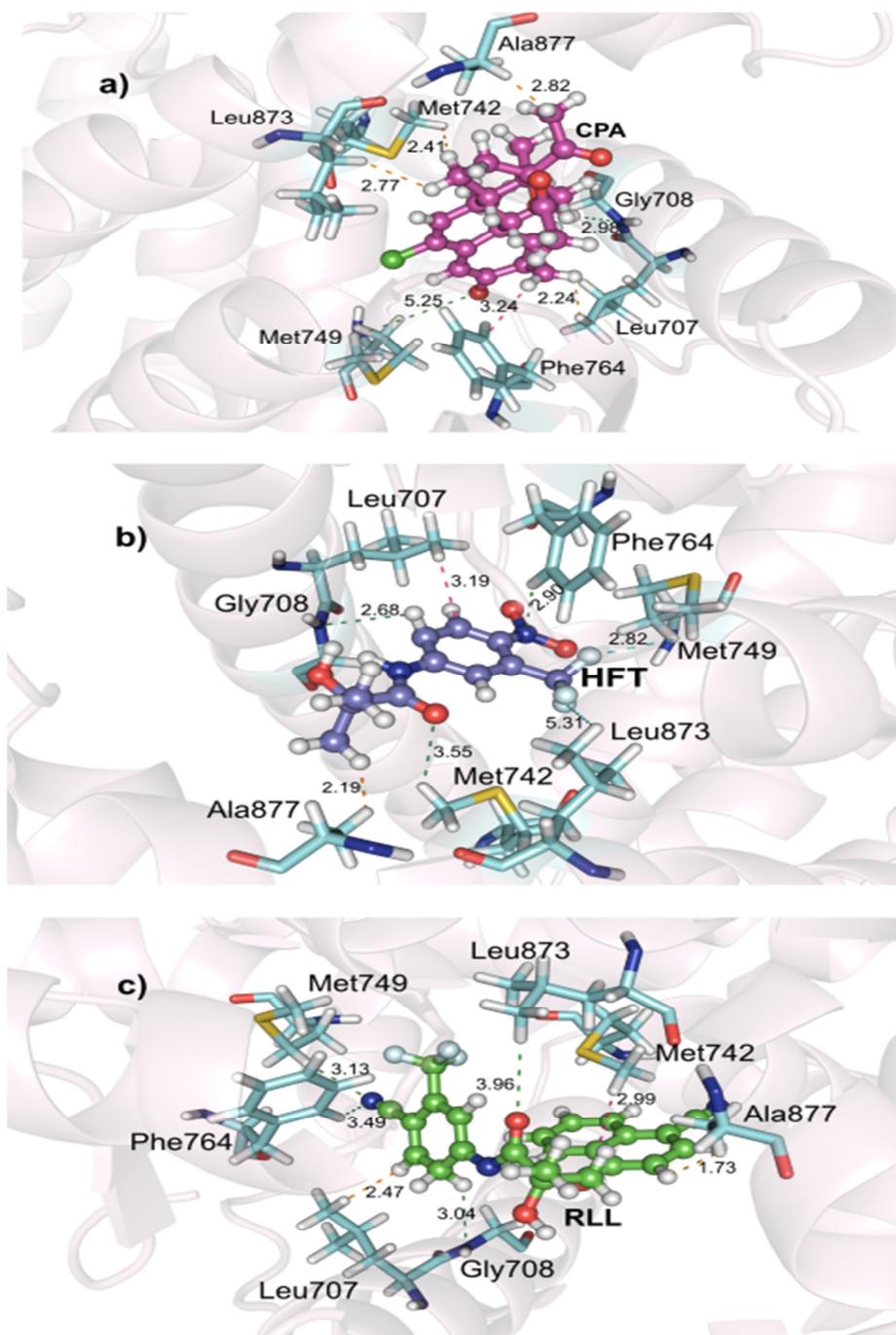
Para interações entre o complexo RA-HFT (Figura 4.3b em azul), os resíduos mais importantes, em ordem decrescente são: Leu704 (-5.15 kcal/mol) > Met749 (-3.76 kcal/mol) > Arg752 (-3.04 kcal/mol) > Leu873 (-1.57 kcal/mol) > Leu707 (-1.56 kcal/mol) > Met742 (-1.56 kcal/mol) > Ala877 (-1.44 kcal/mol) > Asn705 (3.15 kcal/mol).

Já as interações mais importantes para o complexo RA-RLL (Figura. 4.3c em verde), em ordem decrescente, são: Asn705 (-5.08 kcal/mol) > Met895 (-4.63 kcal/mol) > Trp741 (-4.33 kcal/mol) > Met742 (-4.10 kcal/mol) > Phe764 (-3.06 kcal/mol) > Met745 (-3.04 kcal/mol) > Met749 (-2.64 kcal/mol) > Gly708 (-2.32 kcal/mol) > Leu873 (-2.24 kcal/mol) > Met780 (-2.21 kcal/mol) > Leu707 (-2.02 kcal/mol) > Ile899 (-1.98 kcal/mol) > Leu701 (-1.92 kcal/mol) > Ala877 (-1.88 kcal/mol).

Entre os resíduos considerados mais importantes, apenas sete são comuns aos três ligantes avaliados: Phe764, Leu873, Met742, Gly708, Leu707, Met749 e Ala877 (Figura. 4.4a, 4.4b e 4.4c). Dois resíduos (Met745 e M895) são comuns apenas ao CPA e RLL, um resíduo (Leu704) é compartilhado como importante para

CPA e HFT, assim como dois resíduos (Asn705 e Leu701) são comumente importantes para HFT e RLL.

Figura 4.4 As principais interações comuns aos três complexos avaliados: (a) CPA, (b) HFT e (c) RLL. As linhas tracejadas correspondem às forças de dispersão de London (laranja), ligações de hidrogênio não convencionais (verde), alquil- π (rosa) e ligações de halogênio (ciano).



Fonte: Elaborada pela autora.

O resíduo Phe764 apresentou uma importante contribuição energética para os três ligantes analisados, sendo o aminoácido de segundo valor energético mais alto exibido pelo acetato de ciproterona e o segundo e o quinto mais energético para HFT e RLL, respectivamente. A forte atração entre o CPA e o Phe764 pode ser explicada pela presença de forças de van der Waals, ligações de hidrogênio não convencionais, alquil- π com a região I do ligante, sendo I[(C22)H] (2.4 Å) a interação mais próxima. Levando em consideração a HFT, o resíduo Phe764 mostrou uma importante ligação de halogênio [II(C7)F] (2.4 Å) além das interações alquil- π [I(C4)C]. As interações mais notáveis entre o resíduo de aminoácido em questão e o agonista da RLL são as ligações de halogênio que ocorrem na região do ligante IV[IV(C7)F] (2.7 Å). Estudos utilizando *docking* molecular indicam que os fatores que mais influenciam a ligação por afinidade de compostos esteróides e não esteróides são interações eletrostáticas e hidrofóbicas, destacando que os resíduos Val746, Met749 e Phe764 são de importância essencial para interações com ligantes esteróides, pois permitem uma boa afinidade devido ao favorecimento de ligações de hidrogênio (Wang *et al.*, 2013).

Os resíduos Leu873 e Leu707 denotam a segunda e a quinta, respectivamente, maiores interações para CPA, ambos os resíduos mostraram forças de ligação do tipo de London com o ligante, no entanto, Leu873 também exibiu interações com as regiões I e III do antagonista CPA, enquanto o aminoácido polar Leu707 interagiu com CPA no grupo 17 α -acetato presente na região I do ligante. O mesmo tipo de força intermolecular também é encontrado para as interações entre esses resíduos e os ligantes HFT e RLL. O local de ligação dos receptores de hormônios esteróides compartilha uma topologia comum, uma cavidade hidrofóbica que acomoda o ligante esteroide e um padrão de ligação de hidrogênio. A estrutura alifática da molécula acomoda o ligante por meio de uma bolsa hidrofóbica constituída por Leu707, Gly708, Trp741, Met742, Met745, Phe764, Met787, Leu873 e Met895. Na presença da mutação T877A, a hidroxiflutamida exibe uma ligação de hidrogênio mediada pela água ao átomo de oxigênio Leu873 e ao

grupo cetona do ligante [III (C10)O] (Bohl *et al.*, 2005). Várias mutações no receptor RA foram relacionadas como causas de insensibilidade ao andrógeno. Uma mutação na posição 707 foi investigada por Lumbroso *et al* (1996), que verificaram, a partir de experimentos *in vitro*, que essa variação promoveu uma incapacidade do receptor de induzir a ativação transcricional do gene responsivo ao androgênio, causando completa insensibilidade ao androgênio (Lumbroso *et al.*, 1996) .

Na mesma linha, Met742 e Met749 também demonstraram importância energética significativa para os três complexos avaliados. O aminoácido Met742 interage com o CPA na região III [III(C15)H] (2.3 Å) por forças de van der Waals, da mesma forma que o ligante HFT também mostrou o mesmo tipo de ligação com o resíduo da posição 742, a interação ocorreu na região III [III (C12)H]. Met742 denotou o quarto valor mais alto de energia (-4.10 kcal/mol) para a interação com RLL, sendo observado ligações de hidrogênio da região I [(CAQ)H] e forças dipolo-dipolo. O resíduo Met749 interage com o CPA através de forças de dispersão e ligações de hidrogênio não convencionais na região I [I(C4)H; I(C3)O] (2.9 Å; 3.2 Å). A principal interação deste resíduo com o HFT é estabelecida no grupo amida da região I (I(N1)O⁻) sendo do tipo íon dipolo, enquanto para o RLL ocorre a formação de uma ligação de hidrogênio com o anel naftil na região III [III(C8)N]. As mutações M742I e M780I mostraram uma ligação qualitativa anormal ao andrógeno, experimentos (Bevan *et al.*, 1996) mostram que há uma alteração nos níveis de receptores nas células que apresentam essas mutações, resultando em uma ativação transcricional comprometida em pacientes com síndrome de insensibilidade parcial ao andrógeno. O aminoácido 749 é um resíduo importante no local RA-LBD pois modula a função da RA nas células cancerígenas da próstata. A mutação M749L confere hipersensibilidade ao RA a 17-β-estradiol (Thin *et al.*, 2003).

Também importantes para os ligantes estudados aqui foram os resíduos Gly708 e Ala877, a glicina 708 mostrou ligações de hidrogênio entre seu grupo amino e o CPA [I(C1)H], bem como para HFT [III(N9)H] e RLL [III(C2)H]. Os antagonistas de RA, HFT e CPA demonstraram energias de interação repulsiva para

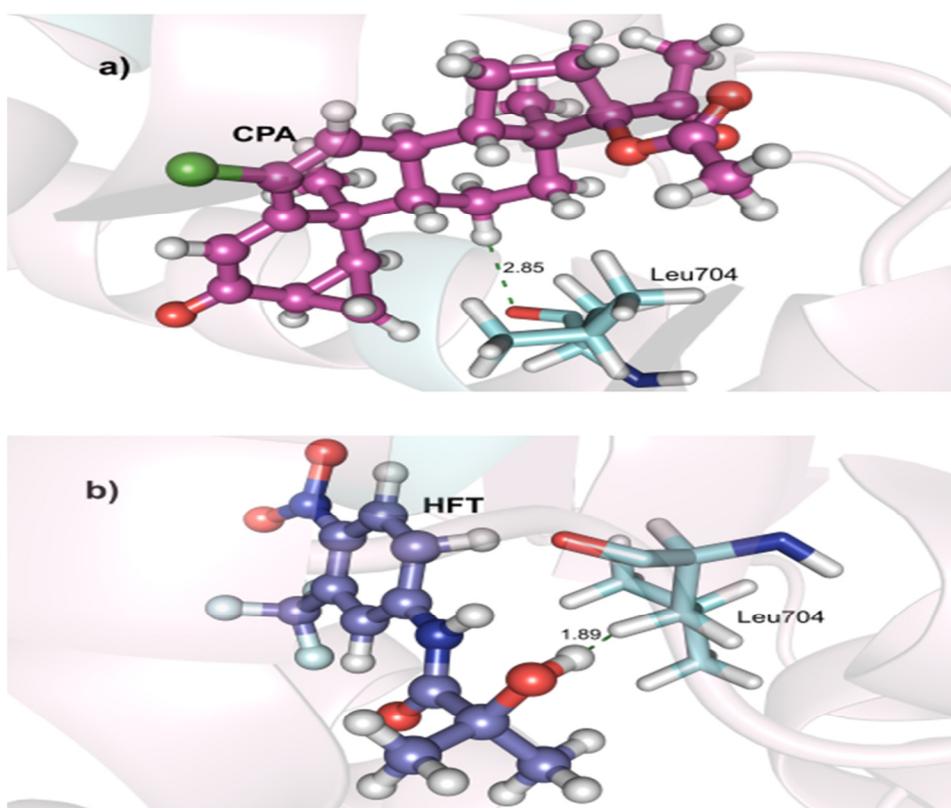
o resíduo correspondente à mutação Ala877. Por outro lado, o ligante agonista apresentou um valor energético atrativo (-1,88 kcal/mol), essa atração pode ser explicada pela presença de interações como forças de dispersão de London e alquil- π que ocorrem no anel naftil da região I do RLL. A mutação T877A foi a primeira mutação RA que descreveu uma supressão da especificidade do ligante e é frequentemente encontrada em carcinomas avançados da próstata (Taplin *et al.*, 1999). Essa variação promove a atividade agonista da hidroxiflutamida e acetato de ciproterona (Bohl *et al.*, 2007), permitindo uma alteração estrutural no local de ligação, levando a uma expansão da cavidade de ligação para incluir um bolso de ligação adicional limitado por Leu701, Leu704, Ser778, Met780, Phe876 e Leu880. Além disso, estudos mostraram que a mutação T877A remove o efeito estérico entre o OH de T877 e dois grupos metil de HFT, com a substituição da alanina formando um ambiente hidrofóbico favorável para dois grupos metil na molécula de hidroxiflutamida (Urushibara *et al.*, 2007).

O resíduo Leu704 mostrou o maior valor energético para os ligantes CPA (-6,25 kcal/mol) e HFT (-5,15 kcal/mol) (Figura 4.5a, 4.5b); esse resíduo forma ligações de hidrogênio não convencionais nas regiões I e III do CPA, também formando ligações H não convencionais e interações alquil- π com HFT. Os resíduos Met745 e Met895 também foram importantes para os ligantes CPA e RLL (Figura 4.6a, 4.6b). Por meio de nossa análise, forças de dispersão foram identificadas entre as duas metioninas e CPA, enquanto no ligante RLL havia ligações de halogênio e ligações de hidrogênio não convencionais. Bohl *et al.* (2005) demonstram em seu estudo que a indução de alterações nas posições em Trp741, Thr877 e Met895 permitem a acomodação de ligantes no bolso de ligação RA. Além disso, o mesmo experimento indica que a mutação M895T causa resistência e também pode promover uma síndrome de abstinência a medicamentos como bicalutamida (uma droga antiandrogênica não esteroide) (Bohl *et al.*, 2005).

Os resíduos Asn705 e Leu701 foram considerados importantes em termos de valor energético para os ligantes HFT e RLL (Figura 4.7a, 4.7b), onde o Asn705

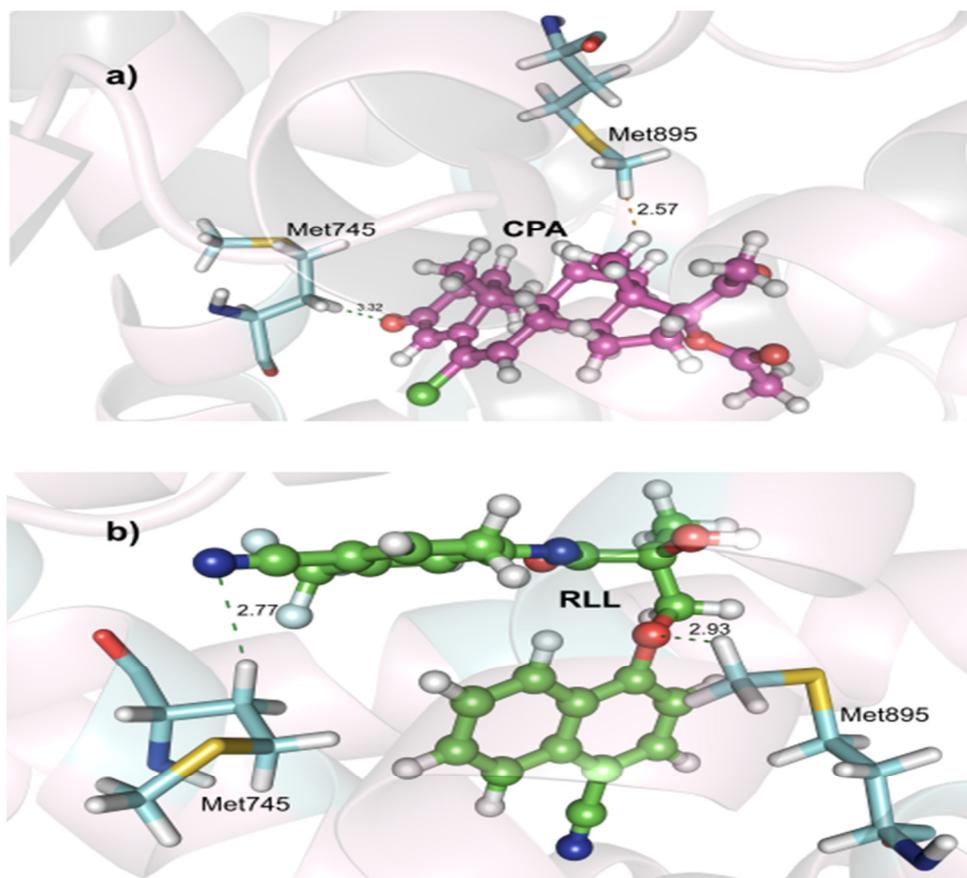
desenvolve ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo com as regiões III e II de HFT e RLL, respectivamente. O aminoácido Leu701 exibe forte interação com a RLL por meio de ligações de hidrogênio na região II [II(C11)OH] (3.5 (Å)) e revela a sexta maior energia de ligação para HFT, também exibindo ligações de hidrogênio com a porção hidroxila do ligante [II (C11)OH] .O Asn705 é de grande importância na ligação de andrógenos à RA, esse fato é bem comprovado na presença de alteração do Asn705 POR um resíduo serina, resultando em uma completa ausência de ligação de androgênios ao RA, bem como uma redução na especificidade androgênica na mutação Asn705Ala (Jesus *et al.* 2006).

Figura 4.5 As principais interações comuns aos complexos (a) RA-CPA e (b) RA-HFT. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde).



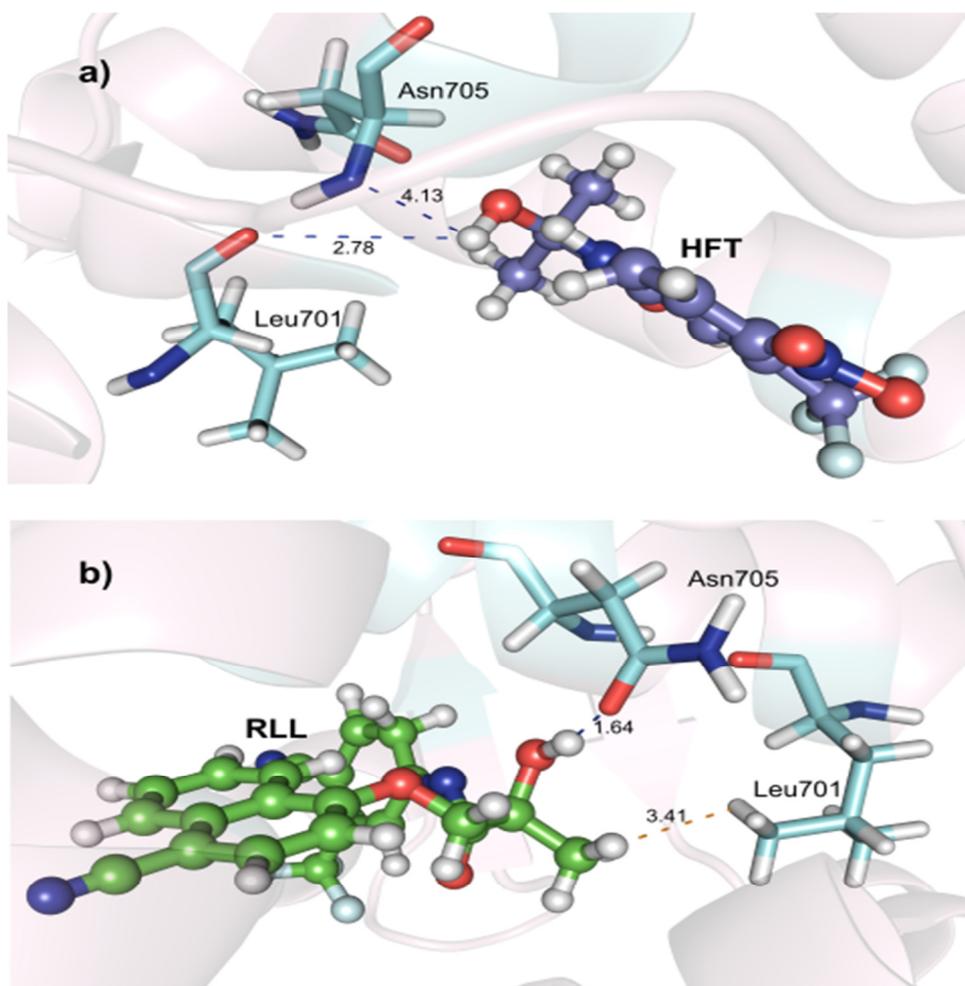
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.6 As principais interações comuns aos sistemas complexos (a) RA-CPA e (b) RA-RLL. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e forças de dispersão de london (laranja).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.7 As principais interações comuns aos sistemas complexos (a) RA-HFT e (b) RA-RLL. As linhas tracejadas correspondem às ligações de hidrogênio (azul) e às forças de dispersão de London (laranja).



Fonte: Elaborada pela autora.

A droga antiandrogênica acetato de ciproterona desenvolveu importantes interações com os resíduos Phe876, Leu880 e Gln711 (Figura. 4.8a). Phe876, Leu880 interagem com o CPA na porção do grupo acetato. Esses resíduos estão em uma cavidade delimitada e não fazem interações hidrofílicas. Simulações de dinâmica molecular realizadas em complexos RA-antiandrogênio sugerem um mecanismo pelo qual a substituição do F876L reduz o antagonismo do ligante, reposicionando uma hélice local (Balbas *et al.*, 2013). Taplin *et al* (1995) observaram

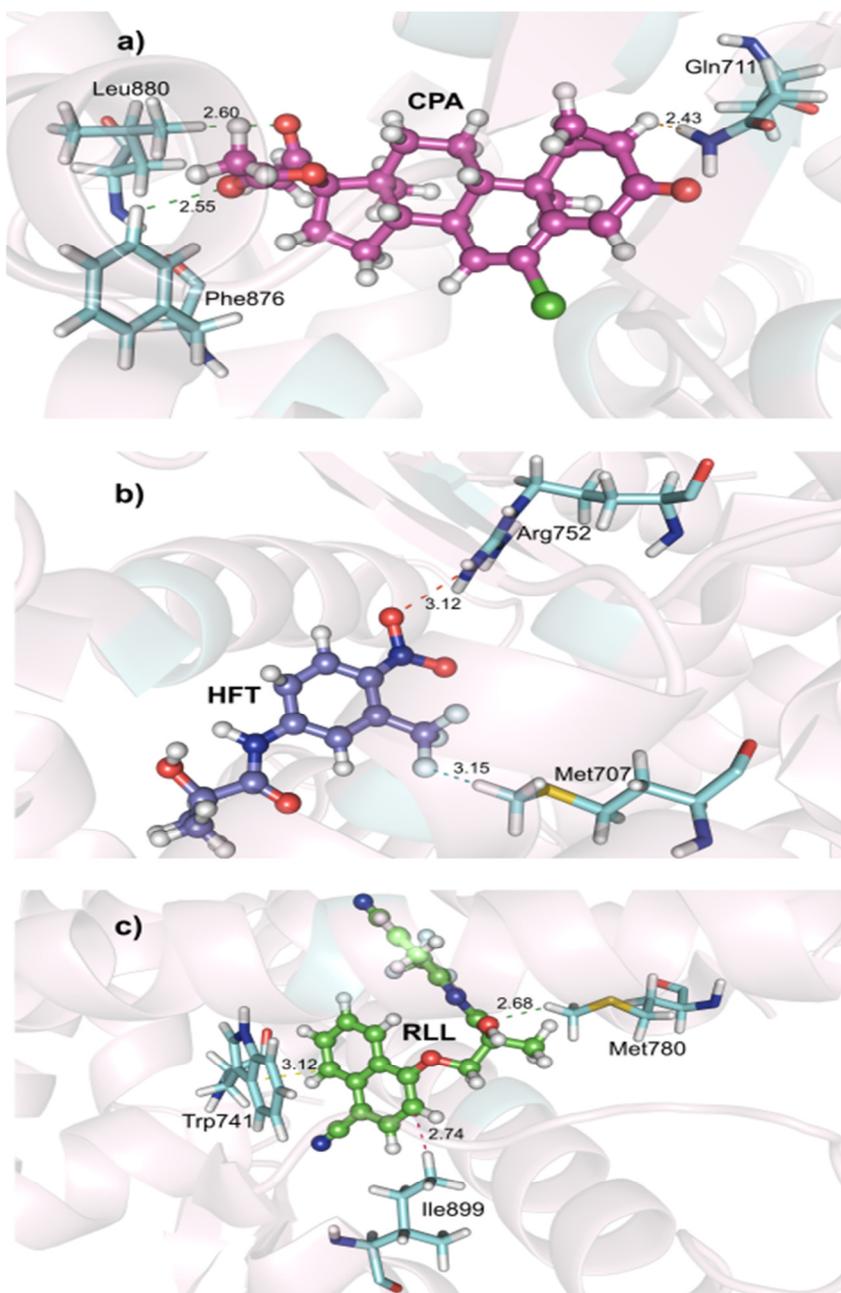
casos de câncer de próstata metastático independente de androgênio, descobrindo que em alguns pacientes células metastáticas carregavam um gene RA com 4 mutações que resultaram nas seguintes substituições de aminoácidos S647N, G724D, L880Q e A896T, inferindo a importância de Leu880. O aminoácido Gln711 mostrou uma energia repulsiva (1.07 kcal/mol) no complexo com CPA. androgênio e antiandrogênio fazem rearranjos estruturais equivalentes da arquitetura de RA, tanto na estrutura geral como nos locais de ligação. No entanto, os resíduos de proteína RA Asn705, Gln711, Arg752 e Thr877 são observados para formar contatos de hidrogênio que são importantes para a entrada do androgênio. Vale ressaltar que esses contatos de ligação foram semelhantes para os complexos mutantes com hidroxiflutamida (T877A) e bicalutamida (W741L) RA, no entanto, a interação dos dois medicamentos com Thr877 estava ausente na presença de mutações (Hsu *et al.*, 2014).

Por outro lado, os resíduos Arg752, Leu701 e Met787 (Figura. 4.8b) foram importantes apenas para interações entre o ligante HFT, Arg752 envolve uma ponte de sal com o grupo amida do ligante [I(N1)O⁻]. Leu701 denotou a sétima energia mais importante para este fármaco, forças de dispersão que ocorrem na região III [III(C13)H] podem explicar a energia atrativa encontrada. Enquanto isso, Met787 envolve ligações de halogênio com a região ligante IV do antagonista. O resíduo leu701 é de grande importância para as respostas transcricionais distintas à progesterona e ao cortisol nos mutantes do RA, incluindo a mutação L701H no câncer de próstata e L701M e L701Q que alteraram a capacidade de resposta dos ligantes da RA (Wijngaart *et al.*, 2010).

Finalmente, os aminoácidos Trp741, Met780 e Ile899 (Figura 4.8c) mostraram um valor significativo de energia de interação apenas para o agonista da RLL. Trp741 e Ile899 interagem com a região agonista I, fazendo interações do tipo empilhamento π - π e ligação hidrogênio, respectivamente. O 780 possui ligações não convencionais de hidrogênio com a região RLL II [II (C10)O]. Uma mutação W741L corresponde, associada ao T877A, corresponde a uma das alterações mais

importantes na mudança da especificidade do ligante. Taplin *et al* (2003) demonstraram que a troca do resíduo de triptofano para uma leucina na posição 741 permitiu que a bicalutamida atuasse como agonista. Experimentos indicam que os medicamentos bicalutamida e hidroxiflutamida na presença das mutações W741C (para bicalutamida) e T877A (para hidroxiflutamida) desenvolvem imobilização intranuclear e localização em muitos focos irregulares, essas variações modificam a configuração apropriada do RA e a capacidade de estabilidade de se ligar ao DNA (Farla *et al.*, 2005).

Figura 4.8 As principais interações envolvendo cada sistema complexo individualmente: (a) CPA; (b) HFT; (c) RLL. As linhas tracejadas correspondem a hidrogênio não convencional (verde), forças de dispersão de London (laranja), pontes de sal (vermelho), ligações de halogênio (ciano), alquil- π (rosa) e interações π - π (amarelo).



Como mostrado acima, a estrutura dos ligantes agonista e antagonista do receptor de RA denotam diferenças na composição e na conformação. Portanto,

inferimos o aspecto energético produzido por cada região de CPA, HFT e RLL. As regiões II, III e I são energeticamente mais relevantes para CPA, HFT e RLL, respectivamente. Em sequência, a ordem de relevância das regiões pode ser destacada na seguinte ordem decrescente: para CPA II (-20,65 kcal/mol) > III (-17,18 kcal/mol) > I (-15,59 kcal/mol); para HFT: III (-13,24 kcal/mol) > II (-11,33 kcal/mol) > I (-8,9 kcal/mol); e para RLL I (-21,96 kcal/mol) > II (-17,55 kcal/mol) > IV (-10,16 kcal/mol) > III (-6,78 kcal/mol).

3.5 Conclusões

Com o objetivo de elucidar as peculiaridades que envolvem a interação entre o receptor de andrógeno (RA) e os ligantes antiandrogênicos e androgênicos em um modelo de mutação T877A, este trabalho quantificou as energias de interação entre os resíduos do receptor androgênico e três compostos, através de métodos de simulação computacional utilizando o nível quântico na compreensão das interações entre proteínas e diferentes ligantes.

Os resultados corroboram com a literatura atual demonstrando a importância da mutação T877A para o desenho das interações. O cálculo das energias de interação revelou que a hidroxiflutamida apresentou um valor total de energia inferior ao apresentado pelo acetato de ciproterona antagonista do RA, -33,53 kcal/mol (HFT) < -53,42 kcal/mol (CPA). Também é importante destacar que CPA e o agonista RLL apresentaram valores energéticos semelhantes para a mutação T877A.

Os valores de energia aqui demonstrados revelam que os aminoácidos Phe764, Leu873, Met742, Gly708, Leu707, Met749 e Ala877 foram energeticamente importantes para os três complexos avaliados. As metioninas nas posições 745 e 895 demonstraram energia de interação relevante para CPA e RLL, e a leucina na

posição 704 mostrou um valor energético significativo para CPA e HFT. Os resíduos Asn705 e Leu701 foram comumente importantes para HFT e RLL.

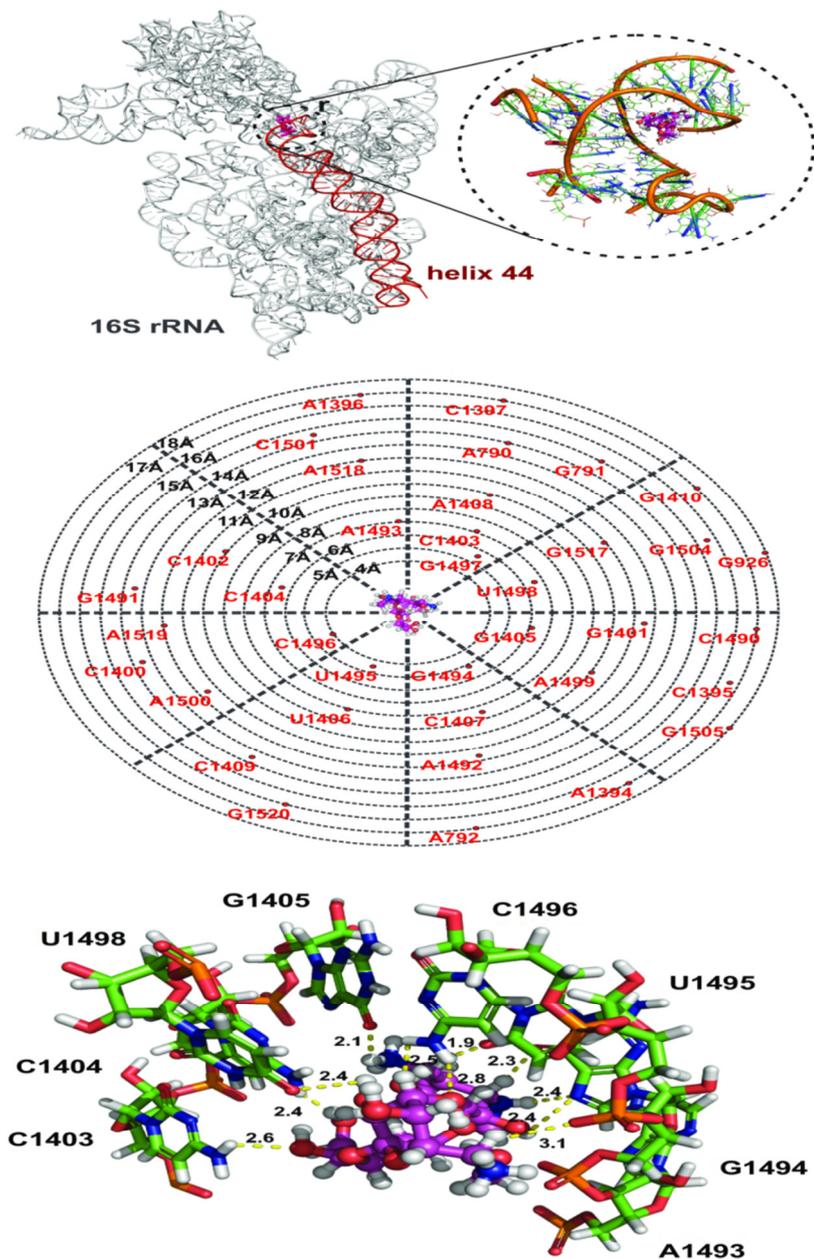
Também ressaltamos aqui que os resíduos Phe876, Leu880 e Gln711 foram considerados relevantes para o acetato de ciproterona, Arg752, Leu701 e Met787 para HFT e os aminoácidos Trp741, Met780 e Ile899 apresentaram resultados relevantes para o complexo RA-RLL. Com base nas informações expostas, é possível inferir a importância dos resultados para a análise proposta, uma vez que o conhecimento dos aspectos únicos que envolvem a interação ligante-receptor, em um modelo de mutação T877A, pode ajudar a entender a biologia estrutural e funcional do receptor de androgênio no câncer de próstata. Assim, esses dados podem auxiliar na descoberta e *design* de ligantes antiandrogênicos aprimorados com ação antineoplásica clínica aprimorada no câncer de próstata avançado.

5. Energia de interação do RNA com o Aminoglicosídeo Higromicina B Calculado dentro de uma Estrutura DFT

5.1 Materiais e Métodos

Os cálculos realizados neste estudo aproveitou-se a primeira estrutura cristalina de raios X da Higromicina B em complexo com a subunidade ribossômica 30S de *Thermus thermophilus* (PDB ID: 1HNZ) (Figura 5.1) com resolução de 3.3 Å (Brodersen *et al.*, 2000). Na primeira etapa da simulação computacional, avaliou-se o pKa da molécula hygB usando o software *Marvin Sketch*, em pH fisiológico. Em seguida, fixou-se as posições atômicas dos átomos não hidrogênio do complexo hygB-RNAr, os átomos de hidrogênio foram inseridos e otimizamos em suas posições atômicas usando mecânica molecular clássica. Durante o processo de otimização, empregamos o campo de força *Condensed-phase Optimized Molecular Potential for Atomistic Simulation Studies* (COMPASS), seus parâmetros são baseados principalmente em dados *ab initio* (Sun, 1998).

Figura 5.1 Subunidade ribossomal 30S de *Thermus thermophilus* co-cristalizado com higromicina B (PDB ID: 1HNZ). (a) Os resíduos do bolso de ligação estão dentro do círculo pontilhado de raio r ao redor da droga. (b) O bolso de ligação da subunidade 30S para a higromicina B, que inclui os resíduos mais importantes do RNAr 16S ligados a esta droga: C1403, C1404, G1405, A1493, G1494, U1495, C1496 e U1498.



Fonte: Elaborado pela autora

Após a otimização atômica, aplicamos o esquema de fragmentação MFCC dentro de uma estrutura DFT (Albuquerque *et al.*, 2014). Seguindo a prescrição padrão, separou-se o RNAr em resíduos de nucleotídicos individuais (rotulados como R_i) e calculamos a energia de interação $EI(L-R_i)$ de cada resíduo com o ligante hygB (rotulado como L), usando a seguinte expressão:

$$EI(L - R_i) = E(L + C_i R_i C_{i^*}) - E(C_i R_i C_{i^*}) - E(L + C_i C_{i^*}) + E(C_i C_{i^*})$$

Eq.(1)

onde os limites de C_i e C_{i^*} são, respectivamente, o resíduo vizinho R_{i-1} e R_{i+1} anexado ao resíduo de referência R_i . Na fórmula acima, o termo $E(L + C_i R_i C_{i^*})$ é a energia total do sistema composto pela molécula hygB e pelo resíduo limitado. Para destacar a energia de interação hygB-resíduo, foi subtraído de $E(L + C_i R_i C_{i^*})$ a energia residual de resíduo $E(C_i R_i C_{i^*})$ e a energia de um sistema formado por ligante e capas (resíduos vizinhos), $E(L + C_i C_{i^*})$. Por fim, como a energia de interação entre as capas foi removida duas vezes o termo $E(C_i C_{i^*})$ foi adicionado.

No caso de certos resíduos (R_i), sua interação com o ligante L é parcialmente protegida por outro nucleotídeo (R_j), localizado próximo a L (Figura 5.2). Para esses resíduos, é importante ajustar o cálculo do MFCC para levar em consideração o efeito da blindagem eletrostática (Zanatta *et al.*, 2012, Dantas *et al.*, 2015). Logo, para determinar $EI(L - R_i)$, foi calculado primeiro a energia de interação entre o ligante e os dois resíduos, $EI(L - R_i - R_j)$, onde,

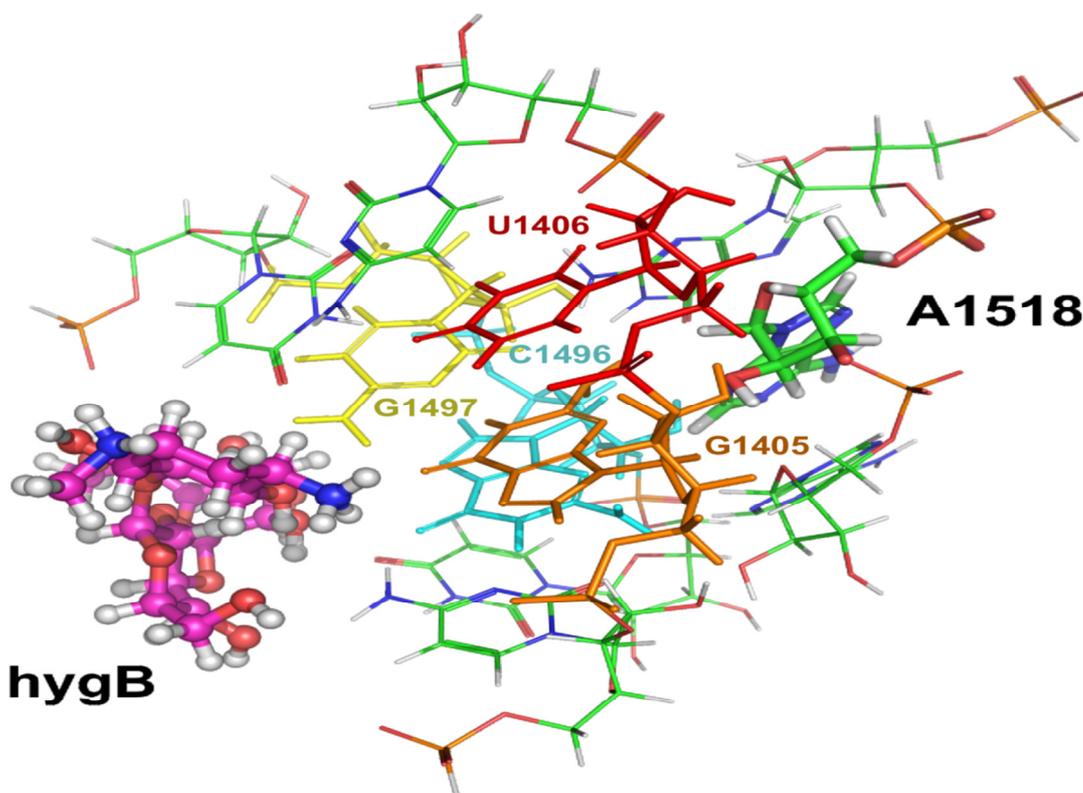
$$EI(L - R_i) = E(L + C_i R_i C_{i^*} - C_j R_j C_{j^*}) - E(C_i R_i C_{i^*} - C_j R_j C_{j^*}) - E(L - C_i C_{i^*} - C_j C_{j^*}) + E(C_i C_{i^*} - C_j C_{j^*})$$

Eq.(2)

No sistema utilizado para esse cálculo, ambos os resíduos foram incluídos simultaneamente. Simplesmente subtraiu-se deste resultado a energia:

$$EI(L - R_i) = EI(L - R_i - R_j) - EI(L - R_j)$$

Figura 5.2 Exemplo de cálculo MFCC em que os efeitos de blindagem são importantes: o resíduo A1518 (Ri) é blindado pelos nucleotídeos G1405, U1406, C1496 e G1497 (Rj), localizados próximos à higromicina B (L).



Fonte: Elaborado pela autora.

Objetivando eficiência computacional, os cálculos energéticos para cada par resíduo-ligante foram realizados dentro do formalismo da teoria do funcional da densidade (DFT), usando o potencial de troca e correlação proposto por Perdew e Wang (LDA-PWC) (Perdew; Wang, 1992). Uma limitação bem conhecida do DFT é que este não leva em consideração as forças não covalentes adequadamente, amplamente encontradas em sistemas biológicos (Silvestrelli, 2009, Berland *et al.*, 2015). Para descrever corretamente as ligações de hidrogênio e van der Waals (vdW) envolvidas na interação entre os nucleotídeos hygB e RNAr 30S, utilizamos a correção de dispersão proposta por Ortmann, Bechstedt e Schimidt (OBS) (Ortmann; Bechstedt; Schimidt, 2006). O conjunto DNP foi escolhido para expansão dos orbitais de Kohn-Sham, levando em consideração todos os elétrons com rotação

irrestrita; o conjunto tem como adicional as funções de polarização que aprimoram muito o conjunto de bases (Delley *et al.*, 1990). Os resultados do DNP estão de acordo com os obtidos usando conjuntos gaussianos de larga escala, sendo 10 a 100 vezes mais rápidos (Benedek *et al.*, 2005). Além disso, o conjunto de bases DNP foi capaz de prever as energias de ligação calculadas usando um conjunto de triplo-zeta com uma boa precisão química (Inada; Orita, 2008).

A representação do ambiente molecular é uma etapa necessária para o estudo teórico das propriedades moleculares. Recentemente, modelos de solvatação implícita foram utilizados no esquema MFCC por Ourique *et al* (2016) e Tavares *et al* (2018) para calcular afinidades de ligação em complexos ligante-proteína (Ourique *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2018) e proteína-proteína. Neste trabalho, o efeito do ambiente de proteínas e solventes foi considerado pela abordagem do *Conductor-like Screening Model* (COSMO), onde o nucleotídeo de interesse é incorporado em uma cavidade cercada por uma região de continuação dielétrica com uma constante dielétrica específica, representando os nucleotídeos excluídos na etapa de fracionamento. Diferentes valores da constante dielétrica ϵ foram considerados na avaliação das energias eletrostáticas.

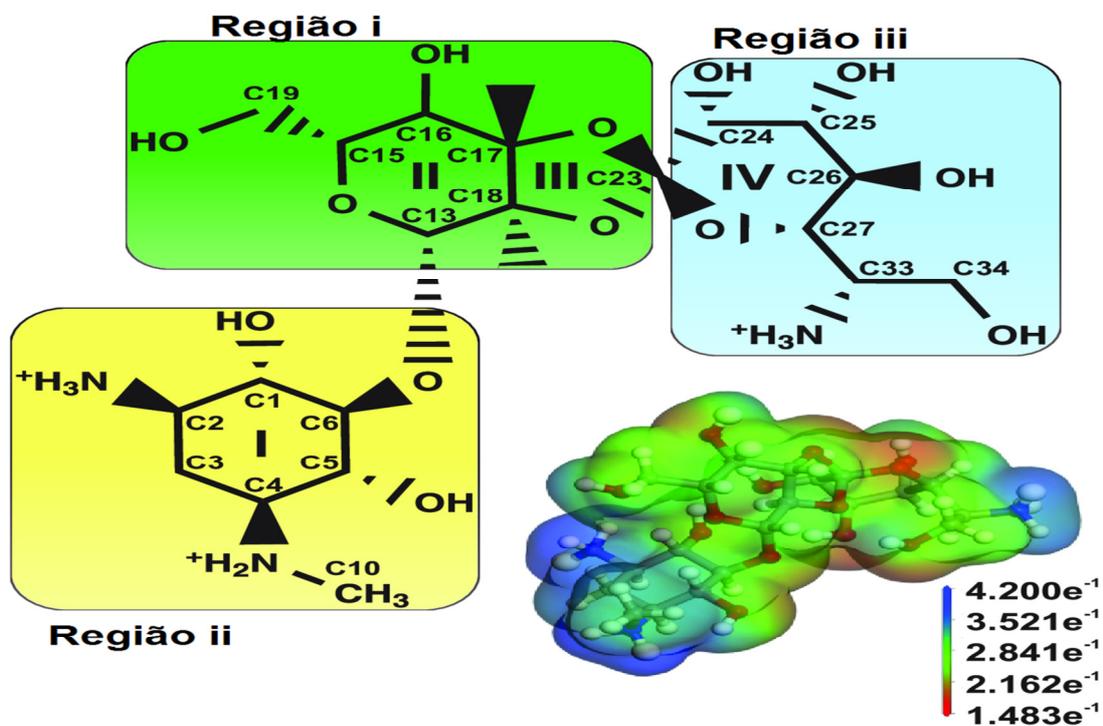
Para avaliar a energia total de ligação através do método da mecânica quântica baseada em fragmentos, é importante considerar todos os resíduos que interagem de maneira apreciável com o ligante. Para atingir esse objetivo, considerou-se progressivamente mais e mais resíduos, até que a adição de fragmentos produzisse pouca alteração na energia. Consideramos nucleotídeos localizados dentro de uma esfera imaginária de raio r centralizada no centróide do ligante - rotulamos r o raio do bolsa de ligação. Os valores para r variaram de 4.0 a 18.0 Å, com um incremento, a cada etapa de 0.5 Å. Consideramos a convergência alcançada quando o aumento de r levou a uma variação inferior a 10% no total de energia (Lima Neto *et al*, 2017).

5.2 Resultados e Discussões

Os RNAs são alvos promissores e relativamente inexplorados para a descoberta de medicamentos, principalmente antibióticos. No entanto, vários desafios impedem o desenvolvimento de novos medicamentos, entre eles, a falta de estudos que caracterizem interações entre RNA e antibióticos. Embora informações confiáveis possam ser obtidas por meio de métodos de mecânica quântica (QM), seu alto custo computacional normalmente impede seu uso em grandes biomoléculas. Recentemente, métodos de fragmentação permitiram o uso de métodos de QM para o cálculo de energias de grandes biomoléculas, principalmente proteínas (Collins; Bettens, 2015, Raghavachari; Saha, 2015, Jin; Zhang; He, 2017). No entanto, poucos estudos caracterizaram complexos RNA-ligante. O principal objetivo da investigação atual é empregar um método de fracionamento para examinar a interação entre a higromicina B (hygB), um antibiótico aminoglicosídeo e o RNA ribossomal (RNAr).

Primeiramente os cálculos consistiram em descrever corretamente a estrutura da molécula de higromicina B demonstrada na Figura 5.3. Para esse fim, o estado de protonação de seus átomos foi avaliado em condições fisiológicas (pH de 7.2-7.4). Este aminoglicosídeo mostrou dois grupos amino protonados primários, um no C2 do resíduo 2-desoxistreptamina (anel I) e outro no C33 do anel amino III. Além disso, uma amina protonada secundária está localizada na posição 4 do anel I, resultando em uma carga formal total de +3. As cargas positivas favorecem o aparecimento de forças atrativas com o ribossomo (Wang; Tor, 1997; Yang *et al.*, 2006). Esta descrição do hygB está de acordo com a melhor estrutura para este aminoglicosídeo obtida a partir de experimentos (Gaggelli *et al.*, 2010).

Figura 5.3 Estrutura química única da molécula de higromicina B e suas regiões i (verde), ii (amarela) e iii (azul). A imagem no canto inferior direito mostra a densidade de elétrons da molécula hygB, projetada em uma isosuperfície de potencial eletrostático. Ele está em um ambiente neutro ou levemente alcalino (pH 7,2-7,4), onde aproximadamente 61.85% dos conformes hygB estão em um estado carregado positivamente



Fonte: Elaborada pela autora.

Antes de considerar os cálculos da energia total de ligação, devemos observar que os resultados aqui obtidos dependem fortemente do valor usado para a constante dielétrica (ϵ), que é empregada para representar o ambiente molecular. Estudos anteriores, que usaram o esquema MFCC para investigar a interação entre proteínas e ligantes, testaram vários valores de ϵ . Os resultados revelaram que a concordância entre simulações e experimentos relevantes foi melhor observada em $\epsilon=40$ (Dantas *et al.*, 2015, Ourique *et al.*, 2016). Outros autores ajustaram a constante dielétrica em uma abordagem projetada para prever a estabilidade das proteínas e descobriram que o mesmo valor de $\epsilon=40$ produzia o melhor ajuste, melhorando a concordância entre cálculos e observações (Vicatos; Roca; Warshel,

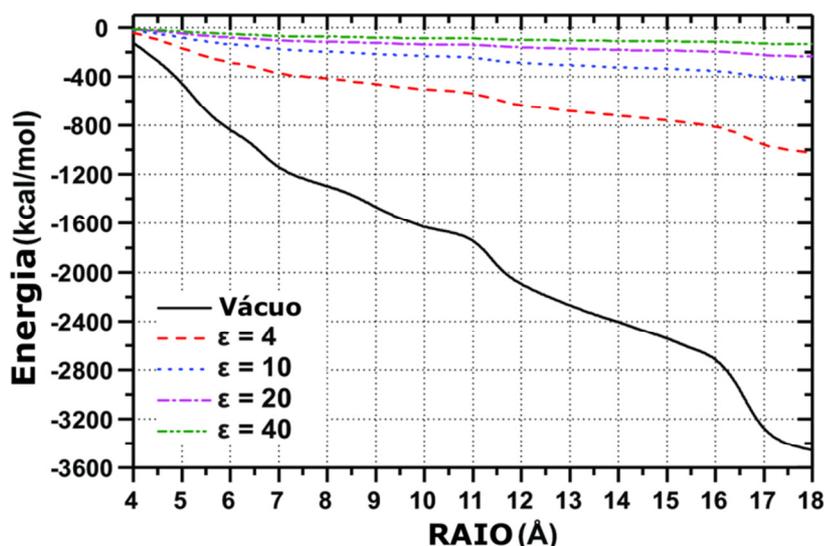
2009). Ainda assim, é importante testar diferentes valores de ϵ , pois alguns autores modelaram, com sucesso, regiões hidrofóbicas sem solvente em proteínas (Li *et al.*, 2013) considerando $\epsilon=2-10$. Uma consideração importante é que, embora os resultados quantitativos dependam de ϵ , as tendências qualitativas não; por exemplo, a ordem de importância energética dos resíduos muda pouco com as alterações em ϵ .

A Figura 5.4 representa a soma das energias individuais de interação hygB-nucleotídeo *versus* o raio do bolso de ligação r , variando de 4.0 Å a 18.0 Å. Para o vácuo ($\epsilon=1$), observe o aumento contínuo nos valores totais de energia de ligação, durante todo o intervalo investigado. Isso é consequência do caráter de longo alcance das interações eletrostáticas, particularmente no vácuo. Conforme demonstrado anteriormente, a partir dos resultados da superfície eletrostática do potencial eletrostático, as aminas da higromicina B são carregadas positivamente. Além disso, observa-se que os ribossomos são macromoléculas com carga negativa, devido ao seu esqueleto de RNA fosfato (Allers; Shamoo, 2001). O vácuo provavelmente fornece uma descrição pobre do ambiente molecular. Supondo que os modelos implícitos que usam os valores de ϵ ofereçam uma melhor representação do sistema real, também foram feitos cálculos de energia de interação em ambientes com constantes dielétricas com $\epsilon=4, 10, 20$ e 40 .

Como esperado, quando são consideradas constantes dielétricas, o valor absoluto da energia de ligação entre cada resíduo de RNAr e hygB diminui e, portanto, a energia de ligação total do complexo hygB-30S também diminui. Usando $r=18.0$ Å, por exemplo, verificou-se que a energia total de ligação do sistema ribossomo-droga é superior a -3400 kcal/mol para cálculos a vácuo, mas apenas -135 kcal/mol por $\epsilon=40$. Aqui, é notável que mesmo pequenos valores de constantes dielétricas ($\epsilon=4$ e $\epsilon=10$) tenham um alto impacto, reduzindo de modo considerável as energias totais de ligação. Para $\epsilon= 4, 10$ e 20 , obtivemos, respectivamente, energias totais de ligação de -1020, -429 e -235 kcal/mol. Em relação à convergência, a energia total variou menos de 5% quando o raio aumentou de 17.0 para 18.0 Å para

todos os números investigados de ϵ . Apesar do grande número de resíduos em $r=17.0$ Å, a convergência foi alcançada em $\epsilon=40$ a $r=16.5$ Å e quase alcançada em $\epsilon= 10$ e 20. Quando r aumentou de 16.5 Å para 17.0 Å, a energia total aumentou 11.6% (10,6%) para $\epsilon= 10$ (20).

Figura 5.4 Energias de interação em função do raio do bolso de ligação r , para o complexo higromicina B-30S. Cada curva apresenta resultados obtidos com um valor diferente da constante dielétrica: 4 (traço), 10 (ponto), 20 (ponto-traço) e 40 (ponto-raço). Como já relatado, o raio da bolsa de ligação corresponde à distância entre o centróide da higromicina B e o resíduo RNAr 16S mais distante considerado.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na estrutura de cristal hygB-30S, todos os nucleotídeos de RNAr 16S dentro da região esférica $r=18.0$ Å centrada no centróide hygB foram considerados. Como se pode ver na Tabela 5.1, existem 39 resíduos de RNAr 16S interagindo com hygB dentro deste raio: A790, G791, A792, G926, A1394, C1395 A1396, C1397, A1398, C1399, C1400, G1401, C1402, C1403, C1404, G1405, U1406, C1407, A1408,

C1409, G1410, C1490, G1491, A1492, A1493, G1494, U1495, C1496, G1497, U1498, A1499, A1500, C1501, G1504, G1505, G1505 A1519 e G1520. Nesta tabela (Tabela 5.1), observa-se que os valores absolutos das energias de ligação individuais diminuem continuamente à medida que a constante dielétrica aumenta, mas sem uma relação linear. Embora as energias de ligação diminuam à medida que ϵ aumenta, curiosamente todas as interações nucleotídicas com o ligante permaneceram atrativas (energias negativas). Isso é verdade mesmo para resíduos distantes do fármaco, demonstrando o forte caráter eletrostático da interação hygB-30S.

Tabela 5.1 Energias de ligação individuais de todos os nucleotídeos de 16S rRNA localizados em 18 Å a partir do centróide da molécula hygB. Resultados obtidos pela abordagem MFCC, usando constantes dielétricas nos valores 1, 4, 10, 20 e 40.

<u>Resíduo</u>	<u>$V_{\text{ácuo}}$</u>	<u>$E_{\epsilon=4}$</u>	<u>$E_{\epsilon=10}$</u>	<u>$E_{\epsilon=20}$</u>	<u>$E_{\epsilon=40}$</u>	<u>Raio</u>
C1496	-121.32	-41.89	-22.44	-15.55	-12.04	4.0
U1495	-143.68	-52.53	-24.31	-14.04	-8.72	4.5
G1494	-178.91	-70.30	-32.98	-19.01	-11.69	5.0
G1497	-126.94	-33.22	-12.32	-6.86	-3.07	5.5
C1404	-122.57	-38.82	-19.80	-13.00	-9.50	5.5
G1405	-149.95	-49.56	-24.24	-14.92	-10.06	6.0
U1498	-111.65	-30.72	-13.38	-7.24	-4.10	6.5
A1493	-110.73	-33.51	-15.43	-8.76	-5.29	7.0
C1403	-114.50	-32.24	-15.66	-9.70	-6.62	7.0
U1406	-114.49	-32.13	-14.05	-7.45	-4.03	8.0
C1407	-63.89	-22.56	-9.99	-5.53	-3.25	8.5
A1499	-112.81	-22.74	-9.25	-4.81	-2.55	9.0
C1402	-110.98	-24.00	-10.34	-5.45	-2.92	10.0
A1408	-70.70	-23.29	-9.89	-5.21	-2.84	10.0
G1517	-32.57	-13.18	-5.27	-2.60	-1.28	11.0
G1401	-103.26	-27.31	-11.52	-5.97	-3.08	11.5
A1492	-81.23	-23.48	-10.32	-5.46	-2.91	11.5
A1500	-93.96	-21.36	-8.47	-4.35	-2.25	11.5
A1518	-70.82	-20.64	-8.36	-4.13	-2.02	12.0
A1519	-81.78	-23.47	-9.66	-4.91	-2.51	12.0
C1400	-84.46	-21.20	-8.51	-4.37	-2.25	13.5
C1409	-68.81	-21.97	-9.24	-4.77	-2.51	13.5
G1491	-77.37	-23.50	-10.23	-5.37	-2.81	13.5

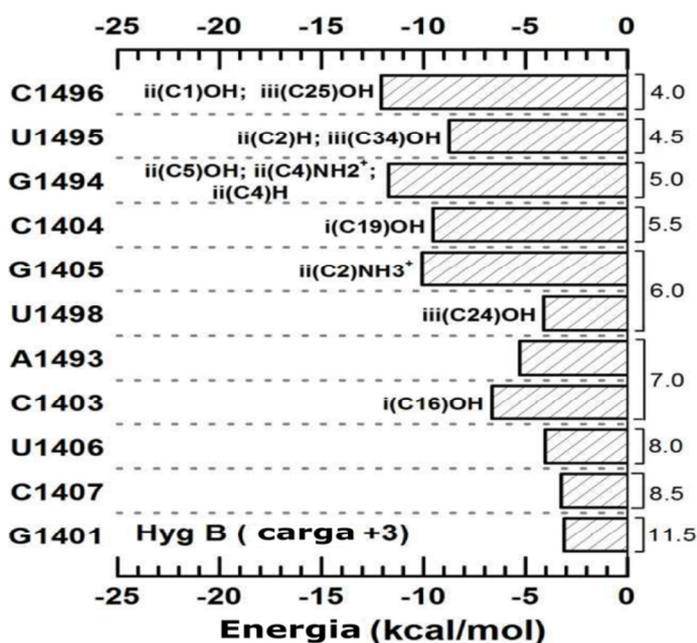
A790	-55.74	-16.56	-6.52	-3.33	-1.70	14.0
C1501	-74.79	-19.54	-7.24	-3.67	-1.88	14.5
G791	-63.75	-14.65	-5.61	-2.81	-1.39	15.0
G1504	-85.18	-28.40	-6.02	-2.90	-1.39	15.5
G1520	-59.76	-21.68	-8.90	-4.49	-2.27	16.0
C1395	-77.86	-19.06	-7.17	-3.57	-1.73	16.5
A1398	-87.84	-22.29	-7.78	-3.92	-1.93	16.5
C1399	-76.51	-19.58	-7.21	-3.67	-1.86	16.5
A792	-50.18	-14.31	-5.79	-2.91	-1.46	17.0
A1394	-68.70	-17.72	-6.26	-3.19	-1.61	17.0
A1396	-74.41	-19.83	-7.50	-3.78	-1.87	17.0
C1397	-65.24	-18.84	-5.98	-3.05	-2.54	17.0
G1410	-72.08	-20.39	-8.55	-4.37	-2.24	17.0
C1490	-108.61	-21.01	-8.90	-4.60	-2.36	17.0
G1505	-76.40	-26.63	-8.24	-4.17	-2.10	18.0
G926	-13.75	-15.98	-5.79	-2.91	-1.46	18.0

Deve-se notar que todos os dez nucleotídeos com as energias de ligação mais altas estão localizados perto da droga, a uma distância de até 9.0 Å. Assim, na análise nucleotídica realizada aqui, a distância do *hygB* é um fator muito importante quando se considera a força da interação fármaco-resíduo. Isso pode estar relacionado ao fato de que todas as interações ligante-resíduo têm a mesma natureza atrativa. Nos complexos droga-proteína, onde podem ser encontradas interações atrativas e repulsivas, os resíduos localizados a uma distância maior que 11.0 Å de um ligante podem interagir fortemente com ele (Dantas *et al.*, 2015). A variedade de aminoácidos encontrados nas proteínas pode apresentar cargas positivas, negativas ou neutras, gerando maior diversidade nas interações (Bezerra *et al.*, 2017).

Outra observação relevante é que a ordem de importância energética dos nucleotídeos para o complexo *hygB*-30S varia muito pouco ao alterar ϵ . Portanto, na análise subsequente da eficácia energética dos nucleotídeos para a ligação do RNAr-*hygB*, discute-se os resultados obtidos para um valor específico, $\epsilon=40$. Esse número levou a uma boa concordância com experimentos em outras investigações realizadas usando o esquema MFCC (Dantas *et al.*, 2015; Ourique *et al.*, 2016).

Para todos os valores de constantes dielétricas, os resíduos A1493, G1494, U1495, C1496, C1403, C1404 e G1405 apresentaram as interações atrativas mais fortes com hygB. Em ordem de relevância, as energias de ligação calculadas com o ligante para $\epsilon=40$ foram: C1496 (-12,04 kcal/mol), G1494 (-11,69 kcal/mol), G1405 (-10,06 kcal/mol), C1404 (-9,50 kcal/mol), U1495 (-8,72 kcal/mol), C1403 (-6,62 kcal/mol), A1493 (-5,29 kcal/mol) e U1498 (-4,10 kcal/mol) (Figura 5.5 e Figura 5.6a). A substituição da base em um ou mais desses resíduos pode interromper os contatos individuais de nucleotídeo e/ou alterar a geometria do local de ligação do fármaco, levando à resistência aos antibióticos direcionados ao ribossomo. Como discutido abaixo, esses resultados auxiliam na interpretação dos resultados dos testes de concentração inibitória mínima, relacionando a mutação em certos resíduos ao surgimento de resistência aos antibióticos aminoglicosídeos (Gregory *et al.*, 2005, Spangler; Blackburn, 1985).

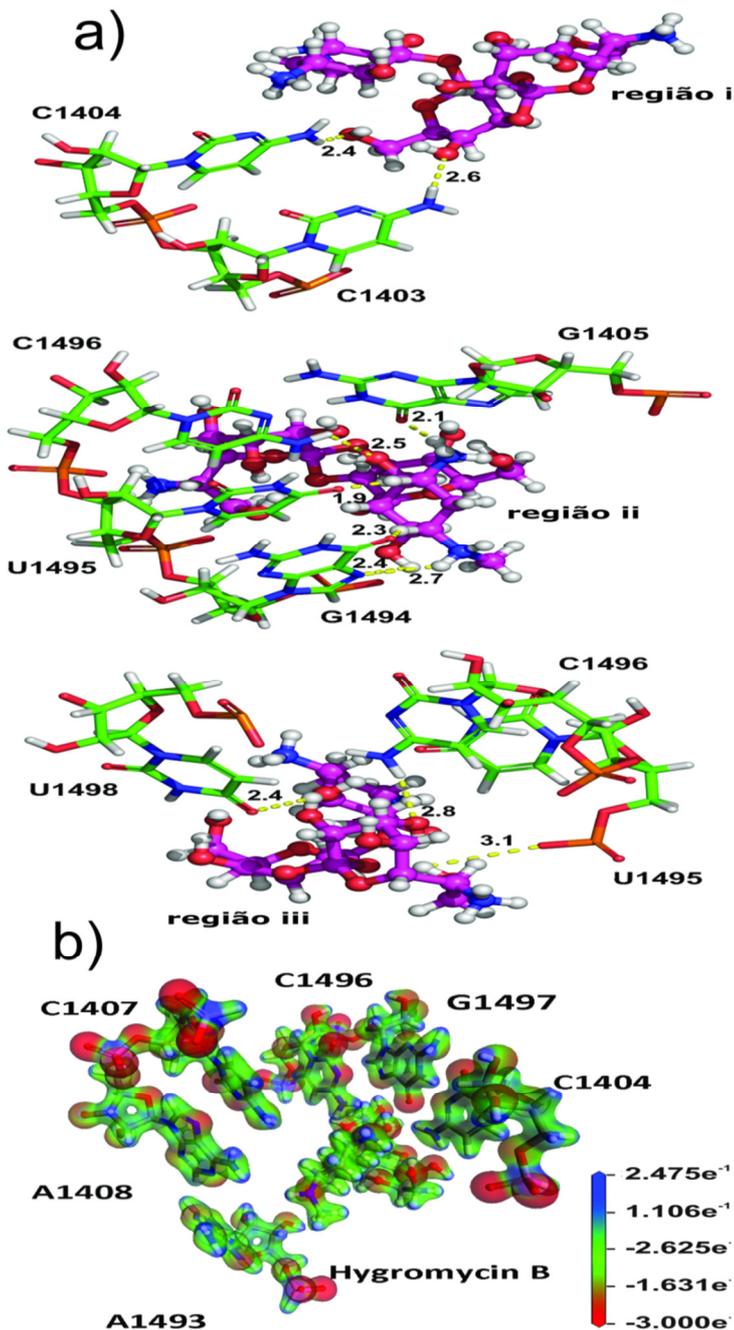
Figura 5.5 Painel gráfico que descreve os nucleotídeos energeticamente mais relevantes dentro de um grande bolso de ligação (18.0), para uma constante dielétrica igual a 40.



Fonte: Elaborado pela autora.

O ribossomo é uma molécula com numerosas cargas negativas, devido às ligações fosfodiéster que conectam os nucleotídeos que formam a cadeia de RNA. Conseqüentemente, espera-se que as interações eletrostáticas sejam importantes na investigação de complexos de RNAr, embora os detalhes dependam do ligante considerado. Em condições fisiológicas, a higromicina B possui no total três cargas positivas, duas na região ii (grupos NH^{2+} e NH^{3+}) e uma na região iii (NH^{3+}). Essas cargas positivas interagem fortemente com as cargas negativas presentes nos nucleotídeos que formam o sítio do receptor. Isso é melhor visualizado com o auxílio das isosuperfícies de potencial eletrostático exibidas na Figura 5.6b, onde é apresentada a distribuição e magnitude da densidade de carga em hygB e nos resíduos principais. Além disso, os oito grupos funcionais hidroxila distribuídos em todas as regiões hygB favorecem as interações dipolo-dipolo, devido à eletropositividade do hidrogênio e à eletronegatividade do oxigênio (Nogrady; Weaver, 2005).

Figura 5.6 (a) Imagens representando todos os contatos (ligações de hidrogênio convencionais e não convencionais) entre os resíduos de RNAr 16S com a higromicina B, no bolso de ligação da subunidade 30S. As distâncias apresentadas estão em angstroms (Å). (b) Potencial eletrostático e densidade eletrônica projetada do complexo, destacando os principais resíduos.



Fonte: Elaborado pela autora

Em relação às ligações de hidrogênio, diferentemente dos complexos proteína-RNA, em que mais de três quartos dos contatos envolvem átomos no esqueleto açúcar-fosfato (Allers; Shamo, 2001), no complexo hygB-RNAr a grande maioria dos contatos envolve átomos de nucleobases. No total, são formadas onze ligações de hidrogênio, dez envolvendo bases de nitrogênio e uma envolvendo um grupo fosfato. Observa-se na Figura 5.6 que sete dos oito resíduos mais importantes em termos energéticos formam ligações de hidrogênio convencionais ou não-convencionais com a droga (a única exceção é A1493). De todos os nucleotídeos, o G1494 forma o maior número de ligações de hidrogênio com a droga, três, dois deles convencionais (com ii(C4) NH²⁺ e ii(C5)OH) e um não convencional (com ii(C4)H). A seguir, C1496 forma duas ligações convencionais, com ii(C1)OH e iii(C25)OH. O nucleotídeo U1495 também forma duas ligações de hidrogênio, uma delas convencional (com iii(C34)OH) e outra não convencional (com ii(C2)H). Finalmente, quatro outros resíduos formam uma única ligação de hidrogênio convencional com hygB: C1403 (com i(C16)OH), C1404 (com i(C19)OH), G1405 (com ii(C2) NH³⁺) e U1498 (com iii(C24)OH). Esses resultados corroboram os estudos anteriores, que atribuíram às ligações de hidrogênio um papel importante na ligação de aminoglicosídeos ao RNA (Brodersen *et al.*, 2000, Cowan2000, Vicens; Westhof, 2003).

Os resultados apresentados aqui ajudam a entender por que mutações em certos resíduos fornecem resistência ao hygB. Por exemplo, verificou-se que as bactérias que possuem a mutação U1495C são resistentes ao hygB (Gregory *et al.*, 2005). A interpretação desse resultado é direta já que os cálculos revelam que o U1495 possui uma das energias de ligação mais altas para hygB (-8,72 kcal/mol) e forma duas ligações de hidrogênio com o ligante. Por outro lado, compreender por que as mutações U1406A/C/G conferem resistência à hygB (Pfister *et al.*, 2003) não é tão direto, dado que o resíduo U1406 não forma uma ligação de hidrogênio com hygB. No entanto, observa-se que os resíduos U1406 e U1495 formam um par U-U não canônico dentro da hélice 44 do RNAr 16S, de modo que uma mutação no

U1406 afetaria o posicionamento do U1495. Em relação à resistência ao hygB causada pela mutação C1496U, o resíduo C1496 é aquele com a maior energia de ligação ao hygB (-12,04 kcal/mol). Além disso, essa mutação distorceria o par de bases Watson-Crick C1496-G1405, causando alterações estruturais no local de ligação. Enquanto isso, embora a energia de ligação entre U1498 e o ligante seja média (-4,10 kcal/mol), o aparecimento da mutação U1498C quebraria sua ligação de hidrogênio direta com iii(C24)OH de hygB e prejudicaria a interação química adequada da droga com RNAr 16S (Pfister *et al.*, 2003).

Por outro lado, mutações em diferentes resíduos não afetam a eficácia da higromicina B, e os cálculos também fornecem entendimento para esses casos. Por exemplo, foi relatado em um estudo que a substituição do A1408G não é decisiva para a resistência hygB em *Thermus thermophilus* (Gregory *et al.*, 2005). Este resultado pode ser entendido através dos dados da Tabela 5.1, onde verifica-se que a energia de interação entre o resíduo A1408 e a droga é baixa (-2,84 kcal/mol). Da mesma forma, as mutações C1491A e C1409G não conferem resistência a antibióticos para *T. thermophilus* mutantes (Gregory *et al.*, 2005). Não é de surpreender que a interação de ambos os resíduos com o ligante seja fraca (-2,51 kcal/mol e -2,81 kcal/mol), pois o par de bases C1409-G1491 está distante do centróide hygB (13.5 Å). Observe que nossa análise não se aplica a *E.coli*, onde mutações nesse par de bases podem conferir resistência, comprometendo a estabilidade da hélice 44 do RNAr 16S ou perturbando a conformação do bolso de ligação para hygB (Stasio; Dahlberg, 1990; Borovinskaya *et al.*, 2008). Esta não é a única peculiaridade em relação à interação entre aminoglicosídeos e *T. thermophilus*. Acredita-se que os aminoglicosídeos sejam capazes de guiar os resíduos A1492 e A1493 até que uma conformação seja formada, onde eles interajam com a hélice códon-anticódon no local de decodificação, aumentando a afinidade de ligação do RNAt para o ribossomo e induzindo a erros de (Hainrichson; Nudelman; Baasov, 2008). No entanto, essa alteração conformacional não ocorre na estrutura cristalina de hygB no complexo com a subunidade intacta *T.thermophilus*

30S. Ainda assim, os resíduos A1492 e A1493 interagem com os fármacos na bolsa de ligação, mesmo na ausência dessa modificação estrutural, a energia de ligação é -2,91 kcal/mol para A1492 e -5,29 kcal/mol para A1493. Para o último resíduo, a interação atrativa com o ligante é maior que o valor determinado para U1498 (-4,10 kcal/mol), que provou ser essencial para a formação do complexo hygB-30S (Pfister *et al.*, 2003). Assim, existe a possibilidade de que mutações no A1493 também possam promover resistência a antibióticos.

Finalmente, adicionando a contribuição de todos os resíduos, pode-se determinar o grau de importância de cada região de higromicina B para a estabilidade geral do complexo fármaco-RNAr. Começando com a região menos relevante, descobrimos que a região i interagiu com três nucleotídeos formando duas ligações de hidrogênio, para uma energia total de ligação de -12,58 kcal/mol. A seguir tem-se a região iii, que interagiu com três nucleotídeos formando três ligações de hidrogênio, para uma energia total de ligação de -14,48 kcal/mol. A região ii foi de longe a mais importante para a complementaridade com o RNAr 16S, interagindo com sete nucleotídeos e formando seis ligações de hidrogênio. Adicionando todas as contribuições, determina-se que a energia total de ligação para esta região foi de -44,7 kcal/mol (57,0% do total). Dada a baixa energia de interação entre a região i e o RNAr, modificações visando melhorar a afinidade entre receptores de drogas provavelmente devem ter como alvo essa região em particular.

5.3 Conclusões

Descobertas recentes demonstraram a importância sobre as múltiplas funções desempenhadas pelas moléculas de ácido ribonucleico (RNA), tanto na fisiologia celular como sobre seu potencial como alvo de novos medicamentos mais eficazes. Um objetivo atraente para o design de medicamentos é o RNA ribossomal (RNAr), que tem sido um alvo bem-sucedido de antibióticos aminoglicosídeos - como a higromicina B (hygB) - há mais de cinquenta anos. O HygB se liga à subunidade 30S

do ribossomo bacteriano, que é composta por uma subunidade 16S do RNAr e 21 proteínas. Após a ligação, inibe a translocação ribossômica, interferindo na síntese protéica e matando as células bacterianas. Apesar do uso prolongado desse antibiótico, faltam estudos caracterizando interações moleculares no complexo hygB-16S.

Aqui, foram realizados cálculos das energias de ligação entre hygB e resíduos individuais de 16S rRNA dentro de um grande local de ligação (18.0 Å), empregando métodos de mecânica quântica altamente precisos. A determinação das propriedades de grandes biomoléculas no nível quântico foi possível através do uso do esquema computacionalmente eficiente de MFCC. A fim de explicar adequadamente o ambiente molecular durante nossos cálculos, cercamos os nucleotídeos com uma região dielétrica contínua. É importante ressaltar que nossas principais descobertas não dependem do valor específico considerado para a constante dielétrica.

Os resultados aqui apresentados mostram que os oito resíduos do RNAr 16S com maior interação com hygB são os nucleotídeos C1496, G1494, G1405, C1404, U1495, C1403, A1493 e U1498. Com exceção do A1493, sete desses resíduos formam ligações de hidrogênio com o ligante. As altas energias de ligação desses resíduos apoiam os resultados dos testes de concentração inibitória mínima (MIC) que vinculam a mutação nesses resíduos ao aparecimento de fenótipos de resistência hygB em bactérias. Por outro lado, outros estudos estabeleceram que os antibióticos mantem sua eficácia quando ocorreram mutações em resíduos que determinamos terem baixa energia de interação com a droga (A1408, C1409 e G1491). Observa-se que nucleotídeos com altas energias de ligação ao hygB também são universalmente conservados em ribossomos de várias espécies (Bottger, 2007, Pfister *et al.*, 2003). Portanto, os dados de energia de ligação corroboram a idéia de que a falta de especificidade e a toxicidade do hygB para muitos organismos (Gonzalez *et al.*, 1978) decorre de fortes interações com resíduos universalmente conservados, presentes no RNA 16S eucariótico e

bacteriano (Pfister *et al.*, 2003); interações medicamentosas com nucleotídeos específicos de procariotas, como A1408, são ineficazes. Os cálculos também revelam quais regiões de drogas interagem fortemente com a subunidade 16S. Foi demonstrado que a região ii de *hygB* é de longe a mais importante para a estabilidade do complexo fármaco-RNAr, respondendo por 57% da energia total de ligação. Por outro lado, a região i é responsável por apenas 18.5% da energia total de ligação e as modificações nessa região podem melhorar a afinidade do receptor de drogas. Os resultados apresentados aqui podem ser de grande valor para a Química Medicinal, especificamente no *design* de medicamentos.

6. Investigação das Energias de Interação Entre a Proteína Anti-apoptótica MCL-1 e Inibidores

6.1 Materiais e Métodos

A estrutura cristalográfica utilizada como *input* para a realização dos cálculos do estudo *in silico* foi obtida a partir do banco de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank* (RCSB/PDB). Este repositório contém informações sobre estruturas 3D de moléculas biológicas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos. As estruturas cristalográficas escolhidas, que caracterizam os complexos MCL-1-antagonistas, são identificadas com os códigos (resoluções) listados a seguir para cada inibidor:

- S63845 - 5LOF (2.2 Å) (Kotschy, *et al.*, 2016)
- ECY - 6BW2 (2.7 Å) (Shaw *et al.*, 2018)
- AZD5991- 6FS0 (2.2 Å) (Tron *et al.*, 2018)
- E4Q - 6FS1 (1.6 Å) (Tron *et al.*, 2018)
- E4K - 6FS2 (2.5 Å) (Tron *et al.*, 2018)
- KJP - 6NE5 (1.8 Å) (Lee *et al.*, 2019)
- AM8621- 6OQB (1.6 Å) (Caenepeel *et al.*, 2018)

Os estados de protonação dos ligantes, assim como os aminoácidos da proteína no pH fisiológico, foram verificados usando o código *MarvinSketch* versão 17.24

(*Marvin Beans Suite* - ChemAxon) e o pacote Propka 3.1 (Propka, 2011), respectivamente. Átomos de hidrogênio e cadeias laterais de aminoácidos, não resolvidos por difração de raios-X e, portanto, inexistentes nos arquivos cristalográficos, foram inseridos nas estruturas e submetidos à otimização clássica da geometria durante a fixação dos outros átomos. Os átomos de hidrogênio apresentam densidade eletrônica mínima, sendo portanto, não identificados, ou ainda, identificados incorretamente nos arquivos de coordenadas cristalográficas. Apenas cristais com resolução menores que 1.2 Å oferecem estrutura para a visualização dos átomos de hidrogênio. Essa otimização foi realizada usando o campo de força clássico CHRMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*), o qual é configurado especificamente para moléculas orgânicas, resultando em uma maior precisão dos cálculos (Momany, 1992). Os critérios utilizados para a tolerância de convergência foram 10^{-5} kcal/mol (variação total de energia), 10^{-3} kcal/mol (raiz quadrada média do gradiente RMS) e 10^{-5} Å (deslocamento atômico máximo).

Os cálculos energéticos foram realizados utilizando-se uma metodologia da Mecânica Quântica *ab initio*, com base no DFT. Além disso utilizou-se um método de fragmentação denominado MFCC - método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas. Este método permite cálculos envolvendo proteínas, DNA e outras macromoléculas biológicas, visando fornecer informações precisas a respeito das energias de interação moleculares. A idéia central do método MFCC é a partição da energia de interação entre moléculas de proteína em quantias individuais de interação que podem ser facilmente calculadas. Logo, a proteína é decomposta em fragmentos de aminoácidos cujas extremidades recebem porções de seções vizinhas. Assim, a energia de interação entre uma proteína e uma molécula pode ser obtida por instrumento de combinações de energias de interação entre fragmentos individuais do sistema analisado, permitindo ainda, uma representação do ambiente local durante a fragmentação individual. O MFCC possibilita uma maior eficiência computacional e tem importância significativa no estudo de sistemas biológicos complexos (Zhang; Zhang, 2003; Zhang; Zhang, 2005; Gordon *et al.*, 2011).

Baseando-se no fato de que a identificação das interações entre os resíduos da proteína MCL-1 e ligantes foi realizada utilizando-se um determinado raio a partir do ligante de interesse (L), englobando aminoácidos (R_i) do MCL-1, o fracionamento do sistema cumprindo o método MFCC pôde ser iniciado. Para cada R_i foram integrados quatro fragmentos. O primeiro, $L - C_{i-1}R_iC_{i+1}$, é formado pelo ligante (L) e, R_i (MCL-1), juntamente com seus aminoácidos vizinhos (C_{i-1}/C_{i+1}). Em outro momento, o resíduo da proteína foi retirado R_i , obtendo-se $L - C_{i-1}C_{i+1}$ (segundo fragmento). Posteriormente, o ligante L também retirado apresentando o terceiro fragmento $C_{i-1}R_iC_{i+1}$. Por fim, excluiu-se o ligante L e o resíduo R_i , logrando o quarto e último fragmento que é composto apenas pelos aminoácidos vizinhos ao resíduo, $C_{i-1}C_{i+1}$. Estes resíduos vizinhos são as denominadas “capas” constituintes do MFCC. Estas “capas” são anexadas no intuito de preservar a valência das ligações, bem como, imitar o ambiente local das moléculas.

A partir do exposto, as energias de interação entre os resíduos do MCL-1 e inibidores foram calculadas utilizando-se a seguinte equação:

$$E(L - R_i) = E(L + C_{i-1}R_iC_{i+1}) - E(L + C_{i-1}C_{i+1}) - E(C_{i-1}R_iC_{i+1}) + E(C_{i-1}C_{i+1})$$

(Eq.1)

Ou seja, $E(L - C_{i-1}R_iC_{i+1})$ refere-se a energia total do conjunto constituído pelo ligante L e o resíduo R_i , que interagem de forma recíproca e os aminoácidos vizinhos ao resíduo, já o termo $E(L - C_{i-1}C_{i+1})$ refere-se à energia do ligante L simultaneamente com a energia das “capas” de R_i , $C_{i-1}C_{i+1}$. Enquanto isso, $E(C_{i-1}R_iC_{i+1})$, é a energia do conjunto constituído por R_i e vizinhos, e finalmente, o último termo $E(C_{i-1}C_{i+1})$ representa a energia da porção formada pelas “capas” de R_i .

Os cálculos energéticos para cada resíduo no local de ligação foram realizados usando o código Gaussian G09 (Frisch *et al.*, 2009), dentro do formalismo da DFT utilizando o funcional B97D (Grimme, 2006) que inclui termos de dispersão

para melhorar a descrição de interações não-covalentes. Este funcional foi utilizado também em conjunto com a correção de dispersão D3 sob vácuo e o modelo de solvatação COSMO para calcular as energias de ligação de alguns complexos proteína-ligante dentro do esquema MFCC (Antony; Grimme, 2012).

Sabe-se que a maioria das interações biomoleculares ocorre em um ambiente eletrostático e, portanto, é importante considerar os efeitos das moléculas circundantes em muitos casos. Portanto, usamos o modelo de *Continuous Polarizable Continuum Model* (CPCM) (Cossi *et al.*, 2003) com a constante dielétrica ϵ igual a 10, 20 e 40, para representar o ambiente em torno de cada fragmento obtido pelo esquema MFCC. Para representar a expansão dos orbitais de Kohn-Sham para todos os elétrons, foi utilizado o 6-311+G (d, p), uma pequena base de valência tripla-zeta definida junto com uma função difusa adicional (+) e funções de polarização (d, p).

Para evitar a ausência de interações importantes, uma avaliação completa da convergência para a energia de ligação foi produzida de acordo com o raio da bolsa de ligação ao ligante, estabelecendo um limite para o número de resíduos de aminoácidos a serem investigados. Para isso, foi adicionado a energia de interação individual desses resíduos de aminoácidos, esferas imaginárias, com um raio de bolso r centrado no ligante e considerado igual a $R/2$, com $R=1, 2, 3, 4, \dots, n$, sendo n o próximo número natural na sequência. Assim, o raio da bolsa de ligação r alcança convergência sempre que a variação de energia no raio consecutivo for menor que 10%.

6.2 Resultados e Discussões

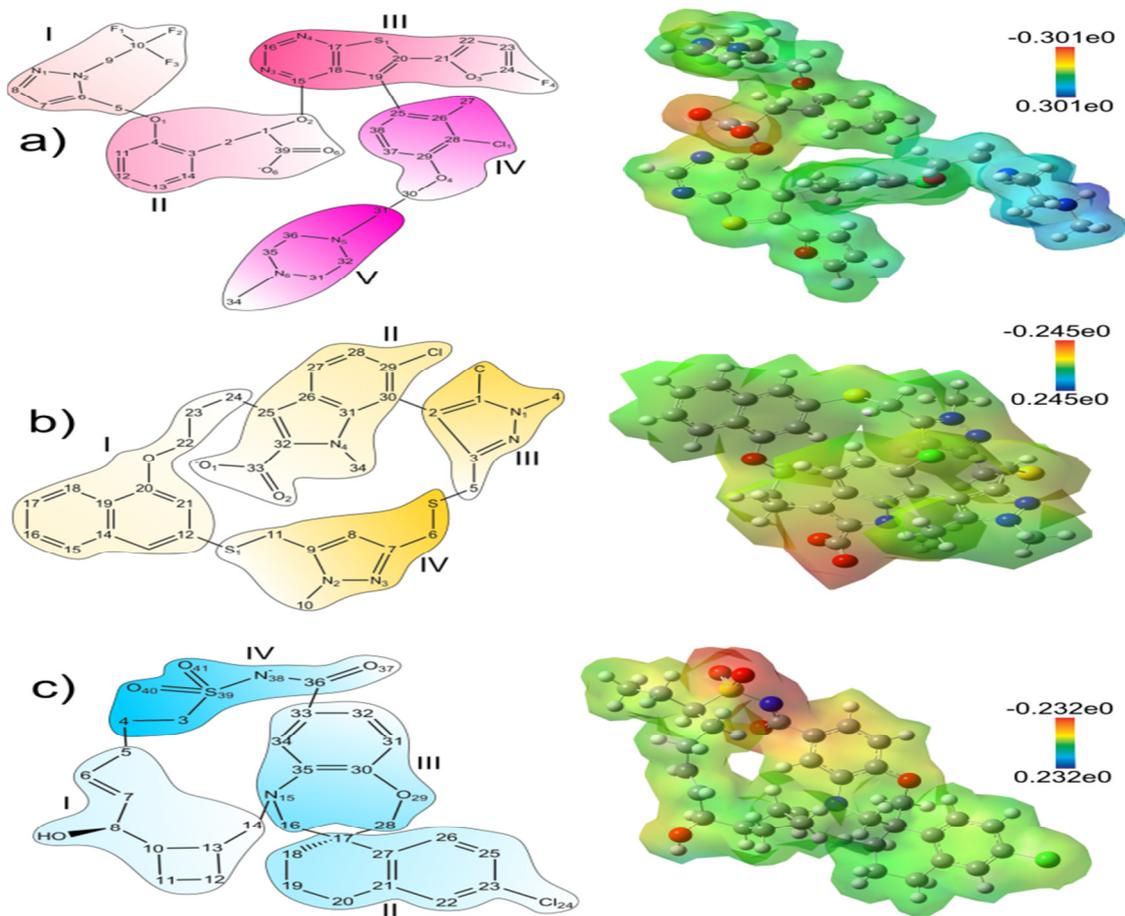
A apoptose é um processo de morte celular programada que, quando alterada, contribui para várias doenças humanas (Thompson, 1995). A inibição da apoptose está implicada em doenças como câncer, distúrbios autoimunes e infecções virais,

enquanto a superexpressão deste processo está ligado a outros processos patológicos, como distúrbios neurodegenerativos e acidente vascular encefálico. A BCL-2 e proteínas relacionadas são uma família crescente de moléculas que regulam a apoptose (Adams e Cory, 1998; Chao e Korsmeyer, 1998). Esta família inclui elementos antiapoptóticos, como BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W. Em especial, a proteína MCL-1 é altamente amplificada em inúmeros cânceres, sugerindo que a mesma contribui para o crescimento celular maligno e a evasão da apoptose. Portanto, esforços significativos devem ser feitos para aprimorarmos o conhecimento quanto à ação dos inibidores de Mcl-1, na tentativa de desenvolvermos drogas que possam ser utilizada na terapia do câncer.

Tendo em vista a importância da proteína MCL-1 e sua ligação à inibidores, avaliamos aqui, os resultados das interação entre esta proteína e sete compostos com ação antagonista.

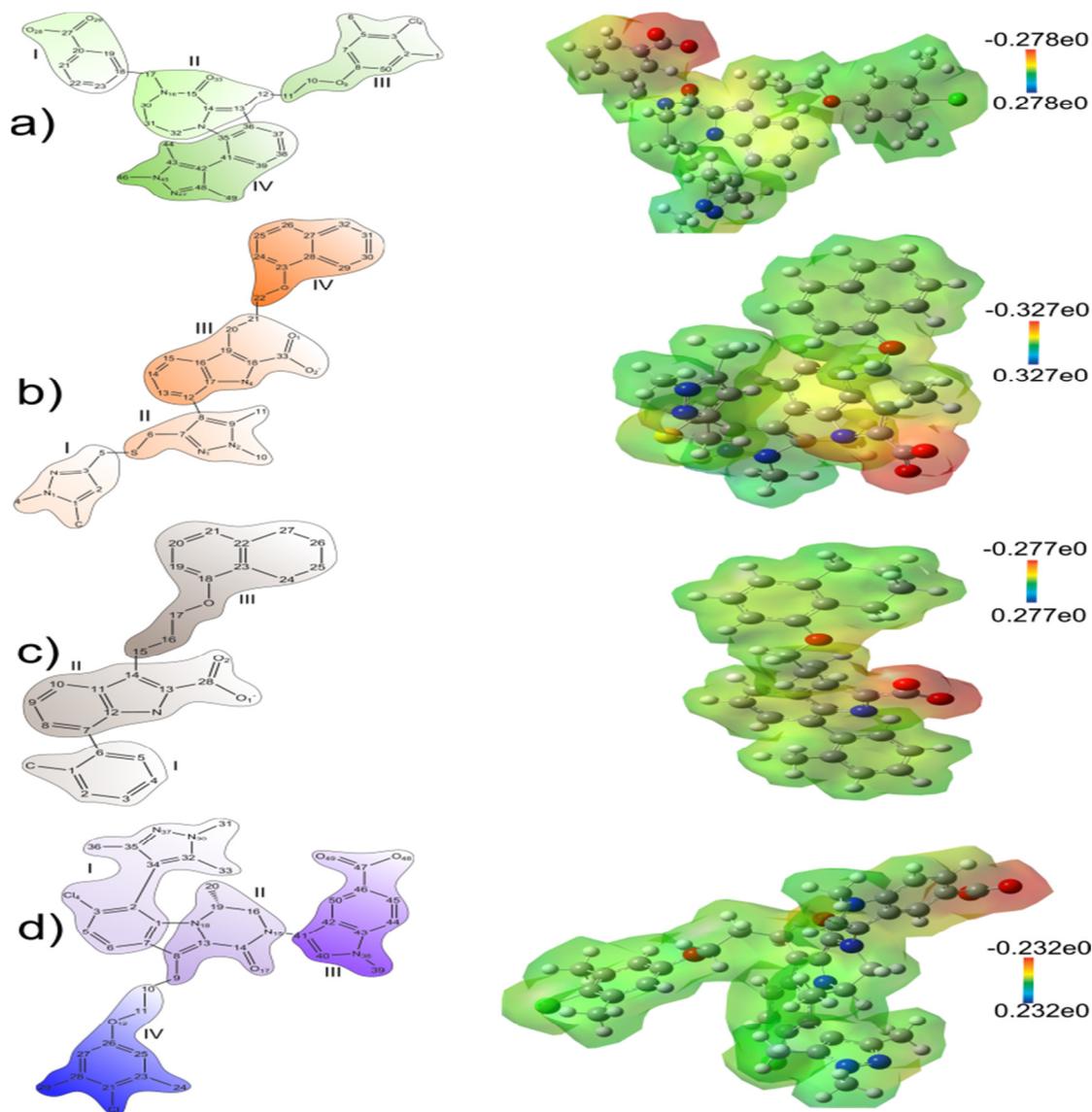
Para melhor descrevermos as interações que ocorrem em cada um dos ligantes com o receptor MCL-1, dividimos os mesmos em regiões facilitando a análise das interações (Figura 6.1), de modo que: S63845 foi dividido em 5 regiões (Figura 6.1a), AZD5991, AM-8621, ECY, E4Q e KJP foram divididas em 4 regiões (Figuras 6.1b, 6.1c, 6.2a, 6.2b e 6.2d, respectivamente) e E4K foi dividido em 4 regiões (Figura 6.2.c).

Figura 6.1 Estrutura química (lado esquerdo) dos compostos S63845 (a), AZD5991 (b) e AM-8621 (c) subdivididos em regiões. Também são mostradas (lado direito) as suas densidades eletrônicas de DFT projetadas em uma isosuperfície de potencial eletrostático.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6.2 Estrutura química (lado esquerdo) dos compostos ECY (a), E4Q (b) e E4K (c) e KJP (D) subdivididos em regiões . Também são mostradas (lado direito) as suas densidades eletrônicas de DFT projetadas em uma isosuperfície de potencial eletrostático



Fonte: Elaborada pela autora.

Os mapas de densidade eletrostática dos sete compostos analisados, em pH fisiológico, demonstram que todos eles possuem um grupamento eletronegativo (cor vermelha), o que pode ser verificado a partir das imagem apresentadas nas Figuras

6.1 e 6.2 (à direita). Nota-se também uma região mais eletropositiva (cor azul) referente à região V de S63845.

Para cada um dos sete ligantes, foram avaliados as energias de interação e os padrões de convergência considerados, de modo que cada um foi devidamente definido por seus raios de bolso de ligação r (Å) e por sua energia de interação correspondente (kcal/mol). Para avaliação das interações entre os complexos MCL-antagonistas foi necessário avaliar todos os resíduos de aminoácidos atrativos (energia negativa) e repulsivos (energia positiva) importantes.

A energia total de ligação para cada raio na bolsa de ligação foi obtida a partir do somatório de todas as interações calculadas de modo a avaliar a convergência, ou seja, para cada raio calculado o valor total de cada um foi aferido. Realizou-se esta análise até que os somatórios provenientes de cada raio não variassem de forma significativa (menos de 10%) a partir da energia total de ligação observada após um raio consecutivo.

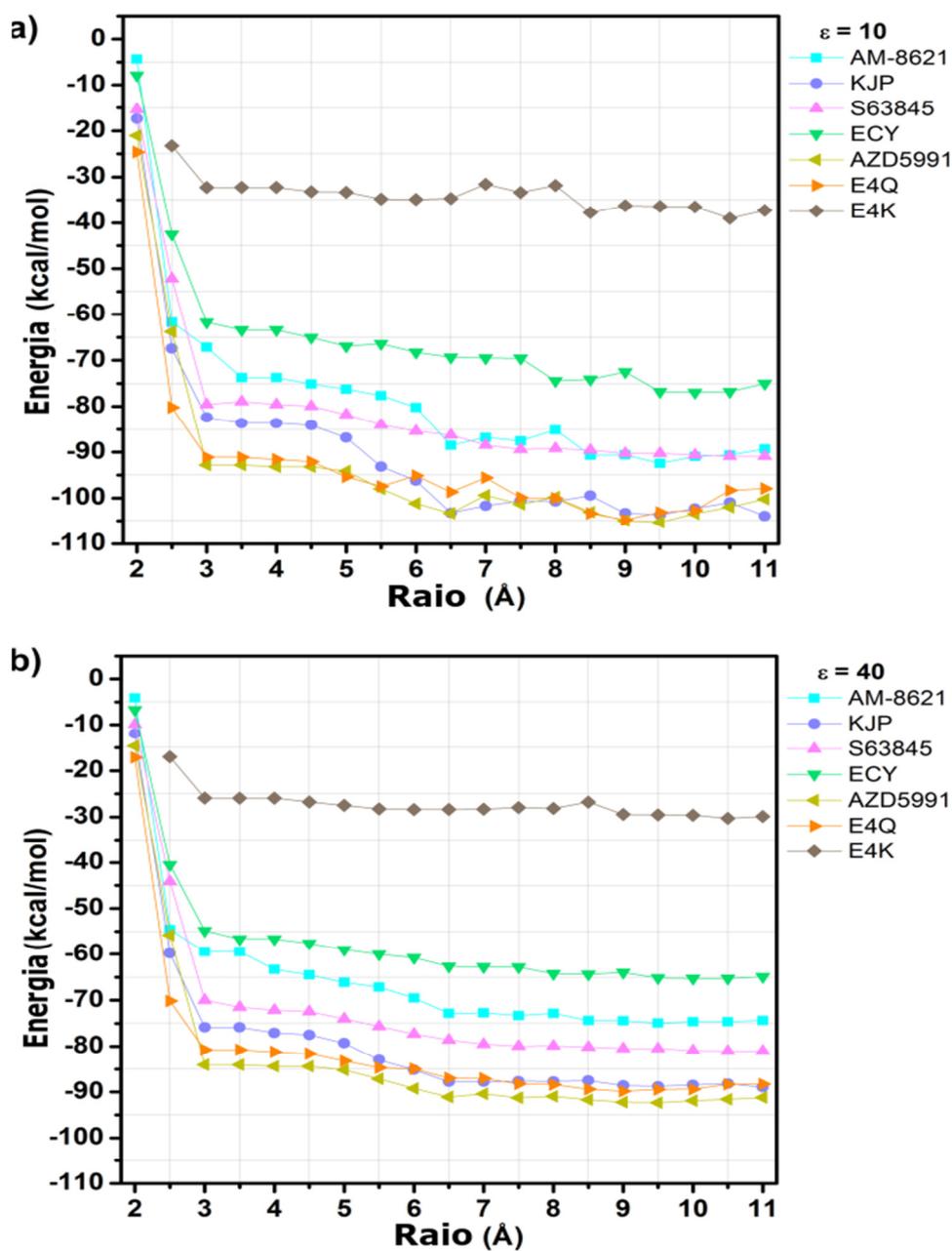
A Figura 6.3 representa a energia total calculada a partir das interações, entre os sete complexos avaliados, em função do raio r , considerando as constantes dielétricas $\epsilon=10$ (Figura 6.3a) e $\epsilon=40$ (Figura 6.3b). Pode ser observado na imagem que a convergência ocorre no raio 5.5 Å (E4K), 6.5 Å (ECY, KJP, AM-8621) e 7.5 Å (S63845, AZD5991, E4Q), levando em consideração $\epsilon=40$, para os ligantes. Assim, para estimar a contribuição de um número considerável de resíduos para a análise e garantir a avaliação de todos os resíduos importantes para as interações entre os sistemas, realizamos os cálculos até o raio 11.0 Å para todos os ligantes, compreendendo um total de 90 (AM-8621), 88 (E4Q, KJP), 87 (AZD5991), 86 (ECY), 80 (S63845), 54 (E4K) interações para os complexos.

A análise da energia total de interação no local de ligação de MCL-1 para os compostos utilizados neste estudo demonstrou os seguintes valores, incluindo a ordem ($\epsilon=10 > \epsilon=40$): KJP (103.93 > -88.95); AZD5991 (-100.25 > -91.20); E4Q (-

97.92 > -88.27); S63845 (-90.87 > -81.80); AM-8621 (-89.30 > -74.35); ECY (74.99 > -64.89); E4K (-37.27 > -29.90), em kcal/mol.

Levando-se em consideração apenas a constante $\epsilon=40$, já que esta representa melhor o ambiente proteico (Ourique *et al*, 2016), a ordem de afinidade fármaco-receptor aqui encontrada foi: AZD5991 > KJP > E4Q > S63845 > AM-8621 > ECY > E4K.

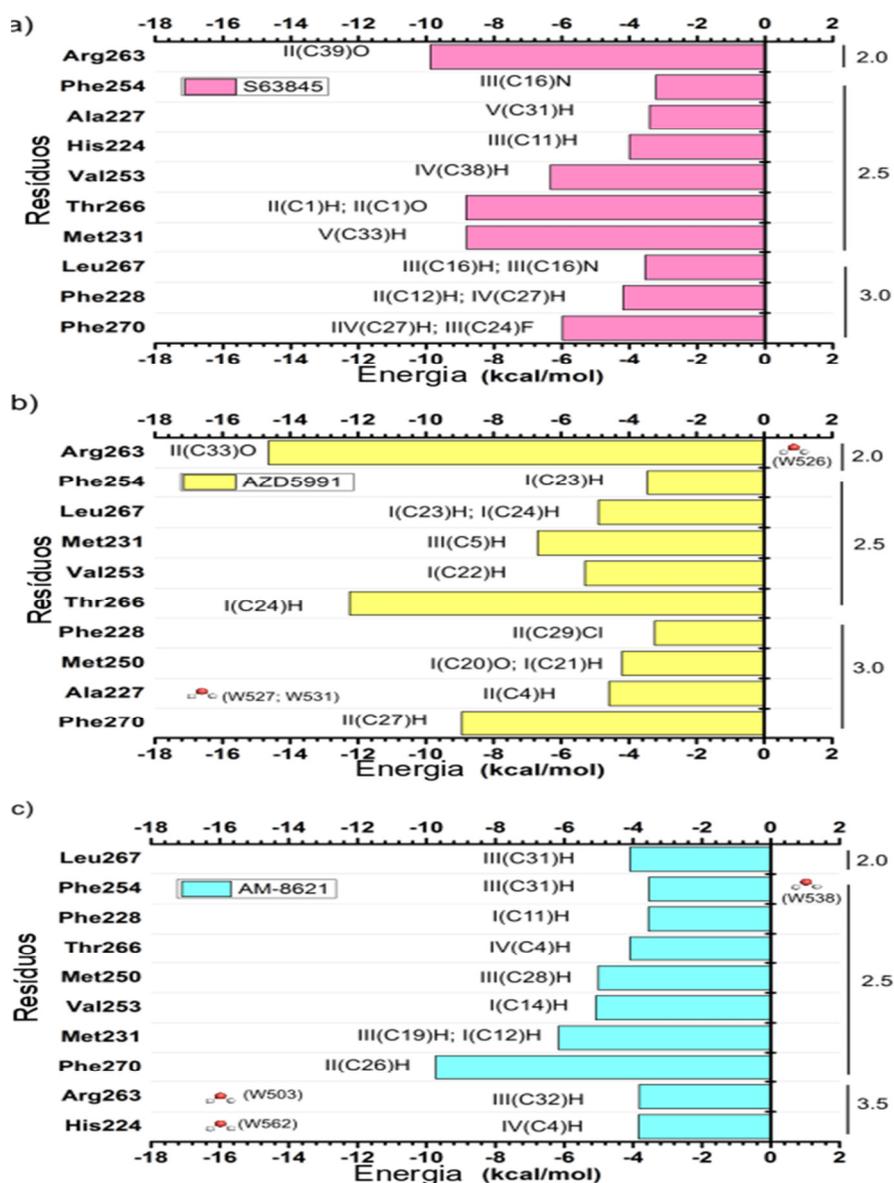
Figura 6.3 Energia de interação total (em kcal/mol) dos complexos Ligante-MCL-1 em função do raio de bolso de ligação r (em Å) calculado usando o funcional GGA B97D no esquema MFCC. Duas constantes dielétricas são consideradas: $\epsilon = 10$ (a) e 40 (b)



Fonte: Elaborado pela autora.

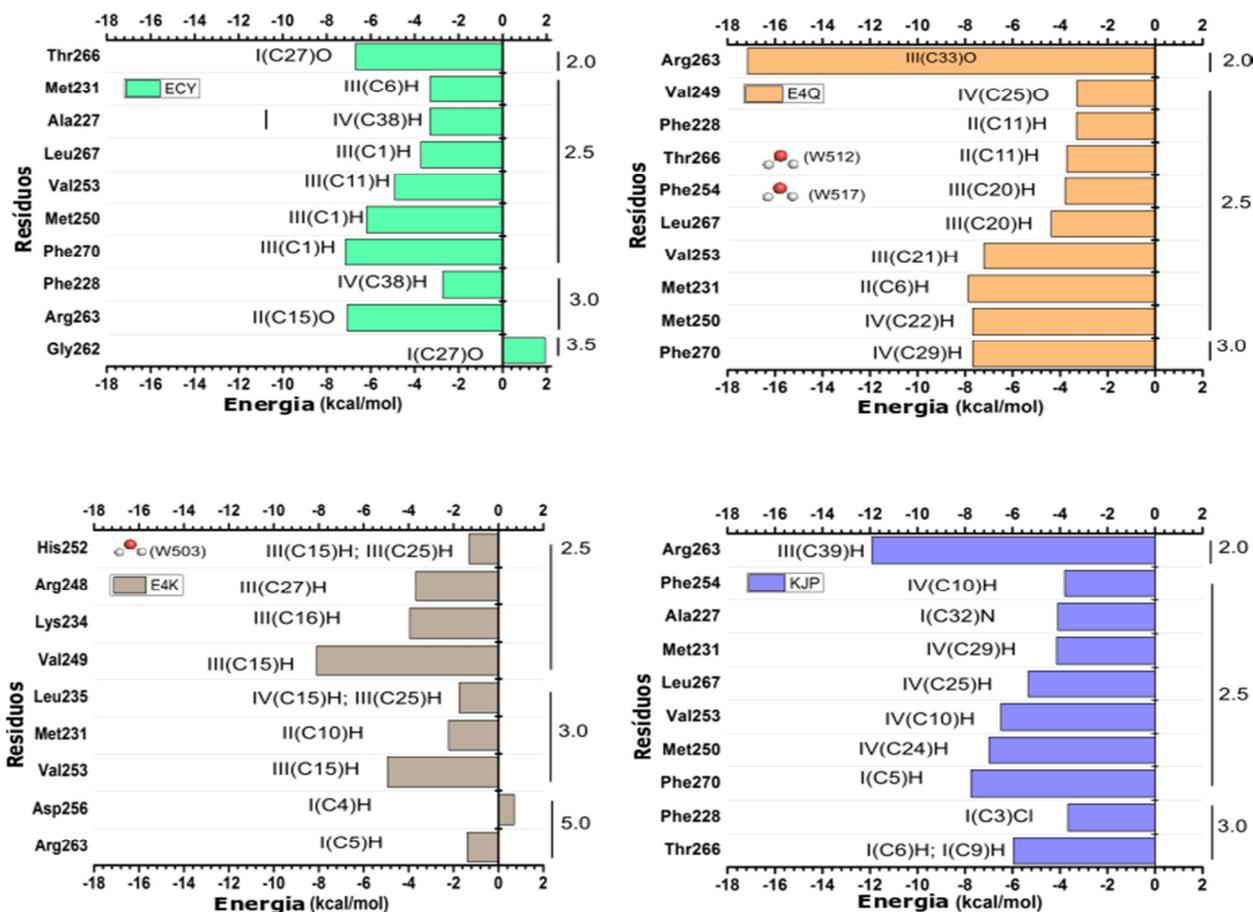
As interações individuais mais importantes que ocorrem entre o MCL-1 e cada um dos ligantes foram observadas, nessa conformidade foram selecionadas as interações que apresentaram energia de interação mais relevantes para cada um dos complexos. As Figuras 6.4 e 6.5 representam as principais interações para cada um dos complexos, sendo demonstrados por barras horizontais, para os valores aferidos para $\epsilon=40$. No lado esquerdo, encontram-se os resíduos mais importantes que contribuem para a ligação dos sistemas complexos, já no lado direito mostra as moléculas de água envolvidas em cada ligação, bem como o raio de interação em que o resíduo é encontrado.

Figura 6.4 Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das energias de interação de três complexos biológicos: (a) S63845 (em rosa), (b) AZD5991 (em amarelo) e (c) AM-8621 (em ciano). Também são mostradas as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante, bem como as regiões e átomos dos ligantes que interagem com cada resíduo no local de ligação. Além disso, moléculas de água que podem interagir com os resíduos destacados também são representadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6.5 Painéis gráficos mostrando os resíduos mais relevantes em relação à contribuição das energias de interação de quatro complexos biológicos: (a) E4Y (em verde), (b) E4Q (em laranja) e (c) E4K (em cinza) e (d) KJP (em azul). Também são mostradas as distâncias mínimas entre cada resíduo e o ligante, bem como as regiões e átomos dos ligantes que interagem com cada resíduo no local de ligação. Além disso, moléculas de água que podem interagir com os resíduos destacados também são representadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores energéticos mais relevantes, obtidos para cada um dos ligantes (para $\epsilon=40$), em ordem decrescente (em kcal/mol) são listados abaixo:

- Para S63845: Arg263 (-9.88) > Thr266 (-8.83) > Met231 (-8.81) > Val253 (-6.34) > Phe270 (-5.98) > Phe228 (-4.19) > His224 (-4.00) > Leu267 (-3.54) > Ala227 (-3.41) > Phe254 (-3.22).
- Para ECY: Phe270 (-7.15) > Arg263 (-7.06) > Thr266 (-6.69) > Met250 (-6.19) > Val253 (-4.90) > Leu267 (-3.72) > Ala227 (-3.31) > Met231 (-3.29) > Phe228 (-2.73) > Gly262 (1.93).
- Para AZD5991: Arg263 (-14.64) > Thr266 (-12.25) > Phe270 (-8.94) > Met231 (-6.70) > Val253 (-5.30) > Leu267 (-4.90) > Ala227 (-4.59) > Met250 (-4.20) > Phe254 (-3.45) > Phe228 (-3.24).
- Para E4Q: Arg263 (-17.15) > Met231 (-7.87) > Phe270 (-7.68) > Met250 (7.68) > Val253 (-7.21) > Leu267 (-4.37) > Phe254 (-3.79) > Thr266 (-3.72) > Phe228 (-3.31) > Val249 (-3.29).
- Para E4K: Val249 (-8.09) > Val253 (-4.94) > Lys234 (-3.95) > Arg248 (-3.67) > Met231 (-2.21) > Leu235 (-1.75) > Arg263 (-1.39) > His252 (-1.30) > Asp256 (0.70).
- Para KJP: Arg263 (-11.92) > Phe270 (-7.75) > Met250 (-6.98) > Val253 (-6.49) > Thr266 (-5.96) > Leu267 (-5.33) > Met231 (-4.14) > Ala227 (-4.09) > Phe254 (-3.80) > Phe228 (-3.66).
- Para AM-8621: Phe270 (-9.73) > Met231 (-6.16) > Val253 (-5.08) > Met250 (-5.01) > Leu267 (-4.09) > Thr266 (-4.09) > His224 (-3.84) > Arg263 (-3.82) > Phe228 (-3.55) > Phe254 (-3.54).

Levando-se em consideração os resíduos energeticamente mais importantes do MCL-1 para cada ligante, os resultados apontaram três resíduos comuns a todos os inibidores, sendo Arg263, Met231 e Val256.

O aminoácido Arg263 foi o resíduo energeticamente mais relevante para quatro das sete drogas avaliadas S63845, AZD5991, E4Q e KJP. Apresentou a formação de ponte salina com S63845 [II(39)O⁻] e E4Q [III(C33)O⁻]. Além disso, foram observadas ligações de hidrogênio entre este resíduo e AZD5991 [II(C33)O], AM-8621 [III(C30)O], ECY [II(C15)O] e KJP [II(C12)O], já o ligante E4K apresentou ligações de hidrogênio não convencionais [(C26)H] com a arginina. De fato, estudos apontaram a importância deste resíduo na estrutura do MCL-1, servindo como uma âncora para a ligação de inibidores ao sítio da proteína no domínio BH3 (Mady *et al.*, 2018). Foi verificado também que pontes de salinas que ocorrem com o Arg263 quando o grupamento ácido carboxílico dos compostos inibidores está localizado na superfície do bolso hidrofóbico, são cruciais para a ligação à proteína (Belmar; Fesik, 2015). Adicionalmente, outros estudos indicaram que o grupamento ácido carboxílico forma uma rede de ligações de hidrogênio com Arg263 e Asn260 (Joseph; Lane; Verma, 2012). Para verificar a provável importância do resíduo Arg263 e colaboradores avaliaram uma mutação R263A do MCL-1, onde o fragmento mutante não apresentou afinidade apreciável ao um inibidor, comprovando que a arginina desempenha um papel significativo no reconhecimento da ligação ao MCL-1 (Gilad *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012).

Já a metionina 231 (Met231) apresentou a formação de interações do tipo alquil- π com os ligantes ECY [III(C8)C] e S63845 [III(C24)C], verificou-se que com os compostos E4K, KJP e AM-862 houve a formação de ligações de van Der Waals do tipo London nas regiões II, IV e II, respectivamente. O ligante E4Q apresentou ligações de hidrogênio não convencionais com a metionina na região II, enquanto o AZD5991 [II(C29)Cl] apresentou interações de seu grupamento cloreto com o ligante. Este resíduo faz parte de um fragmento hidrofóbico, juntamente com His224, Phe228 e Phe270 e experimentos demonstraram que Met231 tem uma significativa importância para as interações com os inibidores de MCL-1 (Abulwerdi *et al.*, 2014).

A Val253, também comumente importante para os sete inibidores, demonstrou a realização de ligações de hidrogênio não covalentes com E4K

[II(C13)N], E4Q [II(N2)N], ECY [III(C10)O], KJP [II(C19)N] e AZD5991 [IV(N2)N]. Interações do tipo alquil- π foram encontradas entre este ligante e S63845 [(C21)C], já com o AZD5991 e AM-8621 ligações de hidrogênio foram encontradas em suas regiões I e II, respectivamente. Estudos em dinâmica molecular utilizando análise de decomposição constataram que o resíduo Val253, Met231 e Leu267 e Phe270 produziram mais contribuições energéticas com inibidores de MCL-1 (Marimuthu; Singaravelu, 2018). Também é descrito que esta valina está envolvida em interações hidrofóbicas com compostos inibidores através do bolso P2 da proteína (Mady *et al.*, 2018). A Figura 6.6 demonstra todos os resíduos, considerados energeticamente importantes a ao menos quatro dos sete compostos químicos estudados aqui.

Figura 6.6 Painel demonstrando os resíduos comumente mais relevantes a pelo menos quatro compostos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Além dos resíduos Arg263, Met231 e Val253, já descritos aqui, os aminoácidos Phe270, Phe228, Phe254, Met250, Leu267, Thr266, e Ala227 também foram relevantes, entretanto, suas importâncias energéticas não foram comuns a todos os inibidores.

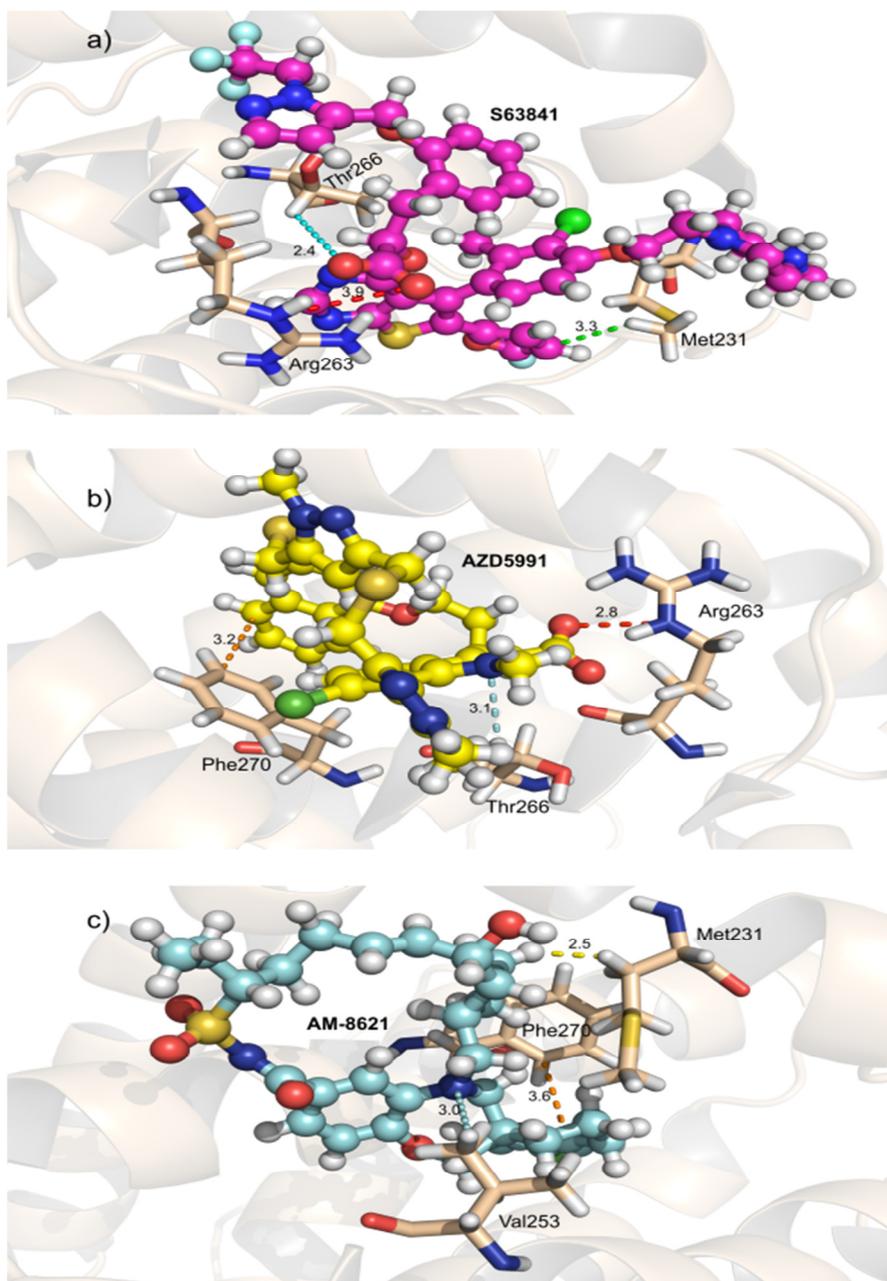
Três fenilalaninas Phe270, Phe228 e Phe254 tiveram destaque por suas relevâncias quanto à interação com os inibidores de MCL-1. O resíduo Phe270 forma ligações do tipo alquil- π com S63845 [III(C23)C], AM-8621 [I(C20)C] e E4Q [IV(C29)H]. É interessante afirmar que os compostos AM-8621, E4Q e AZD5991 demonstraram realizar ligações do tipo π - π à uma distância de 3.63 Å, 3.22 Å e 3.01 Å, respectivamente, notadamente Phe270 foi o resíduo energeticamente mais importante para o inibidor AM-8621, denotando o valor de -9.70 kcal/mol. Já com os compostos ECY [(C3)CI], KJP [I(C3)CI] e AZD5991 [II(C29)CI] há interação deste aminoácido com o grupamento cloreto destes. O resíduo da posição 270 está envolvido em interações hidrofóbicas com as porções químicas dos compostos no bolso P3 (Marimuthu; Singaravelu, 2018) Já a Phe228 realiza interações alqui- π com S63845 [III(C12)H], AM-862 [I(C11)H] e AZD5991[], adicionalmente, foram verificadas interações de hidrogênio não convencionais e AM-8621, experimentos que verificaram uma mutação na posição 228 demonstraram que a proteína MCL-1 não teve sua função anti-apoptótica abolida na presença desta mutação (Fujise *et al.*, 2000). Enquanto isso, o aminoácido Phe254 apresenta ligações não covalentes com S63845 [III(C16)N], E4Q [III(C20)H] e KJP [IV(C10)H], ademais, faz interações do tipo London com AZD5991 [I(23)H] e AM-8621 [III(C31)H]. Outros estudos utilizando dinâmica molecular avaliaram, a partir de análises de acoplamento que grupamentos fenil de inibidores formam interações π - π com o anel aromático de cadeia lateral de Phe254 e Phe270, sendo importante para a estabilidade no acoplamento de inibidores (Singaravelu; Balasubramanian; Marimuthu, 2019).

Já o resíduo Met250 apresentou ligações do tipo alquil- π com AM-8621 [I(C23)C], ligações de London com KJP [IV(C24)H] e ligação de hidrogênio não convencional com AZD5991 [(C20)O]. Este aminoácido também é crucial para a estabilidade no bolso hidrofóbico da proteína (Marimuthu; Singaravelu, 2019). Já a Leu267 perfaz ligações de hidrogênio não convencionais com S63845 [III(C16)N], E4Q [IV(C22)H], KJP [IV(C25)H], ECY [III(C1)H], AZD5991 [I(C23)H] e AM-8621 [II(C31)H]. Finalmente, o aminoácido Thr266 também realizou ligações de hidrogênio

com estes mesmos compostos, adicionalmente, houve a presença de ligação de halogênio com o composto S63845 [I(C10)F], ligações de hidrogênio não convencionais e alquil- π com AZD5991 e ligação íon dipolo com ECY [I(C27)O⁻].

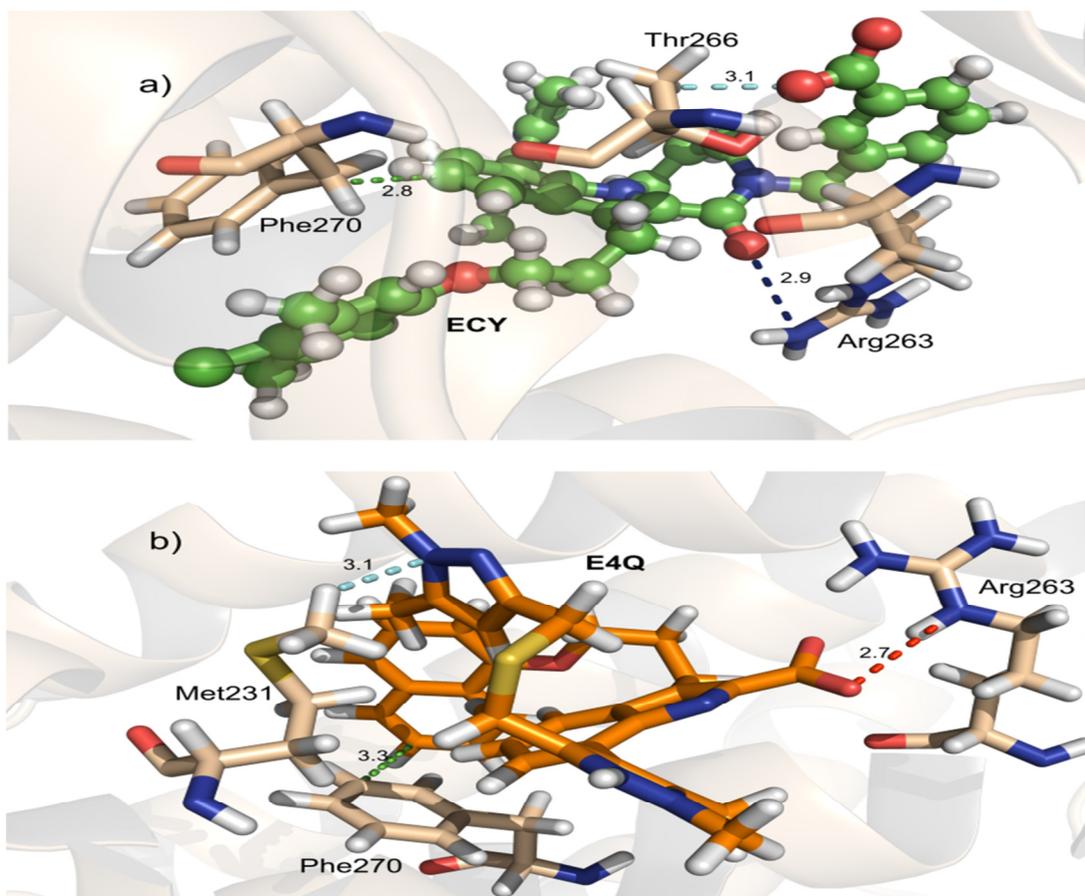
De modo particular, o aminoácido His224 demonstrou fortes energias de interação com S63845 [II(C12)H] e AM-8621 [III(C4)H], em ambos os compostos foram identificadas ligações de London em interação com o resíduo, assim como a Val249 que apresentou importância energética apenas para E4Q. Já o resíduo Gly262 foi denotado importante somente para o ligante ECY [I(C27)O], sendo identificadas interações de hidrogênio não convencionais. As Figuras 6.7, 6.8 e 6.9 representam os três resíduos que apresentaram maior valor de energia para cada um dos ligantes.

Figura 6.7 Três principais interações para os compostos (a) S63845, (b) AZD5991 e (c) AM-8621. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (ciano) e ponte salina (vermelho), interações alquil- π (verde).



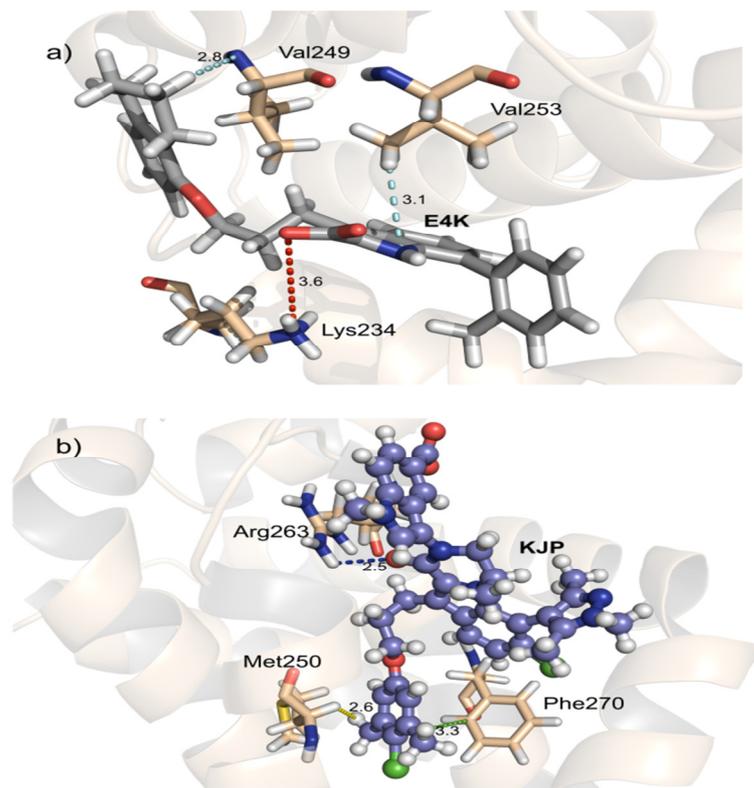
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6.8 Três principais interações para os compostos (a) ECY (b) E4Q. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio (azul), ligações de hidrogênio não convencionais (ciano), interações alquil- π (verde), ponte salina (vermelho).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6.9 Três principais interações para os compostos (a) E4K (b) KJP. Linhas tracejadas correspondem a ligações de hidrogênio não convencionais (verde) e forças de dispersão de London (amarelo)



Fonte: Elaborado pela autora

Finalmente, uma análise energética das regiões de cada inibidor foi realizada aqui, assim conferiram-se quais as regiões mais influentes quanto a interação com a proteína. Esta avaliação é importante visto que cada droga possui características químicas particulares, assim, pode-se prever quais grupamentos foram mais atuantes em cada composto, assim, definimos os valores energéticos totais para cada região em todos os compostos. A seguir, estão listados, em ordem decrescente, a influência energética das regiões (em kcal/mol):

- S63845: região II (-27.48) > III (-17.42) > V (-14.20) > IV (-12.89) > I (-8.70)
- AZD5991: região III (-30.57) > II (-28.94) > I (-27.07) > IV (-4.62)
- AM-8621: região II (-33.05) > III (-18.47) > I (-12.89) > IV (-9.94)
- KJP: região I (41.79) > IV (-26.58) > III (-20.08) > II (0.5)

- E4Q: região III (-37.02) > IV (-30.53) > II (-11.99) > I (-8.73)
- E4K: região III (-25.14) > II (-3.41) > I (-1.35)
- ECY: região III (-40.70) > IV (-9.80) > II (-7.22) > I (-7.17)

De acordo com os resultados as regiões mais importantes para S63845, AM-8621, ECY, KJP e E4Q exibem grupamentos ácido carboxílico e/ou cloreto, demonstrando a importância destes grupamentos para a afinidade dos fármacos. De fato, isso é conferido com dados existentes na literatura, onde relata-se que muitos inibidores de MCL-1 compartilham várias características químicas como a porção ácida que interage fortemente com Arg263, quiralidade, atropisomerismo (S63845, AZD5991), além da presença de átomos de cloro que auxiliam no aumento da afinidade. Isso, juntamente com outros atributos estruturais, resulta em um andaime rígido e pré-organizado para a ligação a proteína MCL-1 com alta afinidade (Hide; Tron, 2019).

6.3 Conclusões

A proteína superexpressão Mcl-1 emergiu como um fator crítico na resistência à apoptose de uma ampla gama de cânceres e, portanto, sua inibição tornou-se um objetivo muito procurado. Progressos significativos têm sido feitos nos últimos anos, entretanto, nenhuma droga inibidora foi aprovada para uso em pacientes.

Na tentativa de esclarecer as particularidades que envolvem as interações entre diferentes inibidores de MCL-1, aqui neste trabalho, as energias de interação entre o MCL-1 e as drogas foram quantificadas e qualificadas utilizando-se métodos de Mecânica Quântica.

Os resultados aqui apresentados demonstraram que a ordem de relevância quanto à afinidade fármaco-receptor foi AZD5991 (-91.20 kcal/mol) > KJP (-88.95 kcal/mol) > E4Q (-88.27 kcal/mol) > S63845 (-81.80 kcal/mol) > AM-8621 (-74.35 kcal/mol) > ECY (-64.89 kcal/mol) > E4K (-29.90 kcal/mol).

Em relação as interações individuais foi encontrado que os resíduos Arg263, Met231 e Val253 foram energeticamente importantes comuns a todos os compostos avaliados. E a Arg263 foi o resíduo que apresentou maior valor energético para quatro dos sete compostos estudados sendo eles, KJP, E4K, AZD5991 e S63845. Ressalta-se também a importância dos aminoácidos Phe270, Phe228, Phe254, Leu267 e Thr266 que apresentaram energias de interação forte com seis inibidores, exceto E4K. Já Met250 denotou interações importantes com cinco inibidores, à exceção de S93845 e E4K, enquanto Ala227 apresentou interessantes valores de energia para os inibidores AZD5991, KJP, ECY, e S63845.

Os resultados aqui descritos são apoiados pela literatura vigente que demonstra a importância destes resíduos para o bolso hidrofóbico da proteína. Entretanto há muito a ser explorado quanto à busca de agentes que tenham potencial para inibir a proteína anti-apoptótica. E o esclarecimento das interações mais pertinentes aqui demonstrado pode ser importante para o delineamento de agentes farmacológicos seletivos e potentes que tenham como objetivo atuar nas vias sinalizadoras da apoptose.

7. Conclusões e Perspectivas

Os trabalhos aqui destacados enfatizaram a temática discutida anteriormente na introdução deste manuscrito, onde é abordada a importância de estudos que envolvam uma base para o desenvolvimento de fármacos que tenha uma ação significativa tanto no combate à resistência bacteriana quanto à cura em doenças cancerígenas.

De fato, os estudos realizados aqui demonstram a importância de se obter um conhecimento específico no que concerne as peculiaridades envolvidas nos complexos fármaco-receptor. O primeiro trabalho revelou particularidades envolvidas nas interações entre compostos que atuam no receptor androgênico na presença de uma importante mutação, elucidando quais resíduos são mais influentes na promiscuidade do receptor frente à ação de diferentes compostos químicos e incrementando dados adicionais sobre o modo de atuação de drogas no receptor mutante. Já o segundo trabalho demonstrou quais regiões podem ser mais atuantes no bolsão de ligação do RNA ribossômico, esta análise tem importância crucial visto que hoje há uma escassez de fármacos antimicrobianos no combate a infecções resistentes e informações pertinentes a cerca do sítio alvo são de grande relevância para a proposta de novos antibióticos.

Por fim, o terceiro trabalho apresentou as energias de interação envolvidas nos complexos formados por MCL-1 e inibidores, demonstrando os principais resíduos de aminoácido que influenciam a interação com o inibidor, desvendando assim particularidades que podem direcionar estudos que envolvam o direcionamento no modo de atuação e desenvolvimento de novos inibidores, além de elucidar o modo de ação destes compostos até então pouco estudados. Logo os resultados aqui demonstrados permitirão um melhor entendimento sobre as especificidades únicas e a natureza das interações que envolvem todos os complexos envolvidos.

Muito ainda falta a ser pesquisado para um melhor esclarecimento nos contextos aqui demonstrados, cujos participantes são proteínas extremamente importantes em diversas funções biológicas, que quando defeituosas, podem promover uma série de doenças e alterações indesejáveis ao ser humano.

A descoberta de novas drogas a partir do conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares, provenientes das simulações computacionais, que envolvem as interações entre o alvo farmacológico e as drogas, passou a ter uma grande importância no campo das Ciências Médicas e da Farmacologia, já que a utilização destes métodos apresenta uma vasta gama de aplicabilidades a nível prático.

O conhecimento sobre os aspectos energéticos, bem como sua influência nos sistemas avaliados deve aprimorar o *design* de compostos, visando fornecer informações que possam ser úteis às indústrias e pesquisas experimentais, na tentativa de promover a obtenção de fármacos com melhor afinidade e menor toxicidade. Contudo, o maior desafio é integrar o conhecimento a cerca destas interações com novas pesquisas que possam realmente trazer implicações terapêuticas para doenças diversas como o câncer, Alzheimer, síndromes ateroscleróticas e isquêmicas, miocardiopatias, infecções resistentes entre muitas outras.

Finalmente, é possível que a pesquisa sobre o reconhecimento de ligantes por proteínas possa revelar estratégias otimizadas para a descoberta de novos fármacos. Assim, é necessário enfatizar que muitos outros sistemas associados a diversas doenças podem ser investigados através da simulação computacional, conferindo a esta ferramenta um potencial de alto impacto.

Referências Bibliográficas

Aggen, J. B.; Armstrong, E. S.; Goldblum, A. A.; Dozzo, P.; Linsell, M.S.; Gliedt, M. J.; Hildebrandt, D. J.; Feeney, L. A.; Kubo, A.; Matias, R. D.; Lopez, S.; Gomez, M.; Wlasichuk, K. B.; Diokno, R.; Miller, G. H.; Moser, H. E. Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. **Antimicrob Agents Chemother.** 54(11):4636-42, 2010.

Akcay, G.; Belmonte, M. A.; Aquila, B.; Chuaqui, C.; Hird, A. W.; Lamb, M. L.; Su, Q. Inhibition of Mcl-1 through covalent modification of a noncatalytic lysine side chain. **Nature Chemical Biology** 12, 931–936, 2016.

Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell: Reference Edition*, Taylor & Francis, **New York, NY, USA** 2008.

Albuquerque, E. L.; Fulco, U. L.; Freire, V. N.; Caetano, E. W. S.; Lyra, M. L. and de Moura, F. A. B. F. DNA-based nanobiostructured devices: The role of quasiperiodicity and correlation effects. **Phys. Rep.** 535, 139-209, 2014.

Albuquerque, E. L.; Fulco, U. L.; Freire, V. N.; Caetano, E. W. S.; Lyra, M. L.; de Moura, F. A. B. F. DNA-based nanobiostructured devices: The role of quasiperiodicity and correlation effects. **Phys. Rep.** 535, 139-209, 2014.

Ali, R.; Inhibition of Sodium/Proton Exchange by a Rab-GTPase-activating Protein Regulates Endosomal Traffic in Yeast. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p.4498-4506, 6 nov. 2003.

Allers, J.; Shamoo, Y. Structure-based analysis of protein-RNA interactions using the program ENTANGLE. **J. Mol. Biol.**, 311, 75-86, 2001.

Alsunaidi, Z.; Wilson, A. K. DFT and *ab initio* composite methods: Investigation of oxygen fluoride species. **Computational and Theoretical Chemistry**. 1095, 71-82, 2016.

Andriole, G. L.; Marberger, M.; Roehrborn, C.G. Clinical usefulness of serum prostate specific antigen for the detection of prostate cancer is preserved in men receiving the dual 5alpha-reductase inhibitor dutasteride. **J Urol**. 175(5):1657, 2006.

Antony, J. and Grimme, S. Fully *ab initio* protein-ligand interaction energies with dispersion corrected density functional theory. **J. Comput. Chem.** 33, 1730-1739, 2012.

Aslam, B.; et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect Drug Resist.** 11: 1645–1658, 2018.

ASM Press, Washington, DC Hancock, R. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. **Lancet Infect. Dis.** 5:209-218, 2005.

Atkins, P.; Friedman, R. Molecular Quantum Mechanics. 4. ed. **Oxford; New York: Oxford University Press Inc.**, 2005.

Attard, G.; Parker, C.; Eeles, R. A.; F. Schröder, S. A. Tomlins, I. Tannock, C. G. Drake, J. S. de Bono. Prostate Cancer. **Lancet** 387, 70-82, 2016.

Balbas, M. D.; Evans, M. J.; Hosfield, D. J.; Wongvipat, J.; Arora, V. K.; Watson, P. A.; Chen, Y.; Greene, G. L.; Shen, Y.; Sawyers, C. L. Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. **Elife**. 9, 2:e00499, 2013.

Begley C.G.; Ellis, L. M. Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*, v. 483, p. 531-533, 2012.

- Benedek, N. A.; Snook, I. K.; Latham, K.; Yarovsky, I. Application of numerical basis sets to hydrogen bonded systems: a density functional theory study. **J. Chem. Phys.** 122, 144102, 2005.
- Berland, K.; Cooper, V. R.; Lee, K.; Schröder, E.; Thonhauser, T.; Hyldgaard, P.; Lundqvist, B. I. van der Waals forces in density functional theory: a review of the vdW-DF method. **Rep. Prog. Phys.** 78, 066501, 2015.
- Bevan, C. L.; Brown, B. B.; Davies, H. R.; B. A. J. Evans, I. A. Hughes and M. N. Patterson. Functional analysis of six androgen receptor mutations identified in patients with partial androgen insensitivity syndrome. **Hum. Mol. Genet.** 5, 265-273, 1996.
- Bezerra, K. S.; Fulco, U. L.; Esmale, S. C.; Lima Neto, J. X.; Machado, L. D.; Freire, V. N.; Albuquerque E. L. and Oliveira. J. I. N. Ribosomal RNA Aminoglycoside Hygromycin B Interaction Energy Calculation within a Density Functional Theory Framework. **J. Phys. Chem. B** 123, 6421-6429, 2019.
- Bezerra, K. S.; Neto, J. L.; Oliveira, J. I. N.; Albuquerque, E. L.; Caetano, E. W. S.; Freire, V. N. and Fulco, U. L. Computational investigation of the $\alpha_2\beta_1$ integrin–collagen triple helix complex interaction. **New J. Chem.** 42, 17115-17125, 2018.
- Bezerra, K. S.; Oliveira, J. I. N.; Lima Neto, J. X.; Albuquerque, E. L.; Caetano, E. W. S.; Freire, V. N.; Fulco, U. L. Quantum binding energy features of the T3-785 collagen-like triple-helical peptide. **RSC Adv.** 7, 2817-2828, 2017.
- Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **J. Med. Chem.** 53, 5061-5084, 2010.
- Bohl, C. E.; Miller, D. D.; Chen, J.; Bell, C. E.; and Dalton, J. T. Structural Basis for Accommodation of Nonsteroidal Ligands in the Androgen Receptor. **J. Biol. Chem.** 280, 37747-37754, 2005.
- Bohl, C. E.; Wu, Z.; Miller, D. D.; Bell, C. E. and Dalton, J. T. Crystal Structure of the T877A Human Androgen Receptor Ligand-binding Domain Complexed to Cyproterone Acetate Provides Insight for Ligand-induced Conformational Changes and Structure-based Drug Design. **J. Biol. Chem.** 282, 13648-13655, 2007.
- Boise, L. H.; et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. **Cell** 74, 597–608, 1993.

Borovinskaya, M. A.; Shoji, S.; Fredrick, K.; Cate, J. H. D. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. **RNA** 14, 1590-1599, 2008.

Böttger, E. C. Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity - lessons to be learned. **Cell. Mol. Life Sci.** 64, 791-795, 2007.

Boussessi, R.; Ceselin, G.; Tasinato, N.; Barone, V. DFT meets the segmented polarization consistent basis sets: Performances in the computation of molecular structures, rotational and vibrational spectroscopic properties. **J. of Mol. Struct.** 1208, 1-12, 2020.

Boyd, D. B. Compendium of software for molecular modeling. In: Lipkowitz, K. B. & Boyd, D. B. Reviews in computational chemistry. **VCH Pub, New York**, 1990.

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.** 68, 394-424, 2018.

Brinkmann, L.; Heifets, E.; Kantorovich, L. Density functional calculations of extended, periodic systems using Coulomb corrected molecular fractionation with conjugated caps method (CC-MFCC). **Phys. Chem.** 16, 21252-21270, 2014.

Brodersen, D. E.; Clemons Jr, W.M.; Carter, A.P.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B.T.; Ramakrishnan, V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30 S ribosomal subunit. **Cell** 103 pp. 1143–1154, 2003.

Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 32, 335-373, 2003.

Bryskier, A. Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals. **ASM Press**. 2005.

Burke, K. Perspective on density functional theory. **The Journal of chemical physics**, v. 136, n. 15, p. 150901, 2012.

Byron, S. A.; et al. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. **Nat. Rev. Genet.** 17, 257-271, 2016.

Cabañas, M. J.; Vazquez, D.; Modolell, J. Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 83, 991-997, 1978.

Caenepeel, S., et al. AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies. **Cancer Discov** 8: 1582-1597, 2018.

Caenepeel, S.; Brown, S. P.; Belmontes, B.; Moody, G.; Keegan, K. S.; Chui, D.; Hughes, P. E. AMG 176, a selective MCL1 inhibitor, is effective in Hematological Cancer models alone and in combination with established therapies. **Cancer Discovery** 8,1582–1597, 2018.

Calvete, A. C. et al. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do PSA, da porcentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. **Prev. Assoc. Med. Bras., São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 250-254, 2003.

Carlsson S, Assel M, Sjoberg D, Ulmert D, Hugosson J, Lilja H, et al. Influence of blood prostate specific antigen levels at age 60 on benefits and harms of prostate cancer screening: population based cohort study. **BMJ**. 348:g2296, 2014.

Chen, L.; Calin, G. A.; Zhang, S. Novel insights of structurebased modeling for RNA-targeted drug discovery. **J. Chem. Inf. Model.** 52, 2741-2753, 2012.

Chen, L.; Wolff, D. W.; Xie, Y.; Lin, M. F. and Tu, Y. Cyproterone acetate enhances TRAIL-induced androgen-independent prostate cancer cell apoptosis via up-regulation of death receptor 5. **BMC Cancer**. 17, 1-11, 2017.

Chen, X. H.; Zhang, J. Z. H. Theoretical method for full abinitio calculation of DNA/RNA-ligand interaction energy. **J. Chem.Phys.** 120, 11386-11391, 2004.

Chen, Y.; Clegg, N. J. and Scherb H. I. Anti-androgens and androgen depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. **Lancet Oncol.** 10, 981-991, 2009.

Collins, M. A.; Bettens, R. P. Energy-based molecular fragmentation methods. **Chem. Rev.** 115, 5607-5642, 2015.

Cooper, T. A.; Wan, L.; Dreyfuss, G. RNA and disease. **Cell** 136, 777-739, 2009.

Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G. and Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. **J. Comput. Chem.** 24, 669-681, 2003.

Coutinho-Camillo, C. M.; Salaorni, S.; Sarkis, A. S.; Nagai, M. A. Differentially expressed genes in the prostate cancer cell line LNCaP after exposure to androgen and antiandrogen. **Cancer Genet. Cytogenet.** 166, 130–138, 2006.

Cowan, J. A.; Ohyama, T.; Wang, D.; Natarajan, K. Recognition of a cognate RNA aptamer by neomycin B: quantitative evaluation of hydrogen bonding and electrostatic interactions. **Nucleic Acids Res.** 28, 2935-2942, 2000.

Craig, R. W. MCL-1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. **Leukemia**, 16, 444–454, 2002.

Cui, Q. Perspective: Quantum mechanical methods in biochemistry and biophysics. **J. Chem. Phys.** 145, 140-901, 2016.

Culig, Z.; Hobisch, A.; Bartsch, G.; Klocker, H. Interleukin-6 Regulates Prostate-specific Protein Expression in Prostate Carcinoma Cells by Activation of the Androgen Receptor. **Urol. Research.** 28, 211-219, 2000

Cuzick, J., et al. Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. **Lancet Oncol. Oct**; 15(11): e484–e492, 2014.

D’Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int** 43, 582–592, 2019.

da Costa, R. F.; Freire, V. N.; Bezerra, E. M.; Cavada, B. S.; Caetano, E. W. S.; de Lima Filho, J. L.; Albuquerque, E. L. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. **Phys. Chem. Chem. Phys.** 14, 1389-1398, 2012.

Dantas, D. S.; Oliveira, J. I. N.; Lima Neto, J. X.; da Costa, R. F.; Bezerra, E. M.; Freire, V. N.; Caetano, E. W. S.; Fulco, U. L.; Albuquerque, E. L. A quantum biochemistry model of the interaction between the estrogen receptor and the two antagonists used in breast cancer treatment. **RSC Adv.** 5, 49439-49450, 2015.

Dantas, D. S.; Oliveira, J. I. N.; Lima Neto, J. X.; da Costa, R. F.; Bezerra, E. M.; Freire, V. N.; Caetano, E. W. S.; Fulco, U. L.; Albuquerque, E. L. Quantum molecular modelling of ibuprofen bound to human serum albumin. **RSC Adv.** 5, 49439-49450, 2015.

Davey R. A.; and Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **Clin. Biochem. Rev.** 37, 3-15, 2016.

Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev.** 74(3):417–433, 2010.

Dawson, N.A. Hormonal therapy for prostate cancer: what you need to know. **In: Proceedings of Annual Meeting of ASCO. Educational Book**, 34, Los Angeles. Bologna: Monduzzi, p 368-72, 1998.

de Jésus-Tran, K. P.; Côté, P.; Cantin, L.; Blanchet, J.; Labrie, F and Breton, R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. **Protein Sci.** 15, 987-999, 2006

de Sousa, B. G.; Oliveira, J. I. N.; Albuquerque, E. L.; Fulco, U. L.; Amaro, V. E.; Blaha, C. A. G. Molecular modelling and quantum biochemistry computations of a naturally occurring bioremediation enzyme: Alkane hydroxylase from *Pseudomonas putida* P1. **J. Mol. Graphics Modell.** 77, 232-239, 2017.

de Stasio, E. A.; Dahlberg, A. E. Effects of mutagenesis of a conserved base-paired site near the decoding region of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. **J. Mol. Biol.** 212, 127-133, 1990.

Delley, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **J. Chem. Phys.** 92, 508-517, 1990.

Denayer, S.; Helsen, C.; Thorrez, L.; Haelens, A.; Claessens, F; The rules of DNA recognition by the androgen receptor. **Molecular Endocrinology** 24 898–913., 2010.

Denayer, S.; Helsen, C; Thorrez, L.; Haelens, A.; Claessens, F. The rules of DNA recognition by the androgen receptor. **Molecular Endocrinology** 24 898–913, 2010.

Derewenda, Z. S.; Lee, L.; Derewenda, U. The occurrence of CH···O hydrogen bonds in proteins. **J. Mol. Biol.** 252, 248-262, 1995.

Dewar, et al. A new general purpose quantum mechanical molecular model. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, p. 3902- 3909, 1985.

Dill, K.A.; et al. The protein folding problem: when will it be solved? **Current Opinion in Structural Biology**, v.17(3), p. 342-346, 2007.

Draft recommendation statement. Prostate Cancer: screening. Rockville, (MD): **U.S. Preventive Services Task Force**; 2016.

Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. **Science**. 287, 1960-1964. 2000.

Drews, J. Strategic trends in the drug industry. **Drug Discovery Today**. 8 (9), 411-420. 2003.

Duke, C. B.; Jones, A.; Bohl, C. E.; Dalton, J. T. and Miller, D. D. Unexpected Binding Orientation of Bulky-B-Ring Anti-Androgens and Implications for Future Drug Targets. **J. Med. Chem.** 54, 3973-3976, 2011

Dunning Jr, T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. **ChemPhysChem**. 90, 1007-1023, 1989.

Eastham, J. Prostate cancer screening. **Investig Clin Urol**. 58(4): 217–219, 2017.

Eggerer, S.E.; Cifu, A.S.; Nabhan C. Prostate cancer screening. **JAMA**. 314(8):825-826, 2015.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**. 35(4): 495–516, 2015.

Farla, P.; Hersmus, R.; Trapman, J.; Houtsmuller, A. B. Antiandrogens prevent stable DNA-binding of the androgen receptor. **J. Cell Science**. 118, 4187-4198, 2005.

Freedman, L. P. Molecular biology of steroid and nuclear hormone receptors. **Birkhauser; Boston, MA**: 1998.

Gaggelli, E.; Gaggelli, N.; Molteni, E.; Valensin, G.; Balenci, D.; Wronska, M.; Szczepanik, W.; Nagaj, J.; Skałła, J.; Jezowska-Bojczuk, H. M. Coordination pattern, solution structure and DNA damage studies of the copper(II) complex with the unusual aminoglycoside antibiotic hygromycin B. **Dalton Trans. Dalton Trans**. 39, 9830-9837, 2010.

Gao, W.; Bohl and C. E.; Dalton, J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. **Chem. Rev.** 105, 3352-3370, 2005.

Goerigk, L.; Kruse, H.; Grimme, S Benchmarking Density Functional Methods against the S66 and S66x8 Datasets for Non-Covalent Interactions. **Chem Phys Chem**. 12, 3421-3433, 2011.

Goldey, M.; Dutoi, A.; Head-Gordon, M. Attenuated second-order Møller–Plesset perturbation theory: performance within the aug-cc-pVTZ basis. **Phys Chem Chem Phys.** 15, 15869-15875, 2013.

Gonzalez, A.; Jimenez, A.; Vazquez, D.; Davies, J. E.; Schindler, D. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. **Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth.** 521, 459-469, 1978.

Goodman, L. S.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. **10th ed. McGraw-Hill Medical Pub. Division; New York:** 2001.

Gordon, M. S.; Fedorov, D. G.; Pruitt S. R. and Slipchenko, L. V. Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems. **Chem. Rev.** 112, 632-672, 2012.

Gregory, S. T.; Carr, J. F.; Rodriguez-Correa, D.; Dahlberg, A. E. Mutational analysis of 16S and 23S rRNA genes of *Thermus thermophilus*. **J. Bacteriol.** 187, 4804-4812.

Grimme, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. **J. Comput. Chem.** 27, 1787-1799, 2006.

Guo, P. The emerging field of RNA nanotechnology. **Nat.Nanotechnol.** 5, 833-842, 2010.

Hainrichson, M.; Nudelman, I.; Baasov, T. Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. **Org. Biomol. Chem.** 6, 227-239, 2008.

Hamasaki, K.; Killian, J.; Cho, J.; Rando, R. R. Minimal RNA constructs that specifically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities. *Biochemistry* 37, 656-663, 1998.

Heinlein, C. A.; Chang, C. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. **Endocr. Rev** 23:175, 2002.

Helsen, C.; Van den Broeck, T.; Voet, A.; Prekovic, S.; Van Poppe, H.; Joniau, S. and Claessens, F. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. **Endocr. Relat. Cancer.** 21, 105-118, 2014.

Hendriksen P. J.; Dits N.F.; Kokame, K.; Veldhoven, A.; van Weerden W. M.; Bangma, C. H.; Trapman, J & Jenster, G. Evolution of the androgen

receptor pathway during progression of prostate cancer. **Cancer Research** 66, 5012–5020, 2006.

Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 407:770–6, 2000.

Higano, C. S.; Crawford, E.D. New and emerging agents for the treatment of castration-resistant prostate cancer. **Urologic Oncology** 29, S1–S8, 2011.

Hird; A. W.; Tron, A. E. Recent advances in the development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics** 198, 59–67, 2019.

Hohenberg, P.; Kohn, W. The Inhomogeneous Electron Gas. **Phys. Rev.**, v. 136, n. 5, p. B864, 1964.

Honda GD, Bernstein L, Ross RK, Greenland S, Gerkins V, Henderson BE. Vasectomy, cigarette smoking, and age at first sexual intercourse as risk factors for prostate cancer in middle-aged men. **Br J Cancer** 57:326-331, 1995.

Honda, G. D.; Bernstein, L.; Ross, R. K.; Greenland, S.; Gerkins, V.; Henderson, B. E. Vasectomy, cigarette smoking, and age at first sexual intercourse as risk factors for prostate cancer in middle-aged men. **Br J Cancer** 57:326-331, 1995.

Hong, W.; Zeng, J.; Xie, J. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. **Acta Pharm. Sin. B** 4, 258-265, 2014.

Hsu, C.; Liu, J.; Wu, P.; Guan, H.; Chen, Y.; Lin, A.; Ting, H.; Pang, S.; Yeh, S.; Ma, W.; Chen, C.; Wu, W. and Chang, C. Identification of a new androgen receptor (AR) co-regulator BUD31 and related peptides to suppress wild-type and mutated AR-mediated prostate cancer growth via peptide screening and X-ray structure analysis. **Mol.Oncol.** 8, 1575-1587, 2014.

Hyun Ryu, D.; Rando, R. R. Aminoglycoside binding to human and bacterial A-Site rRNA decoding region constructs. *Bioorg. Med.Chem.* 9, 2601-2608, 2001.

Igney, F. H.; Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer.** 2:277–88, 2002.

Ikäheimo, I.; Syrjälä, H.; Karhukorpi, J.; Schildt, R.; Koskela, M. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. **J Antimicrob Chemother.** 46(2):287-90, 2000.

Inada, Y.; Orita, H. Efficiency of numerical basis sets for predicting the binding energies of hydrogen bonded complexes: Evidence of small basis set superposition error compared to Gaussian basis sets. **J. Comput. Chem.** 29, 225-232, 2008.

Instituto Nacional de Câncer. Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso. - Rio de Janeiro: INCA, 2002.

Islami F, Moreira DM, Boffetta P et al. A systematic review and meta-analysis of tobacco use and prostate cancer mortality and incidence in prospective cohort studies. **Eur Urol.** 66: 1054-64, 2014.

Jin, X.; Zhang, J. Z. H.; He, X. Full QM calculation of RNA energy using electrostatically embedded generalized molecular fractionation with conjugate caps method. **J. Phys. Chem. A** 121, 2503-2514, 2017.

Johannes, J. W.; Bates, S.; Beigie, C.; Belmonte, M. A.; Breen, J.; Cao, S.; Hird, A. W. Structure based Design of non-Natural Peptidic Macrocyclic mcl-1 inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters** 8, 239–244, 2017.

John, E. M.; Whittemore, A. J.; Wu, A. H.; et al. Vasectomy and prostate cancer: results from a multiethnic case-control study. **J Natl Cancer Inst** 87:662-669, 1995.

Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. **BJU Intl.** 91: 789-94, 2003.

Kachur, E. Prostate Cancer Review. **US Pharm.** 43(8)HS-7-HS-12, 2018.

Kaduk, B.; Kowalczyk, T.; Voorhis, T. Van. Constrained density functional theory. **Chemical reviews**, v. 112, n. 1, p. 321–70, 2012.

Kang S. J.; Wang, S.; Kuida, K.; Yuan, J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. **Cell Death Differ.** 9:1115–25, 2002.

Keller, E. T.; Ershler W. B.; Chang C. The androgen receptor: a mediator of diverse responses. **Front. Biosci** 1:d59, 1996.

Kerr, J. F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**. 181–182:471–4, 2002.

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. 26:239–57, 1972.

Kitada, S.; et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. **Blood**, 91, 3379–3389, 1998.

Kitano, H. Standards for modeling. **Nature Biotechnol**. 20, 337, 2002.

Kohn, W.; Sham, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, 1965.

Kotra, L. P.; Haddad, J.; Mobashery, S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrob Agents Chemother**. 44(12):3249-56, 2000.

Kotschy, A., et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. **Nature** 538: 477-482, 2016.

Kotschy, A.; Szlavik, Z.; Murray, J.; Davidson, J.; Maragno, A. L.; Le Toumelin-Braizat, G.; Geneste, O. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. **Nature** 538, 477–482, 2016.

Kozopas, K. M.; Yang, T.; Buchan, H. L.; Zhou, P.; Craig, R. W. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 90, 3516–3520, 1993.

Krause, K. M.; Serio, A. W.; Kane, T. R.; Connolly, L. E. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 6(6): a027029, 2016.

Leach, A. R. Molecular Modeling: Principles and Applications. 2. ed., **Pretince Hall**, 2001.

Lee, T.; et al. Discovery of Potent Myeloid Cell Leukemia-1 (Mcl-1) Inhibitors That Demonstrate in Vivo Activity in Mouse Xenograft Models of Human Cancer. **J.Med.Chem**. 62: 3971-3988, 2019.

Li, L.; Li, C.; Zhang, Z.; Alexov, E. On the dielectric "constant" of proteins: Smooth dielectric function for macromolecular modeling and its implementation in DelPhi. **J. Chem. Theory Comput.** 9, 2126-2136, 2013.

Li, Y.; Shen, J.; Sun, X.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. Accuracy assessment of protein-based docking programs against RNA targets. **J.Chem. Inf. Model.** 50, 1134-1146, 2010.

Liao, S.; Howell, D. K.; Chang, T. Action of a Nonsteroidal Antiandrogen, Flutamide, on the Receptor Binding and Nuclear Retention of 5 α Dihydrotestosterone in Rat Ventral Prostate. **Endocrinology.** 94,1–10 | 9 1205-1209, 1974.

Lima Costa, A. H.; Clemente Jr, W. S.; Bezerra, K. S.; Lima Neto, J. X.; Albuquerque E. L. and Fulco, U. L. Computational biochemical investigation of the binding energy interactions between an estrogen receptor and its agonists. *New J. Chem.* 42, 19801-19810, 2018.

Lima Neto, J. X.; Bezerra, K. S.; Manso, D. N.; Mota, K. B.; Oliveira, J. I. N.; Albuquerque, E. L.; Caetano, E. W. S.; Freire, V. N.; Fulco, U. L. Energetic description of cilengitide bound to integrin. **New J. Chem.** 41, 11405-11412, 2017.

Lima Neto, J. X.; Fulco, U. L.; Albuquerque, E. L.; Corso, G.; Bezerra, E. M.; Caetano, E. W. S.; da Costa, R. F.; Freire, V. N. A quantum biochemistry investigation of willardiine partial agonism in AMPA receptors. **Phys. Chem. Chem. Phys.** 17, 13092-13103, 2015.

Lima Neto, J. X.; Soares-Rachetti, V. P.; Albuquerque, E. L.; Manzoni, V.; Fulco, U. L. Outlining migrainous through dihydroergotamine-serotonin receptor interactions using quantum biochemistry. **New J. Chem.** 42, 2401-2412, 2018.

Lumbroso, S.; Lobaccaro, J. M.; Georget, V.; Leger, J.; Poujol, N.; Térouanne, B.; Evain-Brion, D.; Czernichow, P.; Sultan, C. A novel substitution (Leu707Arg) in exon 4 of the androgen receptor gene causes complete androgen resistance. **J.Clin. Endocrinol. Metab.** 5, 1984-1988, 1996.

M. J. Frisch et al, Gaussian 09, Gaussian Inc., **Wallingford CT**, 2009.

March N. H.; Matthai, C. C. The application of quantum chemistry and condensed matter theory in studying amino-acids, protein folding and anticancer drug technology. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 125, n. 3-6, p. 193–201, 2009.

Markus, A. L.; Fabienne, W.; Angelo, V.; Beat, E. Impact of Induced Fit on Ligand Binding to the Androgen Receptor: A Multidimensional QSAR Study To Predict Endocrine-Disrupting Effects of Environmental Chemicals. **J. Med. Chem.** 48, 5666-5674, 2005.

Marshall, B. M.; Levy, S.B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clin Microbiol Rev.** 24(4):718–733, 2011.

Martinhalet, D.; Zhu, P.; Lieberman, J. Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. **Immunity.** 22:355–70, 2005.

Massard C. and Fizazi K. Targeting Continued Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer. **Clin. Cancer. Res.** 17, 3876-3883, 2011.

McGaha, S.M.; Champney, W.S. hygromycin B inhibition of protein synthesis and ribosome biogenesis in Escherichia coli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 51 (2), pp. 591-596, 2007.

Merriel, S. W. D; Funston G. and Hamilton, W. Prostate Cancer in Primary Care. **Adv Ther.;** 35(9): 1285–1294, 2018.

Michels, J.; Johnson, P. W. M.; Packham, G. Mcl-1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37, 267–271, 2005.

Michos, F. I.; Sgouros, A.P.; Sigalas, M.M. Ab initio study of boron and aluminum hydrides nanoparticles. **Int. J. of Hydrogen Energy.** 41, 20210-20216, 2016.

Moazed, D.; Noller, H. F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. **Nature.** 4-10;327(6121):389-94, 1984.

Momany, F. A.; and Rone, R. Validation of the general purpose QUANTA@3.2/CHARMm@ force field. **J. Comput. Chem.** 13, 888-900, 1992.

Mota, K. B.; Lima Neto, J. X.; Lima Costa, A. H.; Oliveira, J. I. N.; Bezerra, K. S.; Albuquerque, E. L.; Caetano, E. W. S.; Freire, V. N.; Fulco, U. L. A quantum biochemistry model of the interaction between the estrogen receptor and the two antagonists used in breast cancer treatment. **Comput. Theor. Chem.** 1089, 21-27, 2016.

Nadal, M.; Prekovic, S.; Gallastegui, N.; Helsen, C.; Abella, M.; Zielinska, K.; Gay, M.; Vilaseca, M.; Taulès, M.; Houtsmuller, A. B.; van Royen, M. E.; Claessens, F.;

Fuentes-Prior, P and Estébanez-Perpiñá, E. Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain. **Nat. Commun.** **8**, 1-14, 2017.

Nathan, C. Antibiotics at the crossroads. **Nature.** 431(7011):899–902, 2004.

Nogray, T.; Weaver, D. F. Medicinal chemistry: A molecular and biochemical approach. **Oxford University Press: Oxford, U.K.**, 2005.

Opferman, J. T.; et al. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. **Nature**, 426, 671–676, 2003.

Ortmann, F.; Bechstedt, F.; Schmidt, W. G. Semiempirical van der Waals correction to the density functional description of solids and molecular structures. **Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.** 73, 205101, 2006.

Ourique, G. S.; Vianna, J. F.; Lima Neto, J. X.; Oliveira, J. I. N.; P. M. Mauriz, Vasconcelos, M. S.; Caetano, E. W. S.; Freire, V. N.; Albuquerque E. L.; and Fulco, U. L. Quantum binding energy features of the T3-785 collagen-like triple-helical peptide. **RSC Adv.** 6, 56562-56570, 2016.

Ozers, M. S.; Marks, B. D.; K. Gowda, K. R. Kupcho, K. M. Ervin, T. De Rosier, N. Qadir, H. C. Eliason, S. M. Riddle and M. S. Shekhani. The Androgen Receptor T877A Mutant Recruits LXXLL and FXXLF Peptides Differently than Wild-Type Androgen Receptor in a Time-Resolved Fluorescence Resonance **Energy Transfer Assay. Biochemistry.** 46, 683-695, 2007.

Perdew, J. P.; Wang, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. **Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.** 45, 13244, 1992.

Pfister, P.; Risch, M.; Brodersen, D. E.; Böttger, E. C. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1496-1502, 2003.

Pyle, A. M.; Schlick, T. Challenges in RNA structural modeling and design. **J. Mol. Biol.** 428, 733-735, 2016.

Raghavachari, K.; Saha, A. Accurate composite and fragmentbased quantum chemical models for large molecules. **Chem. Rev.** 115, 5643-5677, 2015.

Ristuccia, A. M.; Cunha, B. A. An overview of amikacin. **Ther Drug Monit.** 7(1):12-25, 1985.

Roberts A. W.; et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 30: 488–96, 2012.

Roche, V.F.; Lemke, T. L.; Williams, D. A.; Zito, S.W. Cancer and Chemotherapy. **In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6th ed. Filadélfia: WoltersKluwer, Lippincott Williams & Wilkins.** cap. 42. p. 1147-1192, 2008.

Rosales-Hernandez. Molecular modeling applied to anti-cancer drug development. **Anticancer Agents Med Chem.** 9(2):230-8. 2009.

Russo, E. Chemistry plans a structural over haul. **Nature Jobs**, v. 419, n. 6903, p. 4-7, 2002.

Sanderson, J. T. Disruptors of Androgen Action and Synthesis, in: Endocrine Disruption and Human Health , **Academic Press**, 75-90, 2015.

Santamaria, R.; et al. Molecular electrostatic potentials and Mulliken charge populations of DNA mini-sequences. **Chemical Physics**, v. 227, n. 3, p. 317-329, 1998.

Sergiev, P. V.; Aleksashin, N. A.; Chugunova, A. A.; Polikanov, Y. S.; Dontsova, O. A. Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat. Chem. Biol.* 14, 226-235, 2018.

Shang, Y.; Myers, M.; Brown, M. Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. **Mol. Cell** 9:601, 2002.

Shaw, S., et al. Optimization of Potent and Selective Tricyclic Indole Diazepinone Myeloid Cell Leukemia-1 Inhibitors Using Structure-Based Design. **J. Med. Chem.** 61: 2410-2421, 2018.

Sherrill, C. D. Frontiers in electronic structure theory. **The Journal of chemical physics**, v. 132, n. 11, p. 110902, doi: 10.1063/1.3369628, 2010.

Shi, X. B.; Ma, A. H.; Xia, L.; Kung, H. J.; de Vere White, R. W. Functional analysis of 44 mutant androgen receptors from human prostate cancer. **Cancer Res.** 62, 1496–1502, 2002

Silvestrelli, P. L. van der Waals interactions in density functional theory using Wannier functions. **J. Phys. Chem. A** 113, 5224-5234, 2019.

Singer, A. C.; Shaw, H.; Rhodes, V.; Hart A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. **Front Microbiol.** 7:1728, 2016.

Singh SM, Gauthier S, Labrie F. Androgen Receptor Antagonists (Antiandrogens) Structure-Activity Relationships. **Curr. Med. Chem** 7:211, 2000.

Singh, A.; Bastian, T. S.; Ceena D. E.; Varghese, V. I.; Apoptosis - A Review. *Oral & Maxillofacial Pathol.* **J.** 1(2); 2010.

Slagsvold, T.; Kraus, I.; Bentzen, T.; Palvimo, J.; Saatcioglu, F. Mutational Analysis of the Androgen Receptor AF-2 (Activation Function 2) Core Domain Reveals Functional and Mechanistic Differences of Conserved Residues Compared with Other Nuclear Receptors. **Mol. Endocrinol.** 14, 1603-1617, 2000.

Sly, L. M.; et al. Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. **Journal of Immunology**, 170, 430–437, 2003.

Søndergaard, C. R.; Olsson, M. H.; Rostkowski, M. and Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pK_a Values. **J. Chem. Theory Comput.** 7, 2284-2295, 2011.

Spangler, E. A.; Blackburn, E. H. The nucleotide sequence of the 17S ribosomal RNA gene of *Tetrahymena thermophila* and the identification of point mutations resulting in resistance to the antibiotics paromomycin and hygromycin. **J. Biol. Chem.** 260, 6334-6340, 1985.

Stefaniak, F.; Chudyk, E. I.; Bodkin, M.; Dawson, W. K.; Bujnicki, J. M. Modeling of ribonucleic acid-ligand interactions. **WIREs Comput. Mol. Sci.** 5, 425-439, 2015.

Stokes, J. M.; Brown, E. D. Chemical modulators of ribosome biogenesis as biological probes. **Nat. Chem. Biol.** 11, 924-932, 2015.

Sun, H. COMPASS: An ab initio force-field optimized for condensed-phase applications - Overview with details on alkane and benzene compounds. **J. Phys. Chem. B** 102, 7338, 1998.

Tai, K.; Fowler, P.; Mokrab, Y.; Stansfeld, P.; Sansom, M.S.P. Molecular Modeling and Simulation Studies of Ion Channel Structures, Dynamics and Mechanisms. In: Methods in nano cell biology. **Academic Press**, v.90, cap. 12, p. 247, 2008.

Taplin, M. E.; Balk, S. P. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. **Journal of Cellular Biochemistry** 91 483–490, 2004.

Taplin, M. E.; Bubley, G. J.; Shuster, T. D.; Frantz, M. E.; Spooner, A. E.; Ogata, G. K.; Keer, H. N.; and Balk, S. P. Mutation of the Androgen-Receptor Gene Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. **Cancer Res.** 21, 1393-1398, 1995.

Tavares, A. B. M. L. A.; Lima Neto, J. X.; Fulco, U. L.; Albuquerque, E. L. Inhibition of the checkpoint protein PD-1 by the therapeutic antibody pembrolizumab outlined by quantum chemistry. **Sci. Rep.** 8, 1840, 2018.

Thin, T. H.; Wang, L.; Kim, E.; Collins, L. L.; Basavappa, R. and Chang, C. Isolation and Characterization of Androgen Receptor Mutant, AR(M749L), with Hypersensitivity to 17- β Estradiol Treatment. **J. Biol. Chem.** 278, 7699-7708, 2003.

Tor, Y. Targeting RNA with small molecules. **ChemBioChem** 4, 998-1007, 2003.

Tron, A. E.; Belmonte, M. A.; Adam, A.; Aquila, B. M.; Boise, L. H.; Chiarparin, E.; Hird, A. W. Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. **Nature Communications** 9, 5341, 2018.

Tron, A. E.; et al. iscovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. **Nat Commun** 9: 5341-5341, 2018.

Urushibara, M.; Ishioka, J.; Hyochi, N.; Kihara, K.; Hara, S.; Singh, P.; Isaacs, J. T.; Kageyama, Y. Effects of steroidal and non-steroidal antiandrogens on wild-type and mutant androgen receptors. **The Prostate.** 67, 799-807, 2007.

van Boeckel T.P.; Brower, C.; Gilbert, M.; et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 112(18):5649–5654, 2015.

van de Wijngaart, D. J.; Molier, M.; Lusher, S. J.; Hersmus, R.; Jenster, G.; Trapman, J. and Dubbink, H. J. Systematic structure-function analysis of androgen receptor

Leu701 mutants explains the properties of the prostate cancer mutant L701H. **J. Biol. Chem.** **285**, 5097-105, 2010.

Vaux, D. L.; Cory, S.; Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature** **335**, 440–442, 1988.

Veldscholte, J.; Berrevoets, C. A.; Ris-Stalpers, C.; Kuiper, G. G.; Jenster, G.; Trapman, J.; Brinkmann, A. O.; Mulder, E. **Steroid, J.** The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. **Biochem. Mol. Biol.** **41**, 665-669, 1992.

Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **Pharmacy and therapeutics** **40(4)**: 277–283, 2015.

Viana, R. B. Reactivity, vibrational spectroscopy, internal rotation and thermochemical aspects of methylarsine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.****171**, 383-394, 2016.

Vicatos, S.; Roca, M.; Warshel, A. Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants. **Proteins: Struct. Funct. Genet.** **77**, 670-684, 2009.

Vicens, Q.; Westhof, E. Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: An analysis of x-ray crystal structures. **Biopolymers** **70**, 42-57, 2003.

Wang, H.; Tor, Y. Electrostatic interactions in RNA aminoglycosides binding. **J. Am. Chem. Soc.** **119**, 8734-8735, 1997.

Wang, Q.; Li, W.; Zhang, Y.; Yuan, X.; Xu, K.; Yu, J.; Chen, Z.; Beroukhim, R.; Wang, H.; Lupien, M.; et al. Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. **Cell** **138** 245–256, 2009.

Wang, X.; Li, X.; Shi, W.; Wei, S.; Giesy, J. P.; Yu, H.; Wang, Y. Docking and CoMSIA studies on steroids and non-steroidal chemicals as androgen receptor ligands. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **89**, 143–149, 2013.

Wang, X.; Liu, J.; Zhang, J. Z. H.; He, X. Electrostatically Embedded Generalized Molecular Fractionation with Conjugate Caps Method for Full Quantum Mechanical Calculation of Protein Energy. **J. Phys. Chem. A** **117**, 7149-7161, 2013.

Warren, C. F. A.; Wong-Brown, M.W.; Bowden, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. **Cell Death & Disease** v. 10, 177, 2019.

Watanabe, S.; Matsumura, K.; Iwai, H.; Funatogawa, K.; Haishima, Y.; Fukui, C.; Okumura, K.; Kato-Miyazawa, M.; Hashimoto, M.; Teramoto, K.; et al. A mutation in the 16S rRNA decoding region attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** **84**, 2264-2273, 2016.

World Cancer Research Fund International. Continuous Update Project Report: Diet, Nutrition, **Physical Activity and Prostate Cancer**. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Geneva, 2014.

Yang, G.; Trylska, J.; Tor, Y.; McCammon, J. A. Binding of aminoglycosidic antibiotics to the oligonucleotide A-site model and 30S ribosomal subunit: Poisson-Boltzmann model, thermal denaturation, and fluorescence studies. **J. Med. Chem.** **49**, 5478-5490, 2006.

Yang, T.; et al. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to those of Bcl-2. **Journal of Cell Biology**, **128**, 1173–1184, 1995.

Zaman, S.B.; Hussain, M. A.; Nye, R.; Mehta, V.; Mamun, K. T.; Hossain, N. A. Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**. **9(6)**: e1403, 2017.

Zanatta, G.; Barroso-Neto, I. L.; Bambini-Junior, V.; Dutra, M. F.; Bezerra, E. M.; da Costa, R. F.; Caetano, E. W. S.; Cavada, B. S.; Freire, V. N.; Gottfried, C. Quantum biochemistry description of the human dopamine D3 receptor in complex with the selective antagonist eticlopride. **J. Proteomics Bioinf.** **5**, 155-162, 2012.

Zhang, D. W. and Zhang, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein–molecule interaction energy. **J. Chem. Phys.** 119, 3599-3605, 2013.

ZHANG, Dawei. Quantum mechanical calculation of nanomaterial-ligand interaction energies by molecular fractionation with conjugated caps method. **Scientific Reports**, [s.l.],v.7, n.1, p.1-16, 2017.

Zhou, J.; Liu, B.; Geng, G. and Wu, J. H. Study of the impact of the T877A mutation on ligand-induced helix-12 positioning of the androgen receptor resulted in design and synthesis of novel antiandrogens. **Proteins: Struct. Funct. Bioinf.** 78, 623-637, 2010.

ANEXO I



Cite this: RSC Adv., 2017, 7, 2817

Quantum binding energy features of the T3-785 collagen-like triple-helical peptide†‡

Katyanna S. Bezerra,^a Jonas I. N. Oliveira,^a Jose X. Lima Neto,^aEudenilson L. Albuquerque,^a Ewerton W. S. Caetano,^b Valder N. Freire^c and Umberto L. Fulco*^a

Collagen-based biomaterials are expected to become a useful matrix substance for various biomedical applications in the future. By taking advantage of the crystallographic data of the triple-helical peptide T3-785, a collagen-like peptide whose homotrimeric structure presents large conformational similarity to the human type III collagen, we present a quantum biochemistry study to unveil its detailed binding energy features, taking into account the inter-chain interaction energies of 90 amino acid residues distributed into three interlaced monomers. Our theoretical model is based on the density functional theory (DFT) formalism within the molecular fragmentation with conjugate caps (MFCC) approach. We predict the individual relevance (energetically) of the amino acid triplets Pro–Hyp–Gly, Ile–Thr–Gly, Ala–Arg–Gly and Leu–Gly–Ala, as well as the influence of the N-terminal, central and C-terminal regions, looking for the integrity of the collagen's triple helix. We found that the amino acid residues comprising the peptide T3-785 have an interaction energy that depends not only on the chemical nature of the side chain, but also the surrounding solvent molecules and inter-chain intermolecular interactions. The energy profile of this collagen-model molecule depicts a character essentially attractive to its conformational stability, encouraging research focusing on the development and synthesis of artificial collagen with high stability for bioengineering applications.

Received 13th October 2016
Accepted 10th December 2016

DOI: 10.1039/c6ra25206k

www.rsc.org/advances



Biomaterial science is an expanding area, which encompasses a wide range of medical knowledge. Collagen, a well-known protein, is regarded as one of the most useful biomaterial in the medical, dental and pharmacological elds. Biomedical applications of collagen require improved methods to synthesize its triple helices feature, essential for the development of artificial structures displaying its natural properties. Its excellent biocompatibility and safety due to its biological characteristics, made it the primary resource in medical applications. Besides, it is the most abundant family of extracellular matrix proteins expressed in connective tissues of animals.¹ Human beings have at least 45 distinct collagen genes accounting for 28 protein isoforms, amounting about one quarter of the total protein mass of the human body.²

A single collagen molecule is a structural insoluble brillar protein used to set up larger collagen aggregates that performs unique physiological functions in bones, skin, cartilage, ligaments and tendons.³ Also, there has been increasing appreciation of the biological importance of collagen in many cellular process, such as adhesion, proliferation and migration, matrix degradation/remodeling, tissue regeneration and homeostasis.^{4,5} Furthermore, due to a number of biological properties such as high biocompatibility, rare adverse reactions and weak antigenicity,⁶ collagens have been widely used as a natural material for diverse biomedical applications, including its clinical use as biomimetic scaffold and drug delivery system.⁷ Therefore, the understanding of how these properties are derived from its fundamental structural units requires a comprehensive knowledge of the mechanisms underlying its structure and stability.⁸

Seven types of collagen (I, II, III, V, XI, XXIV and XXVII) are assembled in stable brils, forming a complex three-dimensional brous superstructure.⁹ They are composed of individual helices of three polypeptide chains/strands twisted in a right-handed manner and held together by a ladder of intermolecular backbone hydrogen bonds between adjacent strands.¹⁰ Each chain shows one or more collagenous domain characterized by a repetition of Xaa–Yaa–Gly motif (or triplet), where Xaa and Yaa are o en proline and hydroxyproline residues, respectively. Variations among the collagen family

^aDepartamento de Biofísica e Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970, Natal, RN, Brazil. E-mail: umberto.fulco@gmail.com; Fax: +55-84-32153791; Tel: +55-84-32153793

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceara, 60040-531, Fortaleza, CE, Brazil

^cDepartamento de Física, Universidade Federal do Ceara, 60455-760, Fortaleza, CE, Brazil

† This document is a collaborative effort of all authors.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra25206k



Cite this: *New J. Chem.*,
2018, 42, 17115

Received 15th August 2018,
Accepted 14th September 2018

DOI: 10.1039/c8nj04175j

rsc.li/njc

Computational investigation of the $\alpha_2\beta_1$ integrin–collagen triple helix complex interaction†

K. S. Bezerra^a, J. X. Lima Neto,^b J. I. N. Oliveira,^a E. L. Albuquerque,^b
E. W. S. Caetano,^b V. N. Freire^c and U. L. Fulco^{a*}

The greatest difficulty for the development of drugs targeting the $\alpha_2\beta_1$ integrin, a transmembrane receptor that facilitates cell–extracellular matrix (ECM) adhesion, is the current understanding of its interaction with ligands, such as the collagen molecule – one of the most complex cell adhesion systems. In this sense, this work performs a quantum biochemistry analysis of the interaction between the $\alpha_2\beta_1$ I-domain integrin and a collagen structure containing the GFOGER (Glycine–Phenylalanine–Hydroxyproline–Glycine–Glutamate–Arginine) sequence. Our study was carried out by using the Molecular Fractional with Conjugate Caps (MFCC) method within Density Functional Theory (DFT) with generalized gradient approximations (GGA), and Grimme's long-range dispersion correction. Our results confirm the importance of the amino-acids residues Thr221, Asp219, Asp254 and Glu256 (Arg12, Glu33, Arg34, Glu55 and Arg56) present in the MIDAS – Metal Ion Dependent Adhesion Site – region (GFOGER motif) of the integrin–collagen interaction. Besides, we depicted the relevance of each strand (A, B and C chains) in the triple-helical collagen structure, helping the understanding of the events involving the interaction integrin–collagen.

Introduction

The control of cellular interactions in multicellular organisms is fundamental for many biological processes, such as embryo–genesis, immune responses, tissue integrity and homeostasis, to cite just a few.¹ Several interactions occurring among cell–cell and cell–matrix components are performed by integrating specific ligands with cell adhesion receptors. Among them, the most known are the members of the family of integrins,² type I heterodimeric transmembrane glycoproteins, which function as the major metazoan receptor for cell adhesion and transmission of bidirectional signals. They play a central role in physical support functions for signal transduction, actin cytoskeleton assembly, gene expression and cell functions, including cell adhesion, migration proliferation, differentiation, and apoptosis.³

Integrins are composed of two subunits, namely α (containing B750 residues) and β (with B1000 residues), not covalently associated, jointly forming twenty-four distinct heterodimeric

structures with different binding and distribution properties in various tissues.⁴ These subunits show a large extracellular domain folded into N-terminal globular portions, which are combined to create the ligand binding surface. This globular portion is followed by a type I transmembrane domain, a single-stranded structure of about 25–29 amino-acids residues forming a coiled α -helix, and by a short C-terminal cytoplasmic tail region (10–70 amino-acids) which binds to cytoskeletal elements through cytoplasmic adapter proteins.^{5,6} They can also bind to a number of proteins of the extracellular matrix (ECM), being found in the surface of other cells during different physiological contexts, making them a target for therapies against a large number of diseases, such as thrombosis, infection, immune system disorders, osteoporosis and cancer.

Among their heterodimeric structures, the $\alpha_2\beta_1$ integrin, a collagen receptor, has been involved in platelet adhesion, epithelial differentiation, morphogenesis, cancer, wound healing, angiogenesis, inflammation and immunity.⁷ In vitro studies have shown that the deletion of the α_2 structure causes a reduction in platelet response, blocking the binding to type I collagen, as well as the destabilization of thrombus formation. Patients either with reduced levels of $\alpha_2\beta_1$ integrin expression on platelets, or with the presence of auto-antibodies, had platelet activation impaired by collagen but not by other molecules.⁸ Studies related to metastasis in tumor cells have revealed that the overexpression of the $\alpha_2\beta_1$ integrin may be related to the acceleration of metastasis in

^a Departamento de Biofísica e Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970, Natal-RN, Brazil. E-mail: umbertofulco@gmail.com; Fax: +55-84-32153791; Tel: +55-84-32153793

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 60040-531, Fortaleza-CE, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, 60455-760, Fortaleza-CE, Brazil

† This document is a collaborative effort of all authors.

Ribosomal RNA—Aminoglycoside Hygromycin B Interaction Energy Calculation within a Density Functional Theory Framework

Katyanna S. Bezerra,[†] Umberto L. Fulco,^{*†} Stephany C. Esmail,[†] José X. Lima Neto,[†] Leonardo D. Machado,[‡] Valder N. Freire,[§] Eudenilson L. Albuquerque,[†] and Jonas I. N. Oliveira[†]

[†]Departamento de Biofísica e Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970 Natal-RN, Brazil

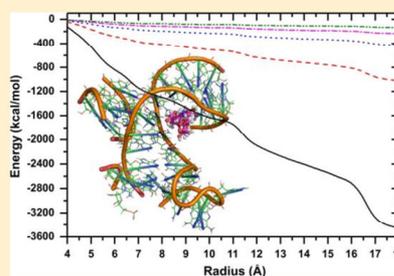
[‡]Departamento de Física Teórica e Experimental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 59072-970 Natal-RN, Brazil

[§]Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza-CE, Brazil

★ Supporting Information

ABSTRACT: We intend to investigate the drug-binding energy of each nucleotide inside the aminoglycoside hygromycin B (hygB) binding site of 30S ribosomal RNA (rRNA) subunit by using the molecular fractionation with conjugate caps (MFCC) strategy based on the density functional theory (DFT), considering the functional LDA/PWC, OBS, and the dielectric constant parametrization. Aminoglycosides are bactericidal antibiotics that have high affinity to the prokaryotic rRNA, inhibiting the synthesis of proteins by acting on the main stages of the translation mechanism, whereas binding to rRNA 16S, a component of the 30S ribosomal subunit in prokaryotes. The identification of the nucleotides presenting the most negative binding energies allows us to stabilize hygB in a suitable binding pocket of the 30S ribosomal subunit. In addition, it should be highlighted that mutations in these residues may

probably lead to resistance to ribosome-targeting antibiotics. Quantum calculations of aminoglycoside hygromycin B—ribosome complex might contribute to further quantum studies with antibiotics like macrolides and other aminoglycosides.



INTRODUCTION

Ribonucleic acid (RNA) is a dynamic and diverse biomolecule that plays an ever-expanding and pivotal role in cell biology. For decades RNA was considered a passive carrier of DNA sequence information, but remarkable findings in recent years have led to the recognition of its key role in many aspects of cellular physiology, including gene regulation, protein synthesis, enzymatic reactions, and viral infection.¹

Nowadays, RNAs have shown a broad spectrum as a tool for health assistance, including diagnosis and prognosis of diseases, besides being useful in therapeutic selection strategies.² In addition, RNAs have been seen as potentially interesting targets in the field of drug's discovery and design, particularly in the therapy of infectious diseases, cancer, and genetic diseases.^{3–5} This is because RNAs present two major advantages when compared to other biomolecules, namely, (1) their upstream position at the gene-expression pathway, which means that the synthesis of multiple proteins can be blocked through inhibition of a single RNA molecule and (2) their diversified three-dimensional structure, which supports the design and manipulation of a molecule with a level of simplicity characteristic of the DNA, while displaying flexibility in structure and diversity in function close to that of proteins.⁶

In spite of the growing knowledge regarding the regulatory functions of RNA molecules, continuing challenges hinder the

information, with insights presently coming mostly from primary sequence analysis.⁷ In addition, druggable RNA targets remain largely unexplored,⁸ as RNA specific studies are required due to its unique physicochemical properties, which include unusual flexibility, highly negative charge, and large flat binding pockets. Currently, the best defined RNA drug target is the rRNA (rRNA), a fundamental part of the ribosome.

Ribosomes are among the most conserved and sophisticated molecular machines of the cell and are the central components of the protein-synthesis apparatus. It is composed of two subunits, a small one named 30S (bacterial cell) and 40S (eukaryotic cell), and a large subunit, the 50S (bacterial) and 60S (eukaryotic) cells, respectively, that join together to form the complete ribosome particle (70S in bacteria and 80S in eukaryotes).⁹ While the smaller subunit plays the role of decoding genetic information from messenger RNA (mRNA), the larger one is covalently bound to the amino acids carried by transfer RNA (tRNA) into a nascent protein. In the course of the protein synthesis process, mRNA and tRNAs move through the ribosome by the dynamic process of translocation. The continuous movement of tRNAs from the aminoacyl site

design of new drugs. One example is the lack of structural