



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Esterol C24-metiltransferases dos fungos patogênicos
humanos *Candida auris* e *Aspergillus fumigatus*: estudos
estruturais, funcionais e de inibição visando o
desenvolvimento de potenciais fármacos**

Doutoranda: Gideane Mendes de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Brasília - DF
Março, 2024



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Gideane Mendes de Oliveira

**Esterol C24-metiltransferases dos fungos patogênicos
humanos *Candida auris* e *Aspergillus fumigatus*: estudos
estruturais, funcionais e de inibição visando o
desenvolvimento de potenciais fármacos**

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular da Universidade
de Brasília como parte integrante dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Biologia Molecular.

Brasília - DF
Março, 2024

Tese do Doutorado apresentada por Gideane Mendes de Oliveira, documento requerido para obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biofísica Molecular, sendo intitulado por “Esterol C24-metiltransferases dos fungos patogênicos humanos *Candida auris* e *Aspergillus fumigatus*: estudos estruturais, funcionais e de inibição visando o desenvolvimento de potenciais fármacos”, sob orientação do Professor Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Laboratório de Biofísica Molecular
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília
Membro Interno e Presidente da Banca

Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger

Laboratório de Enzimologia
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília
Membro Interno

Prof. Dr. Artur Torres Cordeiro

Laboratório Nacional de Biociências
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
Membro Externo

Prof. Dr. Sandro Roberto Marana

Instituto de Química
Universidade de São Paulo
Membro Externo

Profa. Dra. Larissa Fernandes Matos

Laboratório de Imunologia Aplicada
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília
Membro Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe, minha rainha, meu maior exemplo de dedicação,
resiliência e perseverança.

Obrigada por todo amor, paciência e por acreditar juntamente comigo que
Deus é a fonte de toda a sabedoria, que o conhecimento transforma e que a
essência deste é a humildade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela sua misericórdia, pelo cuidado, pela proteção em todos os momentos, por me dar saúde, por me dar forças e sabedoria para continuar a minha tão sonhada carreira acadêmica e por colocar pessoas certas em meu caminho durante esta jornada.

Ao meu orientador Prof. João Alexandre, eu expresso a minha imensa gratidão pela excelente orientação durante a iniciação científica, mestrado e doutorado. São mais de 10 anos! É impossível descrever aqui o tanto que eu aprendi com o Sr., onde compartilhar os conhecimentos de biofísica molecular foi uma parte. Contigo eu aprendi muito sobre comportamento, resiliência, disciplina, persistência e dedicação. Obrigada pelo profissionalismo, pelo respeito, pelo incentivo à pesquisa, pelas palavras de apoio e pela compreensão quando eu estive passando por situações difíceis. Obrigada pela enorme paciência em passar horas conversando comigo quando eu estava agoniada ou brava, eu sempre ficava mais leve. Obrigada pelo cuidado, sempre perguntando sobre a saúde, sobre a família etc., me orientando a fazer exercícios físicos. Sou muito grata pela parceria e companheirismo durante toda a minha carreira acadêmica!

Agradeço imensamente aos meus pais, Maria do Socorro e Cícero, e aos meus irmãos Gedalias, Gezequias, Gideale, Sara e ao meu cunhado Guilherme pelo companheirismo, total apoio, preocupação e presença em todos os momentos. Vocês foram meu alicerce para eu conseguir seguir com êxito os meus objetivos. Amo vocês! Obrigada por acreditar em mim, por me fazer companhia no laboratório durante os finais de semana, feriado e até de madrugada. Durante a pandemia de Covid-19, vocês sempre davam um jeito de ficar comigo no laboratório também durante a semana para eu não ficar sozinha. Obrigada por encher caixinhas de ponteiros, lavar a geladeira da copa comigo, saibam que vocês foram meus alunos de IC durante a pandemia. Obrigada pela paciência de me ouvir falar de ciência, pela compreensão quando eu precisei me ausentar diversas vezes para fazer experimentos, escrever dissertação, tese e artigos.

Agradeço ao professor Aisel por compartilhar comigo com bastante entusiasmo os conhecimentos de bioquímica e biofísica. Eu aprendi muuuuuito contigo. Pensa em um pesquisador de excelência e humilde! Obrigada pela disponibilidade de me ensinar

aos longos desses muitos anos. Obrigada pelo carinho, pela paciência, pela disponibilidade, por “entrar no barco” comigo na realização de diversos experimentos. Sentíamos falta quando você ia para Cuba visitar a família, eu sempre perguntava “*Cadê o Aiseeeel?*”. Obrigada por tudo!

Agradeço a professora Sônia pela parceria e pela contribuição com conhecimentos, sugestões e auxílio em experimentos ao longo desses anos, sendo para mim um exemplo de professora e pesquisadora respeitada e de excelência.

Agradeço ao Prof. Napoleão pela colaboração em diversos experimentos, pelas conversas aleatórias e polêmicas. Obrigada por ser o professor da galera, onde a gente se sentia bem à vontade para trocar umas ideias “diferenciadas” e mesmo com opiniões divergentes havia muito respeito e aprendizado.

Agradeço a Dr^a. Renata pela excelente colaboração no meu trabalho. Rê, eu falo para todo mundo sobre o tanto que eu gosto de trabalhar contigo. Eu lembro da gente no laboratório durante a pandemia ambas com o olhar assustado, mas estávamos firmes e fortes. Obrigada por me acalmar quando eu estava ansiosa. Obrigada pelas trocas de conhecimento, por estar sempre disponível para discutir comigo os resultados dos experimentos, algumas vezes até abrindo o computador e conversando comigo de dentro do metrô nos Estados Unidos. Valeu por tudo e espero que o nosso trabalho conjunto perdure por muito tempo!

A minha imensa gratidão a minha amiga Julia. Ju não vai ter espaço suficiente para te agradecer, mas quero dizer que eu tenho muita sorte de ter a sua amizade que se iniciou por interesse mútuo em pesquisa durante a iniciação científica. Obrigada por ser meu porto seguro quando eu preciso conversar, por estar sempre torcendo por mim, por puxar minha orelha para eu cuidar da minha saúde e para eu ser menos *workaholic*, por ser uma das primeiras pessoas que quero ligar quando eu não estou bem ou quando quero contar uma novidade legal. Somos beem diferentes, mas nossa amizade é baseada em muito respeito e companheirismo.

Agradeço aos meus amigos Bau, Kel e Marysol pelas nossas viagens divertidas, reencontros, conversas e por me entenderem quando eu me ausento.

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório de Biofísica Molecular. Wallace, obrigada pelas várias horas de papos, pela companhia nos rolês aleatórios, por compartilhar comigo o cardápio vegano e o normal do RU. Agradeço a Ana e o Daniel (filhos científicos) pela companhia e paciência em aprender comigo sobre a biofísica

e bioquímica mesmo eu falando gideanês. Obrigada Luana (aluna de IC) por aceitar embarcar comigo na reta final do meu doutorado, seu apoio foi essencial. Agradeço a Claudia, Amanda, Patrícia, Izadora, Isabela, Lavínia, Jônatas, Liem, Diogo, Faheem, Matheus, Paulo, Gustavo, João Paulo, Dona Alzira e Azadeh (*in memoriam*) pelas ideias, apoio, paciência, caronas, café, piadas e companhia nas longas horas de trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada, em especial a Prof^a Larissa e a Prof^a Maria Sueli, pelo apoio e incentivo à pesquisa com os fungos patogênicos. Ao pessoal do Laboratório de Imunologia e Inflamação, do Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, do Laboratório de Enzimologia, do Laboratório de Baculovírus e Departamento de Ciências Fisiológicas por estarem sempre de portas abertas para me apoiar caso eu precisasse utilizar algum equipamento ou reagentes. Obrigada pela solicitude de todos!

Aos membros da banca, Prof^a. Dr^a. Larissa Fernandes Matos, Prof. Dr. Artur Torres Cordeiro, Prof. Dr. Sandro Roberto Marana e Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger pela disponibilidade e pelas preciosas sugestões objetivando aprimorar este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular por compartilharem os seus conhecimentos e por colaborarem para a minha formação.

Ao Departamento de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde, em especial aos meus antigos coordenadores (Sidney e Luiz), pelo apoio na fase final da minha tese, compreendendo quando eu pedia uns dias de folga para concluir a escrita e até para participar de reuniões na UnB. A Larissa “Nepuceno” e ao Sr. Jônatas que foram meu braço direito nas fases difíceis e desafiadoras. Aos outros colegas de trabalho que me receberam de braços abertos, que foram parceiros, que me colocavam para cima, que puxavam a minha orelha para eu ir almoçar na hora certa, e que foram a minha segunda família por mais de um ano onde passamos por muito sufoco, pressão, desespero e lógico que nos divertimos e rimos sempre que possível.

Agradeço a Dr^a. Adelaide, a Sinaida e a Lígia que compõem juntamente comigo a área técnica de micoses endêmicas e oportunistas da Coordenação Geral de Vigilância da Tuberculose, Micoses Endêmicas e Micobactérias não Tuberculosas do DATHI/SVSA/MS. Nos conhecemos quando trabalhávamos em conjunto mesmo estando em secretarias diferentes e vimos que temos interesses em comum, as infecções fúngicas. Foram diversas conversas nos quais compartilhamos experiências

com o trabalho, com a pesquisa e que resultaram na minha recém entrada na coordenação. Si, Dê e Lígia obrigada pela amizade e por ter paciência comigo pois sou ligada nos 220V, tenho muito a aprender com vocês. Aos demais colegas da CGMT, obrigada pelo apoio, pelo cuidado, pelo carinho e seguimos trabalhando em conjunto pelo fortalecimento do SUS.

A Universidade de Brasília, ao CNPq, a CAPES e a FAP-DF pelo apoio financeiro.

A estes e a tantos outros o meu muito obrigada.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.
(Isaac Newton)

RESUMO

Todos os anos, ocorrem mais de 1,5 milhão de mortes no mundo decorrentes de infecções fúngicas invasivas. *Candida auris* vem ganhando relevância mundial no cenário das infecções invasivas nosocomiais. O surgimento de resistência secundária aos azóis em cepas de *Aspergillus fumigatus* tem causado preocupação global. O ergosterol é um lipídio essencial para a viabilidade celular, sendo responsável pela fluidez e permeabilidade da membrana. O gene *erg6* codifica uma esteroil 24-C-metiltransferase (SMT), que atua transferindo o grupo metil para o C-24 do zimosterol ou, alternativamente, para o lanosterol. A CauSMT (*C. auris*) e a AfSMT (*A. fumigatus*) foram produzidas, purificadas e caracterizadas, incluindo a determinação da preferência pelos respectivos substratos. Em solução, a CauSMT parece ser pentamérica, e a AfSMT, tetramérica. As constantes de afinidade mostram que ambas as enzimas têm mais afinidade pelo substrato S-adenosil-metionina (SAM) do que pelos esteróis. A eficiência catalítica da CauSMT é menor do que a das outras SMTs, e a tomatidina foi identificada como um inibidor. A estrutura secundária de AfSMT e CauSMT, estimada por dicroísmo circular, é compatível com os percentuais calculados a partir dos modelos tridimensionais preditos. Os dados de estabilidade térmica demonstraram que a CauSMT e a AfSMT são mais estáveis em pH ácido e neutro, respectivamente. Dados de docking molecular mostraram um sítio para cada substrato. Análises estruturais e de alinhamento de sequências mostram a conservação de resíduos importantes no sítio ativo de ambas as enzimas. Cristais de CauSMT e AfSMT com o substrato SAM foram obtidos em diversas condições de cristalização. Os dados de difração coletados na linha de luz Manacá LNLS/Sirius com os cristais de CauSMT co-cristalizados com o substrato SAM apresentaram resoluções de 7 a 8 Å.

Palavras-chave: esteroil C24-metiltransferases, biossíntese do ergosterol, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus*, inibidor da síntese do ergosterol

ABSTRACT

Every year, there are more than 1.5 million deaths worldwide due to invasive fungal infections. *Candida auris* is becoming a leading cause of nosocomial invasive infections. The emergence of secondary resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* strains has raised worldwide concern. Ergosterol is an essential lipid for cell viability, as it plays a crucial role in membrane fluidity and permeability. The *erg6* gene encodes a sterol 24-C-methyltransferase (SMT), which transfers a methyl group to the C-24 of zymosterol or, alternatively, to lanosterol. CauSMT (*C. auris*) and AfSMT (*A. fumigatus*) were produced, purified, and characterized, including the determination of their substrate preferences. In solution, CauSMT appears to be pentameric, while AfSMT is tetrameric. The affinity constants indicate that both enzymes have higher affinity for the substrate S-adenosyl-methionine (SAM) than for sterols. The catalytic efficiency of CauSMT is lower than that of other SMTs. Tomatidine has been identified as an inhibitor of CauSMT, serving as a proof-of-concept for its potential use in drug screening studies and applications against invasive infections caused by multidrug-resistant *C. auris*. The secondary structure of AfSMT and CauSMT, estimated by circular dichroism, corresponds to the percentages calculated from the predicted three-dimensional models. Thermal stability data demonstrated that CauSMT and AfSMT are more stable at acidic and neutral pH, respectively. Molecular docking data revealed a binding site for each substrate. Sequence and structural alignment analysis shows the conservation of important residues in the active site of both enzymes. Crystals of CauSMT and AfSMT with the SAM substrate were obtained under various crystallization conditions. Diffraction data collected at the Manacá LNLS/Sirius beamline with CauSMT crystals co-crystallized with the SAM substrate showed resolutions of 7 to 8 Å.

Keywords: sterol C24-methyltransferases, ergosterol biosynthesis, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus*, ergosterol synthesis inhibitor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de países com casos reportados de infecções causadas por *C. auris*.

A) Número de países pertencentes a cada continente que reportou casos de infecção ou colonização por *C. auris*. **B)** Países com casos reportados entre jan/09 e jun/20. Adaptado de (Du *et al.*, 2020). 25

Figura 2: Espectro da aspergilose. Esse diagrama sumariza as diversas patologias causadas pelo *Aspergillus spp.* Aspergilose Broncopulmonar (ABPA). Aspergilose Pulmonar Crônica (CPA) e a Aspergilose Invasiva (IA). Adaptado de (Bongomin *et al.*, 2017; Palmieri *et al.*, 2022). 28

Figura 3: Mecanismos de ação dos antifúngicos utilizados para o tratamento das infecções invasivas e suas estruturas. A) Os azóis inibem a enzima lanosterol demetilase participante da via de biossíntese de ergosterol. B) Os polienos atuam interagindo com o ergosterol formando poros na membrana fúngica. C) As equinocandinas são inibidores não competitivos da (1,3)- β -D-glucana sintase. D) A flucitosina atua como um potente antimetabólito que causa a inibição da síntese de DNA e de proteínas. Adaptado de (Robbins, Wright e Cowen, 2016). 31

Figura 4: Resumo dos principais mecanismos de resistência em *Candida sp.* **A)** Interação eficiente dos azóis (vermelho) a enzima lanosterol C-14 demetilase (erg11); e interação eficiente das equinocandinas (bege) a enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, incluindo as três subunidades Fks1, Fks2 e Fks3, e a subunidade regulatória Rho1. **B)** Redução da interação dos azóis devido a mudanças conformacionais da enzima lanosterol C-14 demetilase. **C)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na produção da lanosterol C-14 demetilase. **D)** Redução da eficácia dos azóis devido a não ativação da produção dos azóis tóxicos. **E e F)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na atividade das bombas de efluxo. **G)** Redução da eficácia dos azóis devido a absorção de esteróis exógenos. **H)** Mudanças conformacionais nas subunidades da (1,3)- β -D-glucana sintase reduzindo a interação com as equinocandinas. Adaptado de (Beardsley *et al.*, 2018). 33

Figura 5: Resumo dos principais mecanismos de resistência em *Aspergillus sp.* **A)** Ligação eficiente dos azóis (vermelho) a enzima lanosterol C-14 demetilase (erg11); e ligação eficiente das equinocandinas (bege) a enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, incluindo as três subunidades Fks1, Fks2 e Fks3, e a subunidade regulatória Rho1. **B)** Ligação redução dos azóis devido a mudanças conformacionais da enzima lanosterol C-14 demetilase. **C)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na produção da lanosterol C-14 demetilase. **D)** Redução da eficácia dos azóis devido a não ativação da

produção dos azóis tóxicos. E) Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na atividade das bombas de efluxo. Adaptado de (Beardsley <i>et al.</i> , 2018).....	34
Figura 6: Mapa mostrando os diversos países (em verde) onde vários isolados de <i>A. fumigatus</i> resistentes aos azóis foram identificados em ambientes hospitalares e no meio ambiente. Fonte: (Wiederhold, 2023).	35
Figura 7: Via simplificada de biossíntese de esterol nos eucariotas. Adaptado de (Dupont <i>et al.</i> , 2012).....	36
Figura 8: Via de biossíntese do ergosterol em <i>S. cerevisiae</i>. *Cinza: via alternativa utilizada por alguns fungos. As enzimas participantes e os genes que as codificam estão descritos. SMT: esterol C-24 metiltransferase. X: via não compartilhada com os fungos. Caixa azul: via de biossíntese do mevalonato. Caixa verde: via de biossíntese do farnesil-PP: Caixa marrom: via de biossíntese do ergosterol. Adaptado de (Alcazar-Fuoli <i>et al.</i> , 2008; Chiu <i>et al.</i> , 2019; Liu <i>et al.</i> , 2019).....	37
Figura 9: Mecanismo de ação da enzima esterol C-24 metiltransferase de <i>S. cerevisiae</i>. (A) Nu: núcleo. B ⁻ direita: contribui para a reação de transferência do grupamento metila servindo como um agente desprotonante. B ⁻ esquerda: auxilia no ancoramento do zimosterol ao complexo enzima substrato por meio de interações de hidrogênio; Si-face: face de trás. (B) Reação de C-metilação enfatizando o intermediário. Adaptado de (Nes, 2000; Zhou <i>et al.</i> , 2004).	39
Figura 10. Ensaio de metiltransferase MTase-Glo™, Promega Corporation (Madison, WI, USA).	46
Figura 11. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio LB. 1: Marcador de massa molecular. 2: Perfil de PT antes da indução. 3: Perfil de PT após a indução. A: AfSMT em BL21 (DE3). B: AfSMT em BL21 (DE3) PlysS. C: AfSMT em BL21 (DE3) pLysE. D: AfSMT em Lemo21 (DE3). E: AfSMT em pGro (DE3). F: CauSMT em BL21 (DE3). G: CauSMT em BL21 (DE3) PlysS. H: CauSMT em BL21 (DE3) pLysE. I: CauSMT em Lemo21 (DE3). J: CauSMT em pGro (DE3).	56
Figura 12. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio LB. 1: Marcador de massa molecular. 2: Perfil de PT antes da indução. 3: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 4: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). A: AfSMT em pGro (DE3). B: AfSMT em BL21 (DE3). C: AfSMT em Lemo21 (DE3). D: AfSMT em BL21 (DE3) PlysS. E: CauSMT em pGro (DE3). F: CauSMT em BL21 (DE3). G: CauSMT em Lemo21 (DE3). H: CauSMT em BL21 (DE3) PlysS.	57

Figura 13. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio ZYM-5052. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **(A) I:** CauSMT em BL21 (DE3), colônia 1, 2 e 3. **II:** AfSMT em BL21 (DE3), colônia 1. **(B) II:** AfSMT em BL21 (DE3), colônia 2. **I:** CauSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônia 1. **II:** AfSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônias 1 e 2..... 58

Figura 14. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir da inoculação das células de *E.coli* transformadas em meio MDG e a produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio ZYM-5052. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **(A)** AfSMT em BL21 (DE3), colônias 1, 2 e 3. **(B)** AfSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônias 1, 2 e 3. **(C)** CauSMT em BL21 (DE3), colônias 1, 2 e 3. **(D)** CauSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônia 1, 2 e 3..... 59

Figura 15. Purificação da CauSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais do processo de purificação da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5,6 e 7:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. ... 60

Figura 16. Purificação da AfSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais do processo de purificação da AfSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5 e 6:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. 61

Figura 17. Purificação da CauSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5 e 6:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. **7 e 8:** Frações contendo a CauSMT purificada. 62

Figura 18. Purificação da AfSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o

perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da AfSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 3: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). 4: <i>Flow through</i> . 5 e 6: Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. 7 e 8: Frações contendo a AfSMT purificada.....	62
Figura 19. Imunodeteção das proteínas (Western Blot) usando anticorpo anti-His-tag. 1: Marcador de massa molecular. 2: CauSMT. 3: AfSMT.....	63
Figura 20. Purificação de CauSMT por SEC. A) Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da CauSMT pós purificação. B) Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.....	64
Figura 21. Purificação de AfSMT por SEC. A) Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da AfSMT pós purificação. B) Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.	64
Figura 22. Purificação da CauSMT. A) Perfil cromatográfico da purificação na coluna de troca iônica. B) Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas obtidas durante o processo de purificação da CauSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: <i>Flow through</i> . 3 e 4: Frações eluídas durante o gradiente de NaCl.	65
Figura 23. Purificação da AfSMT. A) Perfil cromatográfico da purificação na coluna de troca iônica. B) Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas obtidas durante o processo de purificação da AfSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: <i>Flow through</i> . 3 e 4: Frações eluídas durante o gradiente de NaCl.	65
Figura 24. Purificação da CauSMT na presença de inibidores de proteases. A) Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. B) Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da CauSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 3: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). 4: <i>Flow through</i> . 5 e 6: Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. 7, 8, 9 e 10: Frações contendo a CauSMT purificada.	66
Figura 25. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil proteico da CauSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: Amostra de CauSMT após o processo de ultracentrifugação utilizando membrana com <i>cut-off</i> de 10 kDa. 3: Amostra de CauSMT após o processo de ultracentrifugação utilizando membrana com <i>cut-off</i> de 100 kDa.	67
Figura 26. Purificação da CauSMT. A) Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. B) Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da CauSMT. 1: Marcador	

de massa molecular. 2: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 3: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). 4: <i>Flow through</i> . 5: Fração eluída durante o gradiente de imidazol. 6: Fração contendo a CauSMT purificada.	69
Figura 27. Purificação da AfSMT. A) Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. B) Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da AfSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 3: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). 4: <i>Flow through</i> . 5: Fração eluída durante o gradiente de imidazol. 6: Fração contendo a AfSMT purificada.	70
Figura 28. Purificação de CauSMT por SEC. A: Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da CauSMT pós purificação. (B) Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido....	71
Figura 29. Purificação de AfSMT por SEC. A: Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da AfSMT pós purificação. (B) Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.	72
Figura 30. Identificação dos substratos esteróis utilizados pelas esterol C24-metiltransferases CauSMT (A) e AfSMT (B)	72
Figura 31: Reação de C-metilação catalisada pela CauSMT onde o zimosterol é o substrato acceptor formando o fecosterol.....	73
Figura 32: Reação de C-metilação catalisada pela AfSMT onde o lanosterol é o substrato acceptor formando o eburicol.....	73
Figura 33: Via alternativa de síntese do lanosterol para o fecosterol. (A) Via de síntese em <i>S.cerevisiae</i> . (B) Via de síntese em <i>A. fumigatus</i> (Alcazar-Fuoli <i>et al.</i> , 2008; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2013).	74
Figura 34. Efeito da concentração da CauSMT e AfSMT na reação enzimática. (A) Correlação linear entre a concentração enzimática de CauSMT em nM e a unidade relativa de luminescência. (B) Correlação linear entre a concentração enzimática de AfSMT em nM e a unidade relativa de luminescência.....	75
Figura 35. Determinação das constantes de afinidade de CauSMT e AfSMT pelos seus substratos. (A) Curva de constante de afinidade da CauSMT mostrando efeito da concentração do substrato zimosterol (2,5 μ M a 160 μ M). (B) Curva de constante de afinidade da CauSMT mostrando efeito da concentração do substrato SAM (0,31 a 160 μ M). (C) Curva de constante de afinidade da AfSMT mostrando efeito da concentração	

do substrato lanosterol (20 μ M a 640 μ M). (D) Curva de constante de afinidade da AfSMT mostrando efeito da concentração do substrato SAM (0,31 μ M a 160 μ M).	76
Figura 36. Curva de Michaelis-Menten mostrando efeito da concentração do substrato zimosterol (5 μ M a 320 μ M) sobre a velocidade da atividade da esterol C24-metiltransferases CauSMT.....	77
Figura 37. Determinação de IC ₅₀ da tomatidina (0,32 μ M a 41,66 μ M) na atividade enzimática das esterol C24-metiltransferases CauSMT (A) e AfSMT (B)	78
Figura 38: Comparação entre as estruturas dos substratos de SMT: lanosterol e zimosterol com o inibidor tomatidina.	79
Figura 39: Efeito do pH nas estruturas secundárias por dicroísmo circular. A) CauSMT, B) AfSMT	80
Figura 40. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da CauSMT avaliados por dicroísmo circular. Espectros dicroicos da CauSMT coletados entre 25 a 90 °C em pH (A) 5,6 (B) 7,6 e (C) 9,6.	82
Figura 41. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da AfSMT avaliados por dicroísmo circular. Espectros dicroicos da AfSMT coletados entre 25 a 90 °C em pH (A) 5,6 (B) 7,6 e (C) 9,6.	83
Figura 42. Efeito da temperatura na estabilidade estrutural da CauSMT e AfSMT. (A) Curvas de desnaturação térmica da CauSMT monitoradas em 222 nm para os pH 5,6, 7,6 e 9,6 com temperaturas variando entre 25 a 90 °C. (B) Curvas de desnaturação térmica da AfSMT monitoradas em 222 nm para os pH 5,6, 7,6 e 9,6 com temperaturas variando entre 25 a 90 °C	84
Figura 43: Matriz de identidade de sequência de aminoácidos mostrando o percentual de identidade (%) entre as SMTs dos fungos, de planta e de protozoário. As SMTs representadas são de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc), <i>Candida auris</i> (Cau), <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af), <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) e <i>Trypanosoma brucei</i> (Tb).....	85
Figura 44: Estruturas tridimensionais de CauSMT (A) e AfSMT (B) preditas pelo AlphaFold. As folhas β , hélices α e os loops, estão em magenta, azul e rosa, respectivamente.....	86
Figura 45: Estrutura tetramérica da AfSMT predita pelo AlphaFold-multimer. A) As subunidades estão em verde, azul, amarelo e rosa. B) Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos, onde em azul estão os hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos. O círculo destaca o core hidrofóbico.	86
Figura 46: Estrutura pentamérica da CauSMT predita pelo AlphaFold-multimer. A) As subunidades estão em verde, azul, amarelo, rosa e magenta. B) Superfície molecular	

conforme a hidrofobicidade dos resíduos, onde em azul estão os hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos. O círculo destaca o core hidrofóbico.	87
Figura 47: Análise estrutural das interações dos substratos zimosterol e SAM com CauSMT. A) Sítios de ligação do zimosterol (azul) e do SAM (verde). B) Os resíduos conservados envolvidos na catálise enzimática estão mostrados em azul (região I e III) e verde (região II). C) Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos mostrado abertura de entrada dos substratos. D) Alinhamento múltiplo de SMTs de <i>Candida auris</i> (Cau), <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af), <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc) e <i>Cryptococcus neoformans</i> (Cn). Os resíduos marcados com * estão a 4Å dos substratos em CauSMT e foram experimentalmente observados serem importantes para a atividade enzimática em ScSMT. As setas indicam as folhas-β e as espirais as α-hélices.	89
Figura 48: Análise estrutural das interações dos substratos lanosterol e SAM com AfSMT. A) Sítios de ligação do lanosterol (roxo) e do SAM (verde). B) Os resíduos conservados envolvidos na catálise enzimática estão mostrados em roxo (região I e III) e verde (região II). C) Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos mostrado abertura de entrada dos substratos. D) Alinhamento múltiplo de SMTs de <i>Candida auris</i> (Cau), <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af), <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sc) e <i>Cryptococcus neoformans</i> (Cn). Os resíduos marcados com * estão a 4Å dos substratos em AfSMT e foram experimentalmente observados serem importantes para a atividade enzimática em ScSMT. As setas indicam as folhas-β e as espirais as α-hélices.	90
Figura 49: Sobreposição dos sítios de ligação do inibidor tomatidina (magenta) e do zimosterol (rosa).	92
Figura 50. Cristais de CauSMT-SAM e CauSMT-zimosterol obtidos sob as condições de cristalização 1, 2, 3 e 4 (Tabela 12) do kit JCSG Plus (Molecular Dimensions).	93
Figura 51. Cristais de CauSMT-SAM obtidos na etapa de refinamento nas condições 1 e 2 descritas na tabela 11.	94
Figura 52. Cristais de CauSMT, CauSMT-SAM, AfSMT e AfSMT-SAM por <i>microbatch</i> nas condições descritas na tabela 12.	95
Figura 53. Cristais de AfSMT e AfSMT-SAM obtidos sob as condições de cristalização 1 a 6 (Tabela 13).	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio de cultura mínimo MDG (Studier, 2005).....	45
Tabela 2. Composição do meio de cultura auto-indutor ZYM-5052 (Studier, 2005).	45
Tabela 3. Diferentes condições testadas de CauSMT pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.	44
Tabela 4. Condições experimentais da CauSMT e AfSMT em diferentes pHs para análise de dicroísmo circular.	50
Tabela 5. Concentrações de CauSMT, AfSMT e SAM utilizadas na etapa de triagem das condições de cristalização.	53
Tabela 6. Concentrações de CauSMT, AfSMT, SAM e zimosterol utilizadas no ensaio de <i>microbatch</i>	54
Tabela 7. Concentrações de AfSMT e SAM utilizadas na etapa de triagem das condições de cristalização.	54
Tabela 8. Massa molecular estimada em kDa de CauSMT obtida por ensaios de DLS. Condição 1: Variação da concentração da proteína (1.1: 1,4 mg/mL, 1.2: 0,7 mg/mL, 1.3: 0,35 mg/mL e 1.4: 0,08 mg/mL). Condição 2: Concentração de glicerol (2.1: Glicerol 10% e 2.2: Glicerol 20%). Condição 3: Concentração de CHAPS (3.1: Glicerol 20% + CHAPS 1% e 3.2: Glicerol 20% + CHAPS 4%) e Condição 4: Concentração de Triton X-100 (4.1: 0,5%) e Condição 5: 5.1: 0,05%, 5.2: 0,1%, 5.3: 0,3% e 5.4: 0,5%.	68
Tabela 9. Percentual de estruturas secundárias da CauSMT. Efeito dos pHs 5,6, 7,6 e 9,6 a 25°C nas estruturas secundárias comparado à estrutura predita pelo AlphaFold.	81
Tabela 10: Percentual de estruturas secundárias da AfSMT. Efeito dos pHs 5,6, 7,6 e 9,6 a 25°C nas estruturas secundárias comparado à estrutura predita pelo AlphaFold.	82
Tabela 11. Temperatura de transição (T_m) da CauSMT e AfSMT em diferentes pHs.	84
Tabela 12. Condições de cristalização da CauSMT na etapa de <i>screening</i> utilizando o kit JCSG Plus (Molecular Dimensions).	92
Tabela 13. Condições de cristalização da CauSMT na etapa de refinamento da condição fosfato de amônio dibásico 1M, acetato de sódio 0,1M pH 4,5.	93
Tabela 14. Condições de cristalização e cocrystalização da CauSMT, CauSMT-SAM, AfSMT e AfSMT-SAM por <i>microbatch</i>	94
Tabela 15. Condições de cristalização da CauSMT na etapa de <i>screening</i> utilizando o kit JCSG Plus (Molecular Dimensions).	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	<i>Candida auris</i>.....	23
1.1.1	Taxonomia.....	23
1.1.2	Manifestações clínicas.....	24
1.1.3	Epidemiologia	24
1.1.4	Virulência.....	26
1.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>.....	26
1.2.1	Taxonomia.....	26
1.2.2	Manifestações clínicas.....	26
1.2.3	Epidemiologia	27
1.2.4	Virulência.....	28
1.3	Mecanismos de ação dos antifúngicos	28
1.4	Mecanismos de resistência aos antifúngicos	31
1.5	Biossíntese do ergosterol.....	35
1.5.1	Esterol C-24 metiltransferase	37
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	METODOLOGIA	42
4.1	Transformação de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) com os plasmídeos de expressão	42
4.2	Transformação de células de <i>E. coli</i> por choque térmico	42
4.3	Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de <i>Escherichia coli</i>	43
4.4	Análise da expressão por SDS-PAGE.....	43
4.5	Teste de Solubilidade de CauSMT e da AfSMT	44
4.6	Otimização da produção de CauSMT e da AfSMT	44
4.7	Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de <i>Escherichia coli</i> e purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).....	45
4.8	Imunodeteção da CauSMT e da AfSMT por Western Blot	40
4.9	Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de exclusão molecular (SEC)	41

4.10	Otimização da purificação	42
4.10.1	Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de troca iônica (IEX).....	42
4.10.2	Purificação da CauSMT por IMAC na presença de inibidores de proteases ..	42
4.10.3	Purificação da CauSMT por IMAC na presença do agente redutor β - mercaptoetanol	42
4.10.4	Purificação da CauSMT por ultrafiltração.....	43
4.11	Análises de mudanças no estado oligomérico da CauSMT por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	43
4.12	Purificação da CauSMT e AfSMT por IMAC na presença de aditivo	44
4.13	Determinação do estado oligomérico da CauSMT e AfSMT por SEC	44
4.14	Determinação da concentração da CauSMT e da AfSMT por Bradford.....	45
4.15	Caracterização enzimática da CauSMT e da AfSMT	45
4.15.1	Descrição do ensaio enzimático de metiltransferase (MTase-Glo™)	45
4.15.2	Determinação da especificidade em relação aos substratos esteróis	46
4.15.3	Determinação da concentração de enzima ótima	46
4.15.4	Determinação da constante de afinidade pelos substratos	47
4.15.5	Determinação da curva-padrão de SAH	48
4.15.6	Determinação dos parâmetros cinéticos de CauSMT	48
4.15.7	Inibição da atividade enzimática de CauSMT e da AfSMT pela tomatidina ...	49
4.16	Caracterização estrutural da CauSMT e da AfSMT	49
4.16.1	Efeito do pH e temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural por dicroísmo circular	49
4.16.2	Análise de sequências e predição da estrutura tridimensional e dos oligômeros de CauSMT e AfSMT	51
4.16.3	Docking molecular de CauSMT e AfSMT com os substratos e inibidor	51
4.16.4	Cristalização da CauSMT e da AfSMT.....	52
4.16.5	Coleta de dados de difração de raios X	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de <i>Escherichia coli</i>.....	56
5.2	Teste de Solubilidade da CauSMT e da AfSMT	56
5.3	Otimização da produção da CauSMT e da AfSMT.....	57
5.4	Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de <i>Escherichia coli</i> e purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).....	60

5.5	Imunodeteccção da CauSMT e da AfSMT por Western Blot	63
5.6	Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de exclusão molecular (SEC) 63	
5.7	Otimização da purificação	64
5.7.1	Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de troca iônica (IEX)...	64
5.7.2	Purificação da CauSMT por IMAC na presença de inibidores de proteases	66
5.7.3	Purificação da CauSMT por ultrafiltração.....	67
5.8	Análises de mudanças no estado oligomérico da CauSMT por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	67
5.9	Purificação da CauSMT e da AfSMT por IMAC na presença de aditivo	69
5.10	Determinação do estado oligomérico da CauSMT e da AfSMT por SEC.....	70
5.11	Caracterização enzimática da CauSMT e da AfSMT	72
5.11.1	Determinação da especificidade em relação aos substratos esteróis	72
5.11.2	Determinação da concentração enzimática ótima.....	74
5.11.3	Determinação da constante de afinidade pelos substratos	75
5.11.4	Determinação dos parâmetros cinéticos de CauSMT	77
5.11.5	Inibição da atividade enzimática da CauSMT e da AfSMT pela tomatidina ...	78
5.12	Caracterização Estrutural da CauSMT e da AfSMT	80
5.12.1	Efeito do pH e da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da CauSMT e da AfSMT por dicroísmo circular	80
5.12.2	Análise da estrutura e identificação de potenciais sítios de interação de CauSMT e AfSMT com os substratos e inibidor	85
5.12.3	Cristalização da CauSMT e da AfSMT.....	92
5.12.4	Coleta de dados de difração de raios X	97
6	CONCLUSÕES.....	98
7	PERSPECTIVAS	100
8	REFERÊNCIAS	101
9	APÊNDICES	114
10	ANEXOS - Publicações	121
11	ANEXOS - Participação em Eventos Científicos, Premiações e Cursos	125

1 INTRODUÇÃO

Todos os anos, ocorrem mais de 1,5 milhão de mortes no mundo causadas por infecções fúngicas invasivas. Aproximadamente 80% dessas mortes são resultantes de infecções causadas por fungos oportunistas, principalmente pelas espécies de *Candida spp.* e *Aspergillus spp.*, que se destacam pela frequência de casos e relevância clínica (Biswas, 2021). As infecções fúngicas invasivas afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, nos quais o índice de mortalidade é elevado (Pfaller e Diekema, 2007).

A ameaça global emergente e pouco reconhecida para a saúde das infecções fúngicas invasivas é agravada pelo rápido surgimento de resistência antifúngica e, em muitos cenários, o acesso limitado a diagnósticos de qualidade e tratamento (Brown *et al.*, 2012). Diante disso, no final de 2022, a Organização Mundial da Saúde publicou a primeira lista de patógenos fúngicos prioritários para guiar a pesquisa, ações e desenvolvimento de saúde pública. O *Aspergillus fumigatus* e *Candida auris* estão dentre os quatros que compõe a lista de fungos patogênicos considerados como grupo crítico (World Health Organization, 2022).

1.1 *Candida auris*

1.1.1 *Taxonomia*

A *C. auris* é um fungo oportunista do filo Ascomycota que foi primeiramente descrito em 2009 a partir de isolados de pacientes no Japão e na Coreia (Satoh *et al.*, 2009).

Atualmente existem 5 principais clados de *C. auris* que se baseiam em informações genéticas e na localização dos primeiros isolados: o clado Sul Asiático (I), o clado Leste Asiático (II), o clado da África, clado da América do Sul (IV) e o clado do Iran (V) (Du *et al.*, 2020). Os isolados pertencentes ao clados I, III e o IV frequentemente causam infecções invasivas e surtos, enquanto que o clado II e o V normalmente estão envolvidos com otomicoses (Lockhart *et al.*, 2017; Ahmad e Alfouzan, 2021).

1.1.2 Manifestações clínicas

Os fatores de riscos predisponentes para as infecções por *C.auris* são semelhantes a outras espécies oportunistas de *Candida spp.* que são pacientes imunocomprometidos (diabetes, câncer, doenças renais crônicas, neutropenia, HIV, uso prolongado de antibióticos, antifúngicos ou corticoides, internações em decorrência de cirurgias, uso de catéteres e internações em UTIs) (Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018). As cepas de *C. auris* já foram isoladas de múltiplos locais de infecção em todo o corpo como da urina, feridas, narinas, axila, pele e reto (Du *et al.*, 2020). A infecção pode disseminar para locais normalmente estéreis (candidíase invasiva) que inclui a candidemia (sangue) (Du *et al.*, 2020; Soriano *et al.*, 2023).

1.1.3 Epidemiologia

As espécies de *Candida* são as causas predominantes de infecções fúngicas nosocomiais (infecções adquiridas nos hospitais). Anualmente são diagnosticados mais de 400.000 casos de infecções de corrente sanguínea causadas por *Candida spp.* com taxa de mortalidade maior que 40% (Brown *et al.*, 2012). O fungo oportunista *C. albicans* é o maior causador da candidemia e da candidíase invasiva; entretanto, mais de 50% de todas as infecções têm sido causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, e este espectro tem aumentado rapidamente em decorrência da redução crescente da susceptibilidade dessas espécies aos antifúngicos (Khan *et al.*, 2019; Ahmad e Alfouzan, 2021). Entre essas espécies, a *C. auris* tem despertado atenção nesses últimos anos em decorrência de estar se tornando o principal fungo causador de infecções invasivas e de surtos com altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles com diversas comorbidades e internados em UTIs (Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018; Du *et al.*, 2020; Ahmad e Alfouzan, 2021). Até o momento, a *C.auris* foi isolada em mais de 40 países abrangendo todos os continentes, com exceção da Antártica (Du *et al.*, 2020) (Figura 1).

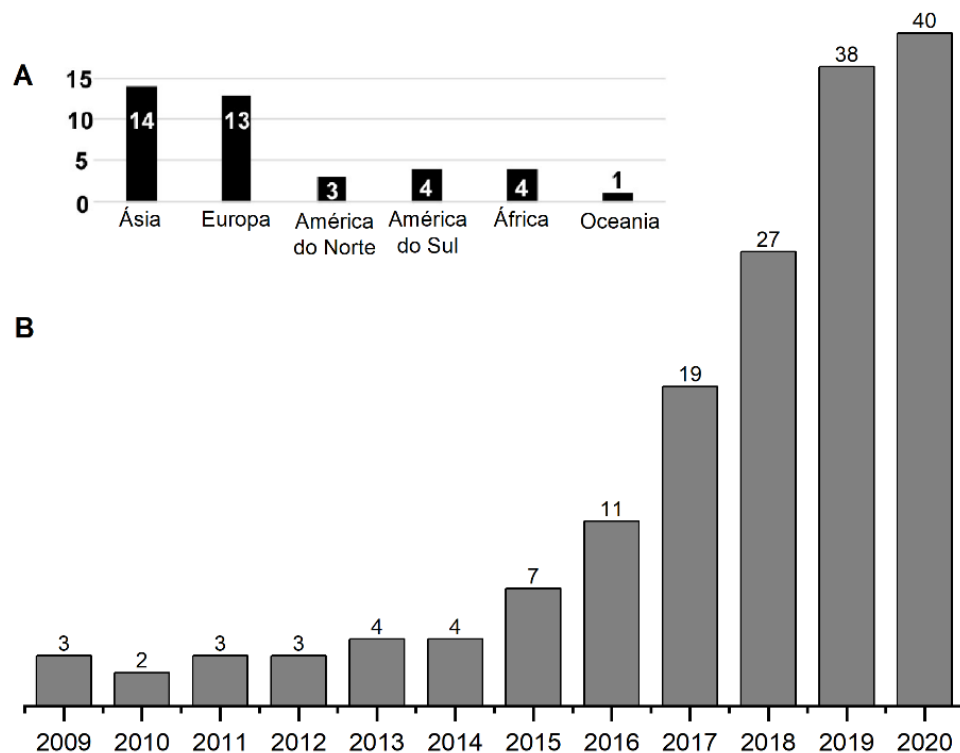


Figura 1: Número de países com casos reportados de infecções causadas por *C. auris*. A) Número de países pertencentes a cada continente que reportou casos de infecção ou colonização por *C. auris*. **B)** Países com casos reportados entre jan/09 e jun/20. Adaptado de (Du *et al.*, 2020).

No Brasil, os primeiros casos de *C. auris* foram reportados em 2020, correspondendo a um total de 15 casos, dentre eles de dois pacientes acometidos por COVID-19 hospitalizados em Salvador-BA (De Almeida *et al.*, 2021). Em 2021, ocorreu um caso isolado na Bahia. Em 2022, ocorreu o terceiro surto no qual foram identificados 47 casos em pacientes hospitalizados em Recife-PE (De Melo *et al.*, 2023). Novamente, em maio de 2023, um surto foi identificado sendo reportados 9 casos de infecções causadas por *C.auris* no Estados de Pernambuco e São Paulo (BRASIL, 2023).

Dentro de uma década desde a sua descoberta, mais de 4.000 isolados foram identificados em todos os continentes, entretanto este dado está subestimado em decorrência das dificuldades de identificação de *C.auris* (Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018; Du *et al.*, 2020; Ahmad e Alfouzan, 2021). A *C.auris* é geralmente identificada erroneamente como *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida sake*, *Rhodotorula glutinis* e até com outras espécies quando se utiliza os métodos fenotípicos e bioquímicos convencionais (Jeffery-Smith *et al.*, 2018). A

detecção precisa de *C. auris* é de alto custo, no qual se utiliza a espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) e os métodos moleculares baseados no sequenciamento da região D1-D2 do rDNA ou do espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA (Keighley *et al.*, 2021).

1.1.4 Virulência

Estudos recentes reportaram que a *C. auris*, similarmente a *C.albicans*, expressa diversos fatores de virulência conhecidos, incluindo a secreção de aspartil proteases e lipases que degradam os tecidos facilitando a invasão dos hospedeiros (Du *et al.*, 2020). Estudos comparativos indicaram que a *C.auris* é menos virulenta que a *C.albicans*, entretanto é mais virulenta que *C.glabrata* e *C.haemulonii*. A menor virulência de *C.auris* quando comparada a *C.albicans* está relacionada a incapacidade de formar hifas ou pseudohifas em mamíferos, fator importante na invasão dos tecidos durante as infecções (Yue *et al.*, 2018). Entretanto, alguns isolados de *C.auris* podem formar agregados, estes que permite o fungo escapar do sistema imune contribuindo para a resistência aos antifúngicos (Fakhim *et al.*, 2018). A *C. auris* também tem a habilidade de formar biofilmes o que possibilita a adesão nas superfícies promovendo a transmissão nosocomial (Ahmad e Alfouzan, 2021).

1.2 *Aspergillus fumigatus*

1.2.1 Taxonomia

O *A. fumigatus* é um fungo da família das Trichocomaceae descrito pela primeira vez por Fresenius em 1863, é conhecido por ter um genoma haplóide estável de 29,4 milhões de pares de bases. O ciclo de vida fora do hospedeiro humano é caracterizado pela reprodução assexuada da qual procedem os conidióforos, estruturas onde a forma infecciosa conhecida como conídios, são produzidos e liberados no ar. Os conídios são responsáveis pela dispersão do fungo e pela preservação do genoma do fungo em condições adversas (Shapiro, Robbins e Cowen, 2011).

1.2.2 Manifestações clínicas

O *A. fumigatus* pode afetar tanto os pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos. Os sintomas dependem da imunocompetência do paciente e

da quantidade de esporos inalados (Latgé, 1999). A aspergilose pode ser classificada em aspergilose broncopulmonar (ABPA), aspergilose pulmonar crônica (CPA) e a aspergilose invasiva (IA), sendo esta última a mais severa e letal (Bongomin *et al.*, 2017; Latgé e Chamilos, 2019). A ABPA é forma mais severa de aspergilose que pode afetar um paciente atópico ou um paciente com fibrose cística. A CPA engloba as formas inflamatórias crônicas da aspergilose, incluindo o aspergiloma e comumente afeta paciente com tuberculose ou outras doenças pulmonares cavitárias crônicas (Latgé e Chamilos, 2019). A IA é a forma mais severa de aspergilose que afeta paciente bastante imunocomprometidos como aqueles sob tratamentos com imunossupressores ou aqueles submetidos a cirurgias ou transplantes. Atualmente tem ocorrido mudança na incidência de casos de IA em paciente neutropênicos para os não neutropênicos, como aqueles acometidos por infecções virais como influenza e COVID-19 (Burks *et al.*, 2021) (Figura 2).

1.2.3 Epidemiologia

A maioria dos casos mundiais de aspergilose são causados por *A. fumigatus* (90%), seguido por *A. flavus*. A distribuição varia de acordo com a localização geográfica, por exemplo, *A. flavus* é isolado com menos frequência do que *A. fumigatus* nas regiões tropicais e subtropicais (Beardsley *et al.*, 2018). A ABPA tem afetado aproximadamente 5 milhões de pessoas anualmente. Em 2017, foi estimado cerca de 3 milhões de casos de CPA, mas o perfil epidemiológico dessa doença é pouco conhecido, então a incidência pode estar subestimada. Quanto a IA, tem se estimado 250.000 casos mundiais por ano, e a incidência dessa infecção está crescendo (Bongomin *et al.*, 2017; Latgé e Chamilos, 2019) (Figure 2). No Brasil, conforme a Base de Dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIHSUS) do Ministério da Saúde, em 2021 foram registradas 245 autorizações de internações por aspergilose, seguido de 300 em 2020 e de 379 em 2019.

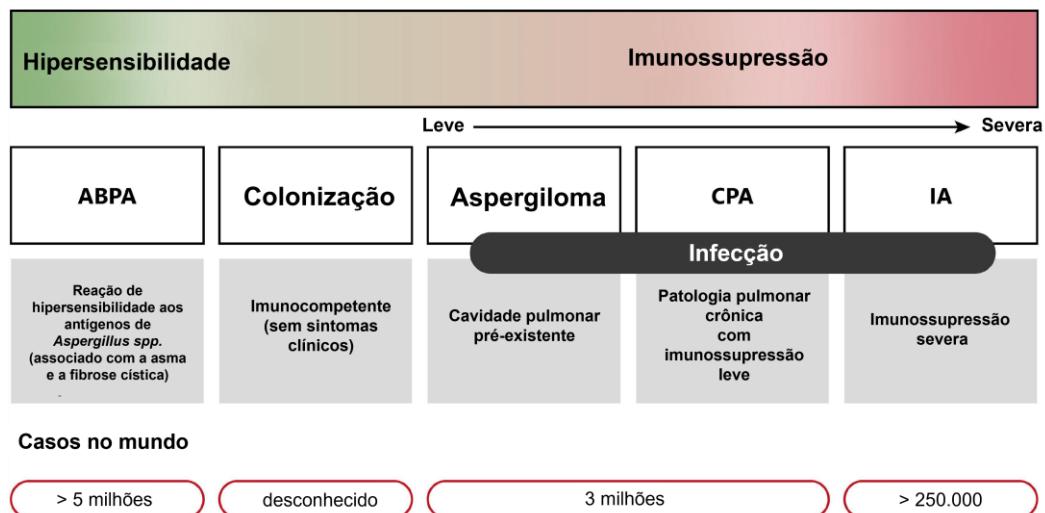


Figura 2: Espectro da aspergilose. Esse diagrama sumariza as diversas patologias causadas pelo *Aspergillus spp.* Aspergilose Broncopulmonar (ABPA). Aspergilose Pulmonar Crônica (CPA) e a Aspergilose Invasiva (IA). Adaptado de (Bongomin *et al.*, 2017; Palmieri *et al.*, 2022).

1.2.4 Virulência

Dentre os fatores de virulência associados ao *A. fumigatus* está a termotolerância e a alta capacidade de esporulação do fungo que podem atingir os alvéolos pulmonares (Bhabhra e Askew, 2005; Earle *et al.*, 2023). O *A. fumigatus* produz diversas enzimas como as α -amilase, proteases, fosfolipases, pectinases e lipases que atuam degradando os tecidos e facilitando a invasão no hospedeiro. Além disso, o fungo produz micotoxinas como as gliotoxina e hemolisina. A hemolisina é responsável pela lise das hemácias. A gliotoxina modifica a resposta imunitária e é capaz de induzir a apoptose nas células, podendo também atingir os neutrófilos e inibir a fagocitose (Raksha, Singh e Urhekar, 2017).

1.3 Mecanismos de ação dos antifúngicos

O tratamento de primeira linha para a aspergilose é baseado no uso de azóis (Brown *et al.*, 2012). Dentro os antifúngicos azólicos, quatro agentes triazólicos (voriconazol, itraconazol, isavuconazol e posaconazol) foram aprovados para uso clínico no tratamento e profilaxia da aspergilose (Lestrade *et al.*, 2019). A classe de segunda escolha são os polienos seguido das equinocandinas (Perfect, 2017).

A estratégia de tratamento da candidíase invasiva depende do estado imunológico do paciente, localização e gravidade da infecção (Pappas *et al.*, 2016). Atualmente, três classes principais de drogas antifúngicas com atividade contra

espécies de *Candida sp.* estão disponíveis. A primeira escolha são as equinocandinas, seguida dos azóis e por último dos polienos (Perfect, 2017; Bhattacharya, Sae-Tia e Fries, 2020).

Os polienos são antifúngicos anfipáticos, que interagem fortemente ao ergosterol formando poros transmembrana, que consequentemente causam vazamentos e perdas de íons intracelulares (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). Os poros transmembranares são formados em decorrência da estrutura anfipática característica dos polienos: a cadeia poliênica que representa a parte hidrofóbica da molécula interage com as moléculas de esterol da membrana, enquanto a parte hidrofílica, representada pela cadeia poliol fica no ambiente aquoso, formando um poro transmembranar (Cavassin *et al.*, 2021). Os polienos também induzem danos oxidativos nas células fúngicas por meio do acúmulo das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mesa-Arango, Scorzoni e Zaragoza, 2012).

Os antifúngicos da classe dos polienos incluem a anfotericina B e a nistatina, mas apenas a anfotericina B é utilizada para o tratamento de infecções invasivas. O ergosterol tem mais afinidade pela anfotericina B do que o colesterol, comumente encontrado na membrana das células animais. Tradicionalmente, a anfotericina B é administrada como a formulação de desoxicolato, mas o uso dessa apresentação tem dose limitada devido a toxicidade, principalmente por reações relacionadas a infusão e a nefrotoxicidade. Na tentativa de melhorar o índice terapêutico da anfotericina B, três formulações associadas a lipídios foram desenvolvidas, o complexo lipídico de anfotericina B, anfotericina B lipossomal e dispersão coloidal de anfotericina B, sendo este último descontinuado em 2011 devido a altas taxas de infusão. Assim, ambas apresentações de anfotericina B diferem em suas composições lipídicas, formas, farmacocinética, eficácia e toxicidade (Cavassin *et al.*, 2021) (Figura 3B).

As equinocandinas é única nova classe de antifúngicos, e atualmente, existem três medicamentos disponíveis para uso clínico: caspofungina, micafungina e anidulafungina (Shapiro, Robbins e Cowen, 2011). As equinocandinas são grandes moléculas de lipopeptídeos que agem como inibidores não competitivos da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, essa enzima é responsável pela síntese do polímero (1,3)- β -D-glucana, constituinte importante da parede celular, que se liga covalentemente ao outro polímero a (1,6)- β -D-glucana, e juntos com a quitina formam uma rede tridimensional complexa de microfibrilas. A inibição da enzima promove inibição de

biossíntese da parede celular, causando lise e prejuízo a integridade celular (Rocha *et al.*, 2021) (Figura 3C).

A classe das pirimidinas é composta pelo antifúngico flucitosina (5-FC) que atua diretamente nos fungos por inibição competitiva da captação de purina e pirimidina e indiretamente por metabolismo intracelular para 5-fluorouracil. A flucitosina entra na célula fúngica através da citosina permease; assim, a flucitosina é metabolizada em 5-fluorouracil. O 5-fluorouracil é extensivamente incorporado ao RNA fúngico e inibe a síntese de DNA e RNA. O resultado é o crescimento desequilibrado e a morte do organismo fúngico. A flucitosina também parece inibir a enzima timidilato sintetase, impedindo a biossíntese de DNA (Vermes, 2000). O antifúngico é utilizado em conjunto com o polieno anfotericina B lipossomal devido ao efeito sinérgico (Schwarz *et al.*, 2007) (Figura 3D).

Os antifúngicos da classe dos azóis agem inibindo a enzima lanosterol C-14 desmetilase, também conhecida como do citocromo P450, que é codificada pelo gene *erg11* em *C. albicans* e *C. neoformans*, e pelas duas isoformas do gene *cyp51* (*cyp51A* e *cyp51B*) em *A. fumigatus* (Shapiro, Robbins e Cowen, 2011; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2013). Em diversas espécies fúngicas, esses antifúngicos entram na célula por difusão facilitada e o nitrogênio presente na estrutura dos azóis reage com o átomo de ferro contido na porção heme da enzima, inibindo a ativação do oxigênio que é necessário na reação de desmetilação do lanosterol em ergosterol pela atividade da enzima (White, Marr e Bowden, 1998; Hargrove *et al.*, 2015). A inibição da enzima lanosterol C-14 demetilase leva à depleção do ergosterol, redirecionando o fluxo metabólico para a via tóxica dos esteróis (Bhattacharya, Esquivel e White, 2018). Além disso, os azóis são responsáveis por elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células fúngicas (Delattin, Cammue e Thevissen, 2014) (Figura 3A).

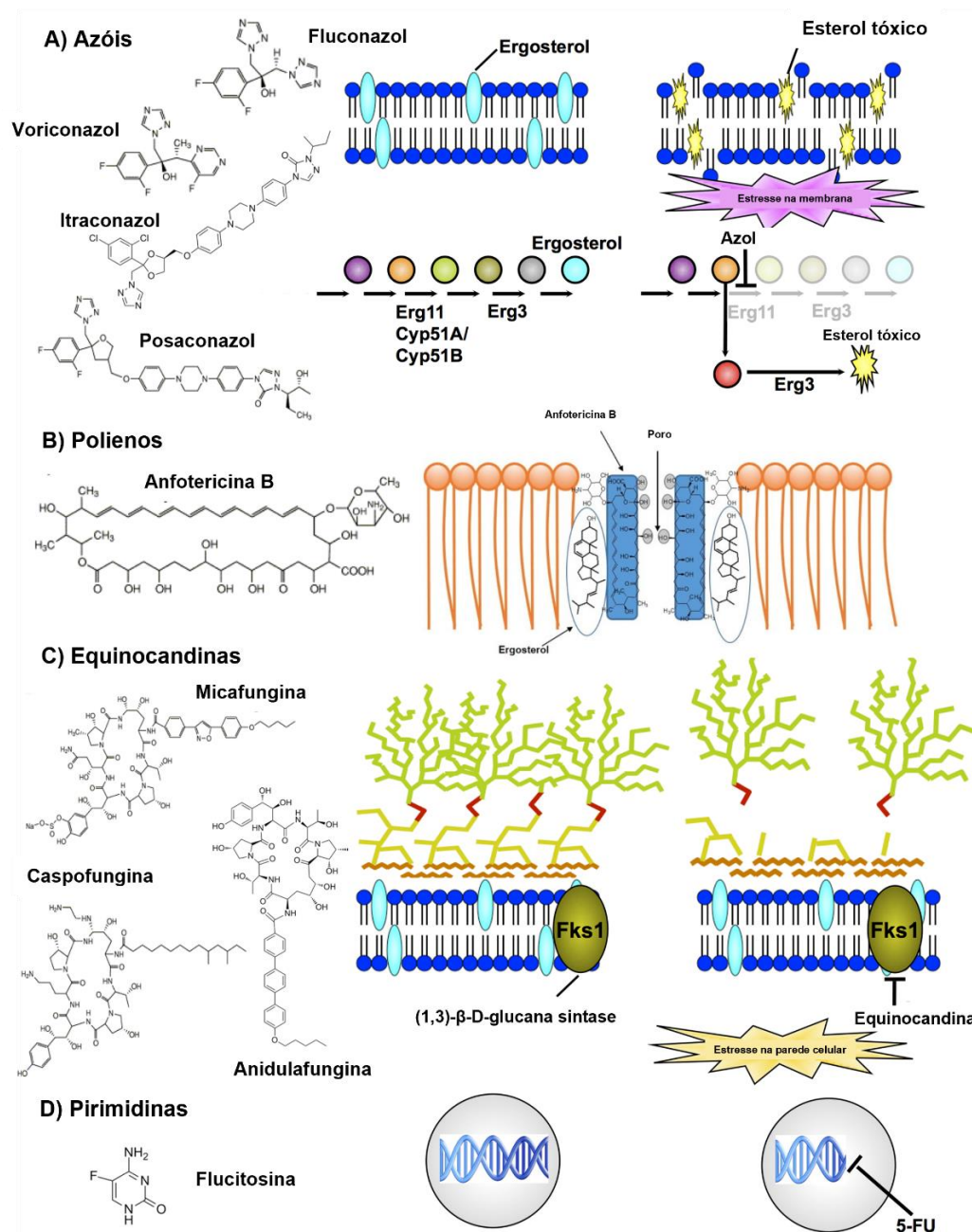


Figura 3: Mecanismos de ação dos antifúngicos utilizados para o tratamento das infecções invasivas e suas estruturas. A) Os azóis inibem a enzima lanosterol demetilase participante da via de biossíntese de ergosterol. B) Os polienos atuam interagindo com o ergosterol formando poros na membrana fúngica. C) As equinocandinas são inibidores não competitivos da (1,3)-β-D-glucana sintase. D) A flucitosina atua como um potente antimetabólito que causa a inibição da síntese de DNA e de proteínas. Adaptado de (Robbins, Wright e Cowen, 2016).

1.4 Mecanismos de resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos, seja intrínseca (primária) ou adquirida (secundária), pode resultar em piores resultados clínicos ou até a falha no tratamento

das infecções invasivas. As falhas no tratamento utilizando o antifúngico de primeira escolha em pacientes imunocomprometidos tem afetado 20 a 60% nos casos de candidíase invasiva e 40 a 60% em pacientes acometidos por aspergilose invasiva (Nucci e Perfect, 2008).

A pressão exercida pelo uso dos antifúngicos pode selecionar infecções causadas por cepas intrinsicamente resistentes, ou até cepas que adquirem resistência durante tratamentos prolongados (Beardsley *et al.*, 2018). Além disso, os azóis têm sido utilizados no tratamento de infecções fúngicas em humanos e na agricultura. O uso dessa classe na agricultura é devido ao baixo custo, ao amplo espectro de ação e a resistência da estrutura molecular podendo persistir no ambiente por longos períodos. Assim, os resíduos de bioativos azólicos presentes no solo, na água e nas plantas contribuem para o aumento da resistência a classe de antifúngicos (Nguyen, Truong e Bruning, 2021).

As cepas de *C. auris* são consideradas multirresistentes por apresentarem resistência intrínseca a um, mais ou às vezes a todos os antifúngicos disponíveis (Ahmad e Alfouzan, 2021). Até o momento, aproximadamente 90% de isolados de *C.auris* apresentam resistência ao fluconazol, 50% ao voriconazol, 15-30% de resistência à anfotericina B e 2-8% de resistência às equinocandinas (Ahmad e Alfouzan, 2021; Tortorano *et al.*, 2021). A alta resistência aos azóis e variabilidade de susceptibilidade às outras classes torna o tratamento da infecção por *C.auris* desafiadora (Ahmad e Alfouzan, 2021).

A resistência de *C. auris* aos azóis foi associada a mutações (F126L, Y132F, K143R, VF125AL) no gene *erg11* que codifica a enzima lanosterol C-14 demetilase. Isolados de *C.auris* com resistência a caspofungina apresentaram mutações (S639F) em Fks1. Além disso, alta atividade dos transportadores ABC e MFS foram identificadas em cepas resistente de *C. auris* (Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018; Du *et al.*, 2020; Ahmad e Alfouzan, 2021). Os mecanismos de resistência em *Candida spp.* podem serem observados na figura 4.

Além de ser um fungo multirresistente aos antifúngicos, a *C. auris* é termotolerante crescendo bem em altas temperaturas (>40°C), e é osmotolerante (>10%). Essas características contribuem para a sobrevivência da *C. auris* na pele humana, superfícies e equipamentos por diversas semanas. Além disso, este fungo tem habilidade de formar biofilmes nas superfícies e pode tolerar a exposição a

detergentes comumente usados. Esses fatores contribuem para a transmissão em ambiente hospitalares (Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018; Du *et al.*, 2020).

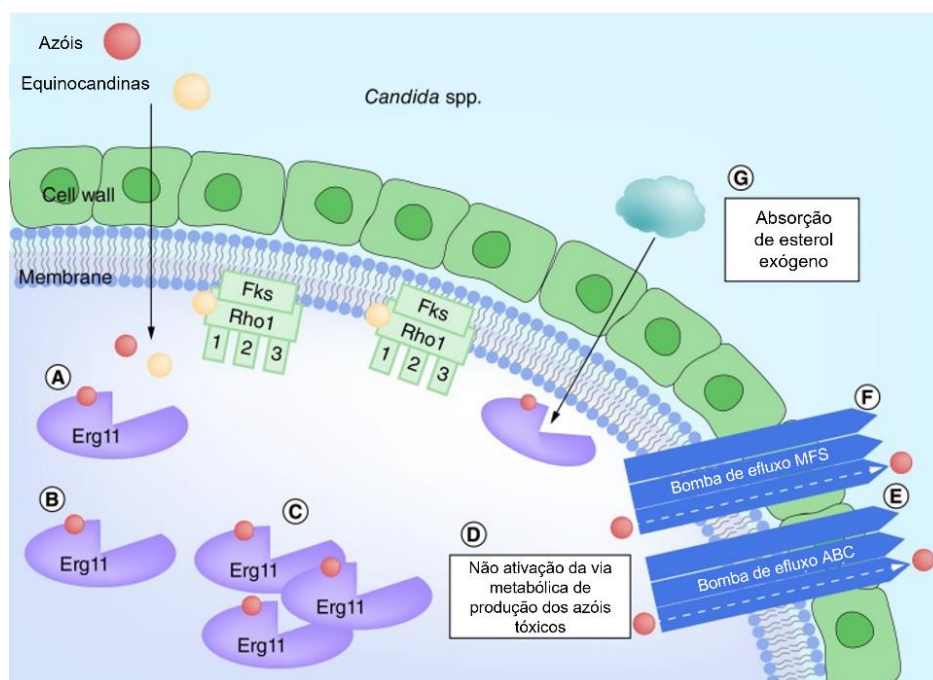


Figura 4: Resumo dos principais mecanismos de resistência em *Candida sp.* **A)** Interação eficiente dos azóis (vermelho) a enzima lanosterol C-14 demetilase (erg11); e interação eficiente das equinocandinas (bege) a enzima (1,3)-β-D-glucana sintase, incluindo as três subunidades Fks1, Fks2 e Fks3, e a subunidade regulatória Rho1. **B)** Redução da interação dos azóis devido a mudanças conformacionais da enzima lanosterol C-14 demetilase. **C)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na produção da lanosterol C-14 demetilase. **D)** Redução da eficácia dos azóis devido a não ativação da produção dos azóis tóxicos. **E e F)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na atividade das bombas de efluxo. **G)** Redução da eficácia dos azóis devido a absorção de esteróis exógenos. **H)** Mudanças conformacionais nas subunidades da (1,3)-β-D-glucana sintase reduzindo a interação com as equinocandinas. Adaptado de (Beardsley *et al.*, 2018).

O surgimento de resistência secundária aos azóis em cepas de *A. fumigatus* tem sido preocupante desde o primeiro relato em 1997, considerando que essa classe é a primeira escolha terapêutica para os casos de aspergiloses, como a aspergilose pulmonar crônica e aspergilose broncopulmonar alérgica que requerem tratamentos de longo prazo (Denning *et al.*, 1997; Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018). Desde então, a resistência do *A. fumigatus* em ambientes hospitalares e no meio ambiente tem sido relatada em diversos países (Figura 6).

Estudos de vigilância mundial identificaram que mais de 50% dos isolados clínicos de *A. fumigatus* resistentes aos azóis apresentam mutações pontuais no gene *cyp51A* associadas a alterações nos aminoácidos M220, G54, G138, G448S e L98H, como também inserções repetidas variáveis em tandem na região promotora (TR34/L98H ou TR46/Y121F/T289A) (Arikan-Akdagli, Ghannoum e Meis, 2018; Beardsley *et al.*, 2018). Considerando as cepas resistentes encontradas no ambiente, em 75% foram encontradas o alelo *cyp51A* sendo TR34/L98H. Entretanto, na América do Sul, o alelo mais frequente associado a resistência aos antifúngicos azólicos foi o Y121F/T289A (Burks *et al.*, 2021). Os mecanismos de resistência em *Aspergillus spp.* podem ser observados na figura 5.

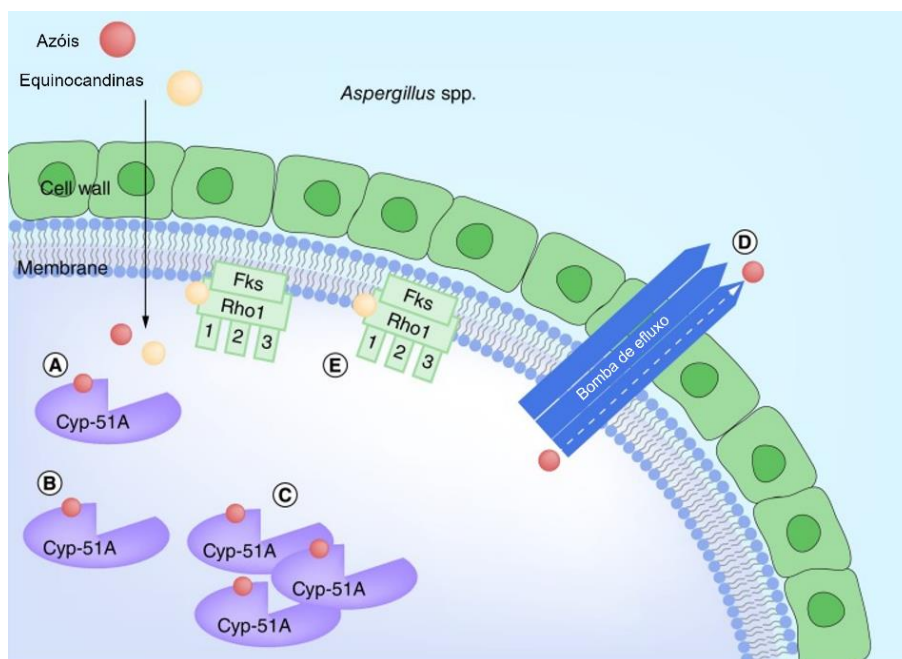


Figura 5: Resumo dos principais mecanismos de resistência em *Aspergillus sp.* **A)** Ligação eficiente dos azóis (vermelho) a enzima lanosterol C-14 demetilase (*erg11*); e ligação eficiente das equinocandinas (bege) a enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, incluindo as três subunidades Fks1, Fks2 e Fks3, e a subunidade regulatória Rho1. **B)** Ligação redução dos azóis devido a mudanças conformacionais da enzima lanosterol C-14 demetilase. **C)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na produção da lanosterol C-14 demetilase. **D)** Redução da eficácia dos azóis devido a não ativação da produção dos azóis tóxicos. **E)** Redução da eficácia dos azóis devido ao aumento na atividade das bombas de efluxo. Adaptado de (Beardsley *et al.*, 2018).



Figura 6: Mapa mostrando os diversos países (em verde) onde vários isolados de *A. fumigatus* resistentes aos azóis foram identificados em ambientes hospitalares e no meio ambiente. Fonte: (Wiederhold, 2023).

1.5 Biossíntese do ergosterol

Os esteróis são componentes essenciais das membranas celulares eucarióticas responsáveis pela manutenção da integridade, fluidez e permeabilidade. Eles também têm outras funções como de regulação da atividade de enzimas que interagem com a membrana, formação e função de microdomínios, transporte e ciclo celular. O esterol mais importante nos animais é o colesterol, que também é precursor da síntese de vitamina D, ácidos biliares e hormônios esteróides (Maxfield e Tabas, 2005). Os esteróis vegetais são chamados de fitoesteróis. Eles são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta e desempenham um papel importante na adaptação ao estresse (Tarkowská e Strnad, 2016). O principal esterol fúngico é o ergosterol, considerado também como o “hormônio fúngico” podendo estimular o crescimento e proliferação (Dufourc, 2008; Jordá e Puig, 2020). Cada um desses esteróis é o produto final de uma longa via biossintética de várias etapas que deriva de uma via inicial comum (acetil-CoA até epóxido de esqualeno) (Dupont *et al.*, 2012; Finn *et al.*, 2015) (Figura 7).

Estudos em *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. neoformans* mostraram que o ergosterol atua como um lipídio imunoativo que induz a piroptose celular (Silver, Oliver e White, 2004; Koselny *et al.*, 2018; Rodrigues, 2018). Além disso, o ergosterol é essencial para a manutenção do DNA mitocondrial em *S. cerevisiae* (Cirigliano *et al.*,

2019). A abundância de ergosterol é um fator crítico para a adaptação fúngica frente ao estresse (Kodedová e Sychrová, 2015; Jordá e Puig, 2020; Oliveira *et al.*, 2020).

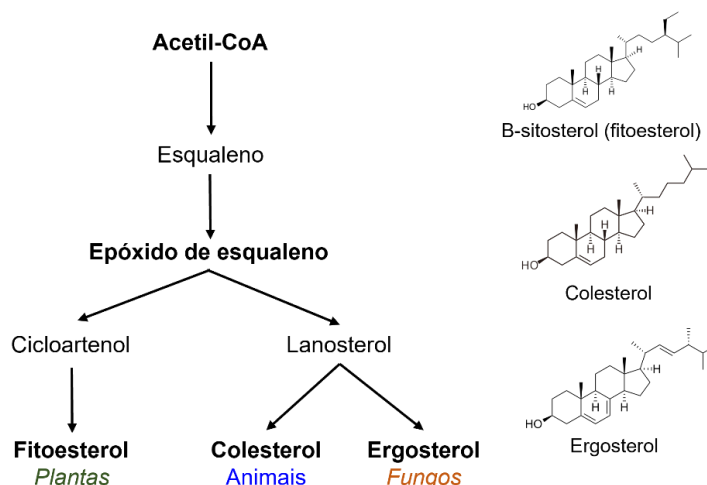


Figura 7: Via simplificada de biossíntese de esterol nos eucariotas. Adaptado de (Dupont *et al.*, 2012)

A via de biossíntese do ergosterol é bem estudada em *Saccharomyces cerevisiae* (Fryberg, Oehlschlager e Unrau, 1973). Esta via é um processo complexo com gasto energético considerável no qual envolvem diversas enzimas. Em *S. cerevisiae*, a biossíntese de uma molécula de ergosterol requer o consumo de pelo menos 24 moléculas de ATP e 16 moléculas de NADPH (Hu *et al.*, 2017). De acordo com as características do produto intermediário, a via de biossíntese pode ser dividida em três módulos. O primeiro módulo é conservado entre todos os eucariotas, ocorre na mitocôndria e resulta na formação do mevalonato a partir do acetil-CoA. O segundo módulo envolve a formação do farnesil pirofosfato a partir do mevalonato e ocorre nos vacúolos. O terceiro módulo envolve a biossíntese do ergosterol a partir do farnesil pirofosfato e ocorre no retículo endoplasmático, citoplasma e partículas lipídicas. As enzimas esqualeno epoxidase (*erg1*), esterol 3 ceto-redutase (*erg27*) e esterol C-24 metiltransferase (*erg6*) podem ocorrer em duas organelas: retículo endoplasmático e partículas lipídicas (Hu *et al.*, 2017; Chiu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Jordá e Puig, 2020). Como o oxigênio é requerido para as múltiplas reações deste último módulo, a disponibilidade do oxigênio afeta significativamente a síntese do ergosterol. As enzimas codificadas pelos genes *erg* são alvos da maior classe de antifúngicos, os azóis. A esterol C-24 metiltransferase (*erg6*), tem se tornado um alvo para a nova geração de antifúngicos pois não participa da biossíntese do colesterol (Kodedová e Sychrová, 2015) (Figura 8).

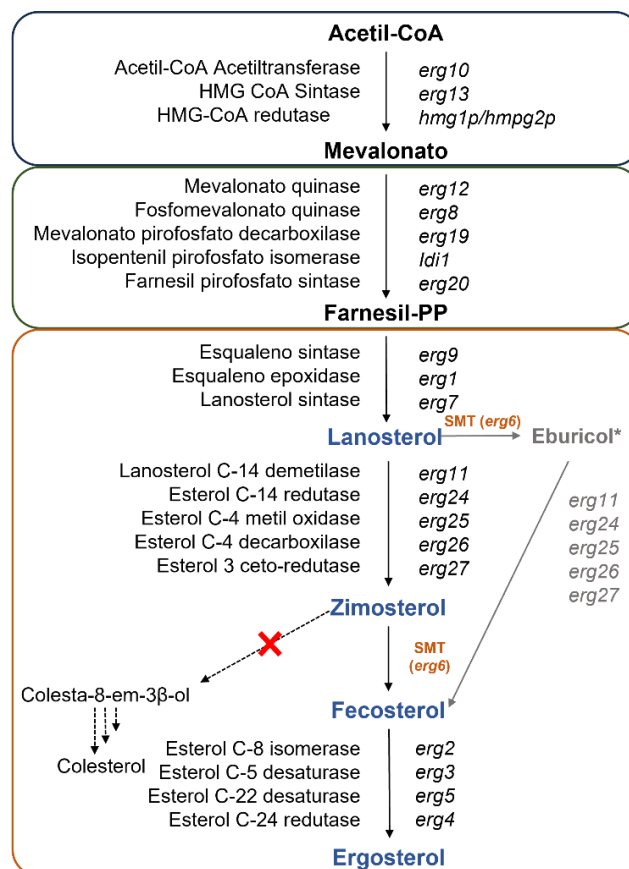


Figura 8: Via de biossíntese do ergosterol em *S. cerevisiae*. *Cinza: via alternativa utilizada por alguns fungos. As enzimas participantes e os genes que as codificam estão descritos. SMT: esterol C-24 metiltransferase. X: via não compartilhada com os fungos. Caixa azul: via de biossíntese do mevalonato. Caixa verde: via de biossíntese do farnesil-PP: Caixa marrom: via de biossíntese do ergosterol. Adaptado de (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019).

1.5.1 Esterol C-24 metiltransferase

A capacidade dos fungos de adicionar um grupamento metil no C-24 dos esteróis é o que difere a via de biossíntese de esterol de humanos para a dos fungos (Georgopapadakou, 1998). A enzima responsável por catalisar esta reação de transmetilação é a esterol c-24 metiltransferase (SMT, 24-SMT, EC 2.1.1.41), sendo esta codificada pelo gene *erg6* (McCammon *et al.*, 1984).

O gene *erg6* já foi caracterizado geneticamente em diversos fungos como *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis carinii* (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998; Kaneshiro *et al.*, 2015; Konecna *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2020; Elias *et al.*, 2022). A deleção do gene

erg6 não foi letal para esses fungos. Entretanto, mutações de função deste gene resultaram em alterações na susceptibilidade do fungo aos fármacos e como também fenótipos de crescimento defeituosos relacionados à integridade e permeabilidade da membrana. Estudos recentes mostraram que a perda de atividade do gene *erg6* em *C. albicans*, seja por meio da redução da expressão do gene ou por meio da inibição farmacológica da enzima SMT, resultaram no bloqueio da transição morfológica de levedura para hifa e reduziu significativamente a virulência (Jin *et al.*, 2023a, 2023b). Além disso, estudos recentes mostram que o gene *erg6* é essencial para a viabilidade das espécies de *Aspergillus* (Xie *et al.*, 2024).

Nos fungos, a reação catalisada pela SMT é do tipo substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) que inclui um doador do grupamento metil (S-adenosil-L-metionina, AdoMet, SAM) e o esterol acceptor (lanosterol ou zimosterol) e é caracterizada pela reorganização de pelo menos três ligações: (a) a clivagem da ligação C-S no SAM, (b) a formação de uma ligação C-C no esterol acceptor com deslocamento 1,2 de hidreto na face oposta (face *si*) da dupla ligação do substrato acceptor, e (c) a perda de um próton do doador ou acceptor (Nes, 2003). Em *S. cerevisiae*, a reação de C-metilação ocorre por meio da interação do substrato acceptor com a SMT na orientação que possibilita que os elétrons π da dupla ligação do C-24 do substrato realize um ataque nucleofílico (face *Si*) ao grupo S-CH₃ do SAM. A reação forma um intermediário de alta energia possuindo um grupo 24 β -metil e um íon carbênio ligado entre a ligação 24,25 ou um carbocátion transiente. Após o rearranjo 1,2 de hidreto do H-24 para o C-25, ocorre eliminação de um próton no C-28, formando os produtos: uma estrutura 24(28) metileno e a S-adenosil-L-homo-cisteína (AdoHcy, SAH) (Nes, 2000; Zhou *et al.*, 2004; Jayasimha *et al.*, 2006) (Figura 9).

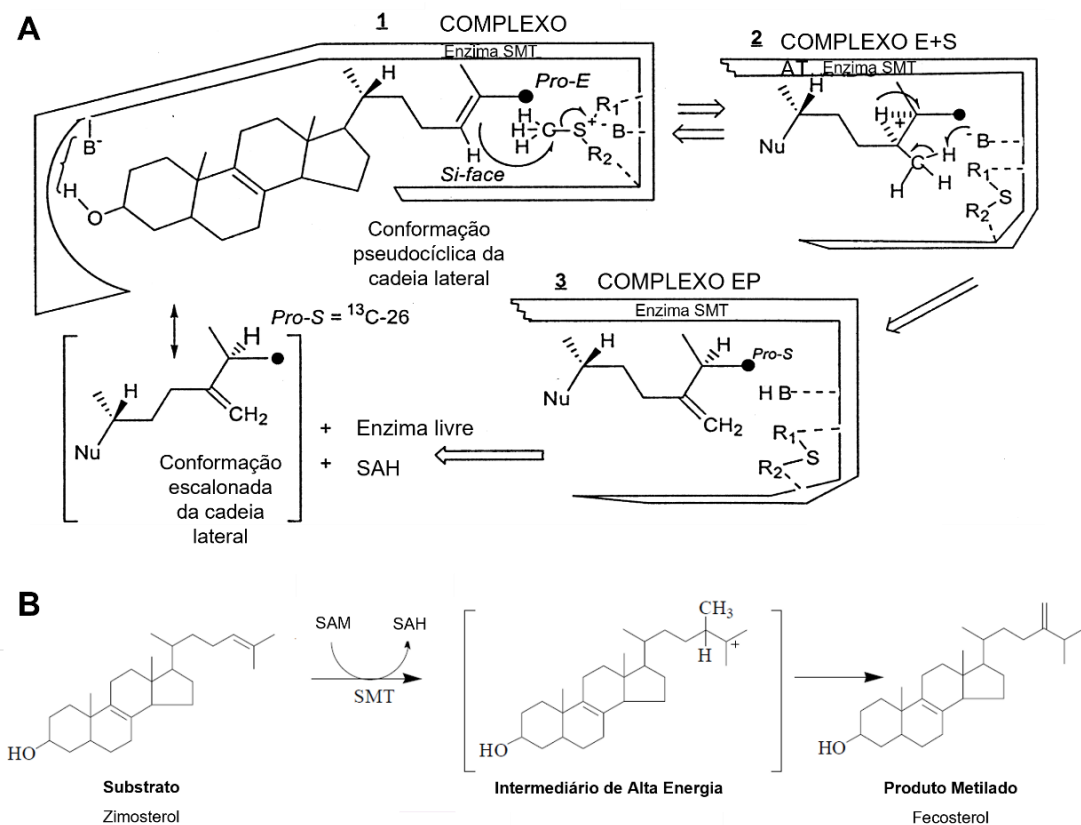


Figura 9: Mecanismo de ação da enzima estero C-24 metiltransferase de *S. cerevisiae*. (A) Nu:núcleo. B⁻ direita: contribui para a reação de transferência do grupamento metila servindo como um agente desprotonante. B⁻ esquerda: auxilia no ancoramento do zimosterol ao complexo enzima substrato por meio de interações de hidrogênio; Si-face: face de trás. (B) Reação de C-metilação enfatizando o intermediário. Adaptado de (Nes, 2000; Zhou *et al.*, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A maioria das infecções fúngicas invasivas afeta pacientes com imunodeficiência severa, como aqueles em internação prolongada em unidade de terapia intensiva, com alterações metabólicas graves e/ou imunossupressão. Estima-se um aumento das infecções fúngicas invasivas ao longo do tempo, decorrente do aumento da incidência de câncer e do uso de terapias médicas imunossupressoras e invasivas. Em casos de candidíase invasiva, a taxa de mortalidade chega a 60%, e em casos de aspergilose invasiva, a 80%, ambas em pacientes com fatores de risco como diabetes, internação em UTI, câncer, transplantes, imunossupressão, neutropenia e infecção por HIV. O tratamento com os antifúngicos atualmente disponíveis apresenta diversas limitações: alta toxicidade, número limitado de antifúngicos, interações medicamentosas, biodisponibilidade reduzida e o desenvolvimento de resistência aos medicamentos disponíveis, especialmente nos casos de infecções por *C. auris* e *A. fumigatus*. Portanto, existe uma necessidade crescente de desenvolver novos fármacos eficazes para o tratamento das infecções fúngicas.

É importante destacar que identificar novos alvos de drogas é um desafio, pois os fungos e os humanos são organismos eucarióticos. Estudos mostram que mutações no gene *erg6* causam alterações na susceptibilidade dos fungos aos fármacos, levam à formação de fenótipos com crescimento defeituoso, relacionados à integridade e permeabilidade da membrana, e bloqueiam o processo de dimorfismo. Dados recentes também demonstraram que o gene *erg6* é essencial para o fungo *Mucor lusitanicus* e para a viabilidade das espécies de *Aspergillus*. Além disso, o gene da esterol C-24 metiltransferase (SMT) está ausente no genoma humano, o que indica esse alvo como promissor. Portanto, este trabalho buscou a caracterização estrutural e enzimática das esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e *A. fumigatus* como parte de uma estratégia para o desenvolvimento de antifúngicos potentes e seletivos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo fornecer informações estruturais e funcionais das esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus* para o desenvolvimento de antifúngicos potentes e seletivos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus* em sistema de expressão de *Escherichia coli*.
- Purificar as esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus*.
- Caracterizar funcionalmente as esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus* por meio de ensaio enzimático.
 - Determinar a via de biossíntese do ergosterol por meio da definição do substrato utilizado por cada enzima estudada.
 - Determinar a afinidade de cada enzima pelos substratos.
 - Determinar os parâmetros cinéticos de cada enzima estudada.
 - Identificar inibidor para cada enzima estudada.
- Caracterizar as estruturas das esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus* por dicroísmo circular.
 - Avaliar o efeito do pH e temperatura na estabilidade e na estrutura secundária das enzimas.
- Predizer a estrutura tridimensional das esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus*.
- Analisar a especificidade de interação dos substratos para cada enzima por meio de *docking* molecular.
- Obter cristais das esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus*, assim como dos complexos com os substratos.

4 METODOLOGIA

4.1 Transformação de *E. coli* BL21 (DE3) com os plasmídeos de expressão

A sequência de aminoácidos correspondente às esterois C24-metiltransferases de *C. auris* e *A. fumigatus* foi obtida no UniProt. As enzimas foram identificadas como CauSMT e AfSMT, respectivamente. Outras sequências desses fungos, disponíveis no banco de dados, foram analisadas, mostrando-se 100% idênticas. As sequências foram submetidas a análises de predição de hélices transmembrânicas pelo servidor TMHMM Server v. 2.0, de domínios conservados e de sítios de clivagem por meio do banco de dados CDD do NCBI, predição de sítios de N-glicosilação pelo servidor NetNGlyc 1.0 Server e predição de pontes dissulfeto por meio do software DIPPro. Além disso, as sequências foram desenhadas para otimizar os códons preferenciais utilizados por *Escherichia coli*, sendo adicionados sítios de restrição para XhoI e NdeI. O gene foi sintetizado e clonado pela empresa GenOne.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de plasmídeo, primeiramente, 100 µL de células competentes de *Escherichia coli* DH5-α e 1 µL do vetor de expressão CauSMT-pET28a e AfSMT-pET28a (40 ng/mL) foram misturados. Em seguida, o protocolo de transformação por choque térmico foi seguido conforme descrito no item 4.2.

Logo após, uma colônia recombinante de *E. coli* foi adicionada a 5 mL de meio LB com 5 µL de ampicilina (100 mg/mL) e incubada a 37 °C, sob agitação, por 12 horas. A cultura foi centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos. O DNA plasmidial foi purificado utilizando o kit NucleoSpin® Plasmid da Macherey-Nagel, conforme as recomendações do fabricante.

A transformação de *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, BL21 (DE3) pLysS, Lemo21 (DE3) e pGro (DE3) com o vetor de expressão CauSMT-pET28a e AfSMT-pET28a foi realizada adicionando-se 1 µL do vetor (40 ng/mL) a 100 µL de células competentes. Em seguida, o protocolo de transformação por choque térmico foi seguido conforme descrito no item 4.2.

4.2 Transformação de células de *E. coli* por choque térmico

As células foram incubadas em gelo por 45 minutos e logo em seguida a 42 °C por 90 segundos. Após o choque térmico, as células foram incubadas no gelo durante

5 minutos. Após esta etapa, 900 µL de meio de cultura LB (peptona e caseína 1% (m/v), NaCl 1% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v)) foram adicionados às células, que em seguida foram incubadas a 37 °C durante 1 h. Subsequentemente, 200 µL da cultura foram plaqueados em 25 mL de meio LB sólido (peptona e caseína 1% (m/v), NaCl 1% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v) e ágar 2% (m/v)), suplementado com canamicina 50 µg/mL e 34 µg/mL de cloranfenicol para as transformações com as células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, BL21 (DE3) PlysS, Lemo21 (DE3) e pGro (DE3) e canamicina 50 µg/mL para as células de *E. coli* BL21 (DE3). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h para o crescimento das colônias.

4.3 Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de *Escherichia coli*

Um dos clones recombinantes (item 4.2) foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido no qual foram adicionados canamicina 50 µg/mL e 34 µg/mL de cloranfenicol para as transformações com as células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, BL21 (DE3) PlysS, Lemo21 (DE3) e pGro (DE3) e canamicina 50 µg/mL para as células de *E. coli* BL21 (DE3). A cultura foi incubada a 37 °C por 16 h, sob agitação (220 r.p.m.). 1,25 mL deste inóculo inicial foi adicionado a 25 mL de meio LB com canamicina 50 µg/mL e 34 µg/mL de cloranfenicol para as transformações com as células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, BL21 (DE3) PlysS, Lemo21 (DE3) e pGro (DE3)) e canamicina 50 µg/mL para as células de *E. coli* BL21 (DE3). A cultura foi incubada a 37 °C em agitação até a O.D.₆₀₀ (densidade ótica em 600 nm) alcançar o valor de 0,6 a 0,8. Atingida a O.D.₆₀₀, 1 mL de cultura pré-indução foi coletado e centrifugado a 12.000 x g por 3 min. Posteriormente, a cultura foi induzida com IPTG (concentração final 1 mM). Após 6 h de indução, o cultivo final com O.D.₆₀₀ de 2,0 foi submetida a centrifugação a 9.200 x g por 20 min.

4.4 Análise da expressão por SDS-PAGE

Baseando-se na O.D.₆₀₀ do precipitado celular obtido no item 4.3, a concentração do mesmo foi ajustada de forma que se tornassem iguais, para isto, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra Laemmli 1x (200 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (m/v), 10 mM β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% (m/v) e 40% de glicerol). Depois de ressuspensas, as amostras foram fervidas a ~95 °C em banho-

maria por 15 min. O gel separador 12% (m/v) foi preparado utilizando-se 3 µL de TEMED, 150 µL de SDS 10% (m/v), 50 µL de PSA (persulfato de amônia) 10% (m/v), 1,25 mL de Tris-HCl pH 8,8, 2 mL de acrilamida 30% (m/v) e 1,7 mL de água destilada. O gel concentrador 5% (m/v) foi preparado utilizando-se 75 µL de SDS 10% (m/v), 3 µL de TEMED, 25 µL de PSA 10% (m/v), 340 µL de Tris-HCl pH 6,8, 420 µL de acrilamida 30% (m/v) e 1,75 mL de água destilada. 20 µL da amostra foram adicionados à canaleta do gel, o qual foi corrido em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,1% (m/v)) a aproximadamente 160 V e 45 mA. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de Commassie (Commassie brilliant blue R-250 0,1% (m/v), etanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)) por 12 h e descorado com ácido acético 20% (v/v) (Laemmli, 1970).

4.5 Teste de Solubilidade de CauSMT e da AfSMT

O precipitado celular resultante do cultivo foi ressuspensionado em tampão de lise (Tris 75mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%) e sonificado usando o Vibra Cell Sonics por 15 minutos seguindo os seguintes parâmetros: ciclos de 45 segundos de lise e 1 minuto de descanso. O precipitado celular foi separado do sobrenadante por centrifugação a 14.400 x g durante 30 minutos a 4 °C. A eletroforese por meio de SDS PAGE 12% (m/v) (item 4.4) foi realizada com alíquotas do sobrenadante e do precipitado celular a fim de avaliar a solubilidade da proteína de interesse.

4.6 Otimização da produção de CauSMT e da AfSMT

Colônias de cada transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) PlysS foram inoculadas em 25 mL de meio auto-indutor ZYM-5052 contidos em Erlenmeyer de 250 mL aletados (Tabela 2). A cultura foi incubada a 37 °C e após 16 h de expressão heteróloga, o cultivo final foi submetido a centrifugação a 9.200 x g por 20 min. O precipitado celular foi armazenado a -4°C para realizar o teste de solubilidade (item 4.5).

Posteriormente, foi realizada novamente a transformação de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) PlysS com vetor de expressão CauSMT-pET28a e AfSMT-pET28a. No qual foi adicionado o volume de 1 µL do vetor (40 ng/mL) a 100 µL de células de competentes. Em seguida, seguiu-se o protocolo de transformação por choque térmico conforme item 4.2., diferenciando que nesse experimento foi utilizado o meio

de cultura MDG sólido e líquido (Tabela 2). Posteriormente, três colônias de cada transformação de células de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 (DE3) PlyS foram inoculadas em 5 mL de meio líquido MDG com os antibióticos já citados anteriormente (Tabela 1). A cultura foi incubada a 37 °C por 16 h, sob agitação (220 r.p.m.) 25 µL deste inóculo inicial foi adicionado a 25 mL de meio ZYM-5052 (Tabela 2) contidos em Erlenmeyer de 250 mL aletados. A cultura foi incubada a 37 °C e após 16 h de expressão heteróloga, o cultivo final foi submetido a centrifugação a 9.200 x g por 30 min.

Tabela 1. Composição do meio de cultura mínimo MDG (Studier, 2005).

Na ₂ HPO ₄	25 mM	MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM	FeCl ₃	0,06 mM
NH ₄ Cl	50 mM	glicose	0,5%
Na ₂ SO ₄	5 mM	glicose	0,5%

Tabela 2. Composição do meio de cultura auto-indutor ZYM-5052 (Studier, 2005).

Peptona	1%	MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM
Extrato de levedura	0,5%	FeCl ₃	0,06 mM
Na ₂ HPO ₄	25 mM	glicerol	0,5%
KH ₂ PO ₄	25 mM	glicose	0,05%
NH ₄ Cl	50 mM	lactose	0,2%
Na ₂ SO ₄	5 mM		

O precipitado celular foi armazenado a -4°C para realizar o teste de solubilidade (item 4.5).

4.7 Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de *Escherichia coli* e purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

A expressão heteróloga em grande escala foi realizada iniciando-se com a adição de 200 µL do inóculo inicial de *E. coli* BL21 (DE3) transformado (meio de cultura MDG) foi adicionado a 500 mL de meio ZYM-5052 contidos em Erlenmeyer de 1 L aletados contendo canamicina 50 µg/mL. A cultura foi incubada a 37 °C por 16 h, sob agitação (220 r.p.m.). O cultivo foi submetido a

centrifugação a 9.200 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado celular foi ressuspenso em tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%, seguindo-se uma proporção de 80 mL para cada precipitado celular obtido da expressão de 500 mL de cultivo. As células ressuspensoas foram então ultrasonificadas (ultrasonificador S250A, Branson Ultrasonics) durante 30 min, com dutycycle de 30% e a amplitude de 40%. O lisado resultante foi centrifugado a 14.400 x g por 30min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em uma membrana com poro de 0,45 µm. A purificação foi realizada utilizando-se o equipamento ÄKTA Prime (GE Healthcare) e a coluna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare). O tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5% foram utilizados como tampão de ligação e de eluição, com o diferencial de que o de eluição era acrescido de 500 mM de imidazol. A amostra filtrada foi injetada na coluna em um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Para a remoção de proteínas contaminantes a coluna foi submetida a diversas lavagens com diferentes concentrações de imidazol. Após a eluição da proteína, as frações coletadas foram analisadas por eletroferese em SDS-PAGE.

Posteriormente, objetivando a otimização da expressão, 200 µL do inóculo inicial de *E. coli* BL21 (DE3) transformado (meio de cultura MDG) foi adicionado a 200 mL de meio ZYM-5052 contidos em Erlenmeyer de 1 L aletados contendo canamicina 50 µg/mL. Devido a aeração, foram realizados dois cultivos de 200 mL para proteína. A cultura foi incubada a 37 °C por 16 h, sob agitação (220 r.p.m.). O cultivo foi submetido a centrifugação a 9.200 x g por 20 min a 4 °C. O protocolo utilizado para a purificação desta otimização foi o mesmo descrito previamente. Após a eluição da proteína, as frações coletadas foram analisadas por eletroferese em SDS-PAGE. Os cromatogramas foram construídos utilizando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.8 Imunodeteção da CauSMT e da AfSMT por Western Blot

Para esta análise um gel SDS-PAGE 12 % foi corrido, mas não foi corado com a solução corante de Commassie. O gel foi mantido por 15 min em tampão de transferência (Tris 48 mM, SDS 0,037%, Metanol 20%, Glicina 39 mM). A membrana de nitrocelulose e dois papéis de filtro foram embebidos em tampão de transferência.

No aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell foram empilhados um papel filtro, membrana, gel e o último papel filtro. Este foi submetido a 15 V por 15 min. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (Leite desnatado 5%, Tween 0,05% e PBS 1x) por 2h a temperatura ambiente. A membrana foi submetida a três lavagens de 5 minutos em tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2 mM) acrescido com Tween 20 0,05%. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal Anti-polihistidina-fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, A5588) diluído em tampão PBS 1X adicionado BSA 1% na proporção 1:1000 por 2h. Em seguida, a membrana foi então submetida às três lavagens com PBS 1x acrescido com Tween 20 0,05%. A membrana foi lavada uma vez com tampão APB (NaCl 100 mM, Tris 100 mM pH 9,5, MgCl 5 mM) e então foi revelada utilizando a solução reveladora formada pelos substratos NBT/BCIP (Sigma-Aldrich, B5655).

4.9 Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Objetivando o refinamento da purificação, as frações purificadas por cromatografia IMAC após análise de eletroferese em SDS-PAGE foram injetadas na coluna Hiload 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada em tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%, e a amostra foi aplicada em um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os picos foram coletados e analisados em gel SDS-PAGE 12 %. Os cromatogramas foram construídos utilizando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

Para a construção da curva de calibração da coluna foram utilizados para blue dextran 2000 (2000 kDa), tireoglobulina (669 kDa), Apoferritina (443 kDa), β-amilase (200 kDa), Álcool desidrogenase (150 kDa), Albumina (66 kDa) e Anidrase carbônica (29 kDa). A cromatografia das proteínas calibrantes foi realizada nas mesmas condições que as cromatografias das proteínas analisadas nesse trabalho. Obteve-se uma curva de calibração entre o coeficiente de partição K_{av} contra o log da massa molecular dos calibrantes, sendo que: V_e =volume de retenção da proteína V_0 =volume vazio da coluna V_c =volume geométrico da coluna.

$$K_{av} = V_e - V_0 / V_c - V_0 \text{ (equação 1)}$$

4.10 Otimização da purificação

4.10.1 Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de troca iônica (IEX)

Outra etapa de purificação foi realizada sendo esta por troca aniônica utilizando a coluna HiTrap Q FF. A proteína eluída da cromatografia de exclusão molecular passou por uma etapa para remoção do imidazol presente na amostra, e após isso foi aplicada na coluna e eluída por gradiente de 50mL de NaCl de 0 a 1 M em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

4.10.2 Purificação da CauSMT por IMAC na presença de inibidores de proteases

A CauSMT foi produzida utilizando o protocolo determinado após a otimização descrito no último parágrafo do item 4.7. O cultivo resultante da expressão heteróloga foi submetido a centrifugação a 9.200 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado celular foi ressuspensionado em tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%, seguindo-se uma proporção de 40 mL para cada precipitado celular obtido da expressão de 200 mL de cultivo. Em seguida adicionou-se os inibidores de protease aprotinina (0.7 µg/mL), pepstatina (0.7 µg/mL), PMSF (1mM) e leupeptina (0.5 µg/mL). As células ressuspensas foram então ultrasonicadas (ultrasonicador S250A, Branson Ultrasonics) durante 30 min, com dutycycle de 30% e a amplitude de 40%. O lisado resultante foi centrifugado a 14.400 x g por 30min a 4 °C. As etapas da purificação foram as mesmas realizadas no item 4.7. Após a eluição da proteína, as frações coletadas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE. Os cromatogramas foram construídos utilizando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.10.3 Purificação da CauSMT por IMAC na presença do agente redutor β-mercaptoetanol

A fração eluída de 2,5 mL na purificação anterior foi diluída objetivando que a concentração de imidazol ficasse a 50 mM. Foi adicionado β- mercaptoetanol 10mM ao volume de 25 mL, ficando este incubado por 1h30min a 4°C. Para que

a purificação ocorresse totalmente em ambiente redutor, foi adicionado também β - mercaptoetanol 10mM nos tampões de ligação e eluição. As etapas da purificação foram as mesmas realizadas no item 4.7. Após a eluição da proteína, as frações coletadas foram analisadas por eletroferese em SDS-PAGE.

4.10.4 Purificação da CauSMT por ultrafiltração

A fração eluída de 50 μ L na purificação 4.10.2 foi diluída 20 vezes em tampão de ligação (Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%). O volume de 500 mL foi concentrado por ultrafiltração, utilizando o sistema *Amicon* de 500 mL contendo membrana de celulose regenerada de 10 kDa de *cut-off*. O mesmo protocolo foi realizado novamente, só que nesse outro caso foi utilizado a membrana de celulose regenerada de 100 kDa de *cut-off*.

4.11 Análises de mudanças no estado oligomérico da CauSMT por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Objetivando analisar o efeito da variação da concentração e de agentes aditivos no estado oligomérico de CauSMT, foram realizados diversos ensaios utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). As medições de DLS foram feitas em um Zetasizer Nano Series Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) para determinação do tamanho de partícula/moléculas a 20 °C. Um laser He-Ne com $\lambda = 633$ nm foi usado para medições, em ângulo de 173°, com detecção de retrodispersão, usando a cubeta de plástico. Os experimentos foram realizados com a proteína em tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%. Diversas condições de CauSMT foram preparadas conforme tabela 3. Antes das medições, as amostras foram centrifugadas a 14.400 x g por 1h a 4 °C, filtradas em filtro 0,22 μ m estéril e deaeradas por 10 minutos. Previamente a cada análise das amostras listadas na tabela 3, foram realizadas a leituras dos controles ausentes da proteína.

Tabela 3. Diferentes condições testadas de CauSMT pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.

	Condições	Variações nas Condições			
1	[mg/mL]	1,4	0,7	0,35	0,08
2	[0,35] + Glicerol	10%		20%	
3	[0,35] + Glicerol ¹ + CHAPS ²	20% ¹ + 1% ²		20% ¹ + 4% ²	
4	[0,35] + Triton X-100	0,5%			
5	[0,35] + Triton X-100	0,05%	0,1%	0,3%	0,5%

4.12 Purificação da CauSMT e AfSMT por IMAC na presença de aditivo

A CauSMT foi produzida utilizando o protocolo determinado após a otimização descrito no último parágrafo do item 4.7. O cultivo resultante da expressão heteróloga foi submetido a centrifugação a 9.200 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado celular foi ressuspensionado em tampão (Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%, Triton X-100 0,1%) seguindo-se uma proporção de 40 mL para cada precipitado celular obtido da expressão de 200 mL de cultivo. Em seguida adicionou-se os inibidores de protease aprotinina (0.7 µg/mL), pepstatina (0.7 µg/mL), PMSF (1mM), leupeptina (0.5 µg/mL) e DTT 4 mM. As células ressuspensas foram então ultrasonificadas (ultrasonificador S250A, Branson Ultrasonics) durante 30 min, com dutycycle de 30% e a amplitude de 40%. O lisado resultante foi centrifugado a 14.400 x g por 30min a 4 °C. As etapas da purificação foram as mesmas realizadas no item 4.7. Após a eluição da proteína, as frações coletadas foram analisadas por eletroferese em SDS-PAGE. Os cromatogramas foram construídos utilizando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.13 Determinação do estado oligomérico da CauSMT e AfSMT por SEC

Objetivando determinar o estado oligomérico das proteínas purificadas por IMAC, as frações foram injetadas na coluna Hiload 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada em tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%, Triton X-100 0,1% e a amostra foi aplicada em um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os picos foram coletados e analisados em gel SDS-PAGE 12 %. Os cromatogramas foram construídos utilizando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.14 Determinação da concentração da CauSMT e da AfSMT por Bradford

A concentração de CauSMT e AfSMT foi determinada pelo método de quantificação de proteína, Bradford (Bradford, 1976). Neste método utilizou-se albumina sérica bovina – BSA (SigmaAldrich, Alemanha) para obtenção da curva-padrão. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 250µL de reagente de Quick Start Bradford 1x reagente (Bio-Rad, EUA) e 5 µL de amostra. O tempo de incubação foi de 5 min a temperatura ambiente, com leitura a 595 nm em microplaca de 96 poços.

4.15 Caracterização enzimática da CauSMT e da AfSMT

4.15.1 Descrição do ensaio enzimático de metiltransferase (MTase-Glo™)

A caracterização enzimática das esterol C24-metiltransferases de *C. auris* e de *A. fumigatus* em tampão Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5%, Triton X-100 0,1% foi realizada por meio do kit comercial MTase-Glo™ da Promega Corporation (Madison, WI, USA), sendo que este ensaio também utilizado por outros grupos de pesquisa para analisar a atividade enzimática de metiltransferase (Hsiao, Zegzouti e Goueli, 2016, 2022; Dong *et al.*, 2020).

O ensaio MTase-Glo™ é composto por:

- Reagente Methyltransferase-Glo™
- Solução de detecção Methyltransferase-Glo™
- S-adenosil-metionina (SAM)
- S-adenosil-homocisteína (SAH)

O ensaio MTase-Glo™ é um ensaio de bioluminescência que monitora a atividade de metiltransferase por meio da detecção de formação de SAH. Após a reação de metiltransferase, o reagente MTase-Glo™ é adicionado para converter SAH em ADP. Posteriormente, adiciona-se a solução de detecção MTase-Glo™ que irá converter ADP em ATP, que é então detectado via reação de luciferase (Figura 10). O ensaio foi realizado em microplacas brancas de 96 poços adequadas para ensaios de luminescência. As leituras das placas foram realizadas no equipamento GloMax® Discover Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, USA).

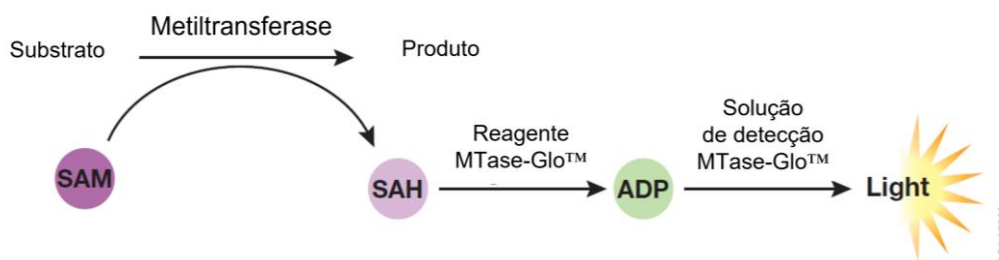


Figura 10. Ensaio de metiltransferase MTase-Glo™, Promega Corporation (Madison, WI, USA).

4.15.2 Determinação da especificidade em relação aos substratos esteróis

Seguindo recomendações do fabricante, os estoques dos substratos zimosterol (700068P-Avanti Polar Lipids, INC) e lanosterol (700063P-Avanti Polar Lipids, INC) foram preparados sendo eles dissolvidos em etanol/água ultrapura e armazenados a -4°C. Imediatamente antes do uso, as alíquotas eram aquecidas a 40°C e sonicadas. Para este primeiro ensaio, as concentrações das enzimas e substratos foram determinadas baseando-se nos ensaios realizados por Nes, Leaver e colaboradores (Nes, Jayasimha e Song, 2008; Leaver, 2018). O ensaio foi realizado com a concentração de CauSMT e AfSMT a 1 µM. As atividades de ambas as enzimas foram testadas na presença dos substratos zimosterol e lanosterol a 150 µM. Seguindo-se recomendações do protocolo do ensaio MTase-Glo™, as reações das metiltransferases foram preparadas constituindo-se de: enzimas, SAM, zimosterol ou lanosterol e o tampão de reação (20 mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA e 1mM DTT). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, 5 µL do reagente Methyltransferase-Glo™ foi adicionado à reação que foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, 25 µL da solução de detecção Methyltransferase-Glo™ foi adicionada. A reação foi incubada por mais 30 min a temperatura ambiente para a reação de luciferase e posterior leitura da luminescência.

4.15.3 Determinação da concentração de enzima ótima

Após a determinação da atividade de cada enzima frente a cada um dos substratos esteróis, este ensaio foi realizado destes a 150 µM e variação crescente da concentração de CauSMT e AfSMT (3,9 a 125 nM). Seguindo-se recomendações do protocolo do ensaio MTase-Glo™, as reações das

metiltransferases foram preparadas constituindo se de: enzimas, SAM, zimosterol ou lanosterol e o tampão de reação (20 mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA e 1mM DTT). A detecção de formação de SAH foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.15.2. O ajuste da equação da reta foi realizado usando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.15.4 Determinação da constante de afinidade pelos substratos

Para a definir a constante de afinidade da CauSMT pelo SAM, o ensaio foi realizado em crescentes concentrações do substrato SAM (0,31 μ M a 160 μ M) na presença de zimosterol a 160 μ M.

Após definição da constante de afinidade do SAM, o ensaio para determinar a constante de afinidade da CauSMT pelo zimosterol foi realizado em crescentes concentrações do substrato zimosterol (2,5 μ M a 160 μ M) na presença de 12 vezes a constante de afinidade de SAM correspondendo a 52,35 μ M.

Para a definir a constante de afinidade da AfSMT pelo SAM, o ensaio foi realizado em crescentes concentrações do substrato SAM (0,31 μ M a 160 μ M) na presença de lanosterol a 160 μ M.

Após definição da constante de afinidade do SAM, o ensaio para determinar a constante de afinidade da AfSMT pelo lanosterol foi realizado em crescentes concentrações do substrato lanosterol (20 μ M a 640 μ M) na presença de 10 vezes a constante de afinidade de SAM correspondendo a 18,2 μ M.

Seguindo-se recomendações do protocolo do ensaio MTase-Glo™, as reações das metiltransferases foram preparadas constituindo se de: enzimas, SAM, zimosterol ou lanosterol e o tampão de reação (20 mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA e 1mM DTT), seguido da adição de TFA 0,05% para parar a reação. A detecção de formação de S-adenosil-homocisteína (SAH) foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.15.2. O ajuste da curva hiperbólica foi realizado usando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.15.5 Determinação da curva-padrão de SAH

O ensaio para obtenção da curva-padrão de SAH foi preparada usando os mesmos parâmetros e tampões dos ensaios de titulação das enzimas e substratos. A correlação linear da unidade relativa de luminescência (RLU) de acordo com a concentração do produto foi realizada mediante a variação crescente de SAH (0,009 a 10 μM). Seguindo-se recomendações do protocolo do ensaio MTase-Glo™, a diluição de SAH foi preparada utilizando o tampão de reação (20 mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA e 1mM DTT). Após a leitura da luminescência, o ajuste da equação da reta foi realizado usando o programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.15.6 Determinação dos parâmetros cinéticos de CauSMT

Para a determinação dos valores cinéticos de K_m e $V_{\text{máx}}$ a enzima CauSMT a 50nM foi incubada em concentrações crescentes de substrato zimosterol (5 μM a 320 μM) e do substrato SAM a 25 μM . Seguindo-se recomendações do protocolo do ensaio MTase-Glo™, a reação da metiltransferase foi preparada constituindo se de: enzima, SAM, zimosterol e o tampão de reação (20 mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA e 1mM DTT), seguido da adição de TFA 0,05% para parar a reação. Os ensaios foram realizados nos tempos de 60, 600, 1.200 e 1.800 segundos, de forma a obter a velocidade inicial para cada concentração de substrato testada. A detecção de formação de SAH foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.15.2.

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{\text{máx}}$ foram determinados por meio da relação entre velocidade inicial e concentração do substrato seguindo o ajuste da curva hiperbólica pela equação de Michaelis-Menten (equação 2), presente no programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA):

$$V = V_{\text{máx}} [S] / K_m + [S] \text{ (equação 2)}$$

Onde S é a concentração de substrato em μM , V_0 é a velocidade de reação inicial em $(\mu\text{M}.\text{min})^{-1}$, $V_{\text{máx}}$ é a velocidade de reação máxima em $(\mu\text{M}.\text{min})^{-1}$, e K_m é a constante de Michaelis-Menten ou a concentração de substrato para qual a enzima atinge a metade de $V_{\text{máx}}$ μM .

O k_{cat} em min^{-1} , número de renovação (*turnover number*) foi calculado a partir da equação 3.

$$k_{cat} = V_{\text{máx}} / [E_t] \text{ (equação 3)}$$

onde $[E_t]$ é a concentração de enzima inicial em nM.

4.15.7 Inibição da atividade enzimática de CauSMT e da AfSMT pela tomatidina

Seguindo recomendações do fabricante, o estoque do inibidor tomatidina (Sigma-Aldrich, T2909) foi preparado sendo dissolvido em DMSO e armazenado a -4°C . Imediatamente antes do uso, as alíquotas eram aquecidas a 40°C e sonicadas. O ensaio foi realizado com a concentração de CauSMT a 50 nM e dos correspondentes substratos zimosterol a 100 μM e SAM a 25 μM . Para o ensaio com a AfSMT, concentração da enzima foi 50 nM e dos correspondentes substratos lanosterol 350 μM e SAM a 10 μM . Seguindo-se recomendações do protocolo do ensaio MTase-Glo™, as reações das metiltransferases foram preparadas constituindo se de: enzimas, zimosterol ou lanosterol, tampão de reação (20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 3mM MgCl_2 , 0.1mg/ml BSA e 1mM DTT) e reagente Methyltransferase-Glo™, seguido da adição do inibidor. A reação foi incubada por 10min a temperatura ambiente. Posteriormente, o substrato SAM foi adicionado e a reação foi incubada por mais 30 min a temperatura ambiente. A reação de luciferase foi realizada adicionando-se 25 μL da solução de detecção Methyltransferase-Glo™ e incubando por mais 60 min a temperatura ambiente. A luminescência foi lida logo em seguida. A concentração inibitória média (IC_{50}) foi calculada por meio de ajuste não linear para a curva de dose-resposta disponibilizada no programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA).

4.16 Caracterização estrutural da CauSMT e da AfSMT

4.16.1 Efeito do pH e temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural por dicroísmo circular

Os espectros dicroicos da CauSMT e da AfSMT foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier (Jasco Corporation, Tóquio, Japão). As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo de 0,05 cm na faixa de 195-260 nm (região far-

UV) com um intervalo de aquisição de dados 0,1 nm. A concentração da CauSMT e da AfSMT e dos tampões utilizados nos ensaios estão listados na tabela 4. Três leituras consecutivas foram acumuladas e a média dos espectros foi registrada. A contribuição do sinal dos tampões foi subtraída de cada espectro proteico coletado.

A elipticidade de cada comprimento de onda $(\theta)_\lambda$ foi convertido em elipticidade molar média por resíduo usando a equação 4.

$$(\theta)_\lambda = \theta / 10 \text{ c n L (equação 4)}$$

onde: $(\theta)_\lambda$ é a elipticidade (milidegrees); n: número de resíduos de aminoácidos; c: a concentração da proteína (mol/L) e L, o caminho óptico (cm). O valor de $(\theta)_\lambda$ é descrito em degrees.cm²/dmol (Adler, Greenfield e Fasman, 1973; Woody e Dunker, 1996). O percentual de estrutura secundária de CauSMT e AfSMT foi estimado por meio dos espectros usando o programa de deconvolução Bestsel (Micsonai *et al.*, 2018). Quanto ao percentual de estrutura secundária da estrutura tridimensional, este foi obtido usando o algoritmo DSSP (Kabsch e Sander, 1983).

Tabela 4. Condições experimentais da CauSMT e AfSMT em diferentes pHs para análise de dicroísmo circular.

Proteína	Concentração	Tampão
AfSMT	1 μ M	Acetato de Sódio 250 μ M pH 5,6, Glicerol 0,015%, Triton X-100 0,005%
	1,13 μ M	Tris 510 μ M pH 7,6, Glicerol 0,03% e Triton X-100 0,01%
	1,67 μ M	Borax 540 μ M pH 9,6, Glicerol 0,03%, Triton X-100 0,01%
CauSMT	1,49 μ M	Acetato de Sódio 440 μ M pH 5,6, Glicerol 0,02% e Triton X-100 0,008%
	1,63 μ M	Tris 460 μ M pH 7,6, Glicerol 0,02% e Triton X-100 0,009%
	2,16 μ M	Borax 540 μ M pH 9,6, Glicerol 0,03%, Triton X-100 0,01%

Os ensaios de estabilidade térmica da CauSMT e da AfSMT foram conduzidos em diferentes pHs: 5,6, 7,6 e 9,6. As estabilidades nesses pHs foram avaliadas monitorando mudanças na elipticidade em 222 nm em temperaturas

variando entre 25 e 90 °C com velocidade de aquecimento de 1°C/min. Os espectros dicróicos foram coletados a cada 10 °C, na faixa de 200-260 nm (regiões far-UV) com um intervalo de aquisição de dados 0,1 nm. As temperaturas de transição entre o estado nativo e desnaturado (T_m) da CauSMT e da AfSMT nos diferentes pHs testados foram estimadas pelo ajuste sigmoidal das curvas de desnaturação utilizando a equação Boltzmann do programa OriginPro 2023.

4.16.2 Análise de sequências e predição da estrutura tridimensional e dos oligômeros de CauSMT e AfSMT

Os alinhamentos múltiplos foram realizados por meio do Clustal Omega (Larkin *et al.*, 2007). A matriz de identidade de sequências foi determinada usando o programa Clustal 2.1. Para a melhor visualização, um *heat map* foi construído por meio do programa OriginPro 2023 (Microcal Software Inc., USA). A descrição da estrutura secundária e figura do alinhamento múltiplo foi obtida usando o software ESPript v. 3.0 (Robert e Gouet, 2014).

As predições das estruturas tridimensionais de CauSMT e AfSMT foram realizadas pelo AlphaFold usando a plataforma ColabFold disponível no Google Laboratory (Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022). As estruturas oligoméricas de ambas as proteínas foram preditas pelo AlphaFold-Multimer (Evans *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022). As melhores estruturas foram escolhidas pelo AlphaFold em que se baseia em dados como em pontuações do teste de diferença de distância local prevista por resíduo e global (pLDDT) e o erro médio previsto (PAE). As representações gráficas das estruturas de proteínas mostradas neste trabalho foram geradas pelo programa PyMOL e UCSF ChimeraX (Pettersen *et al.*, 2004; DeLano, 2008; Goddard *et al.*, 2018).

4.16.3 Docking molecular de CauSMT e AfSMT com os substratos e inibidor

O processo de docagem envolveu a utilização de dois programas distintos, GOLD e o AutoDocking Vina (Jones *et al.*, 1997; Trott e Olson, 2010). Ambas as proteínas e os seus respectivos ligantes foram docados utilizando o programa GOLD, entretanto os resultados de CauSMT não foram compatíveis com o

esperado quando comparado aos dados experimentais descritos na literatura.

O outro programa utilizado para as análises de docking para CauSMT foi o AutoDock Vina (Trott e Olson, 2010). Antes de se realizar esse experimento *in silico* preparou-se tanto a proteína quanto o ligante para a corrida, para isso utilizou-se o pacote MGLTools. Para preparar as coordenadas, foram retiradas todas as moléculas de água e ligantes da estrutura da proteína, e adicionaram-se os hidrogênios polares que não estavam presentes no arquivo do PDB. A seguir, definiu-se a área em que foi feita a procura das poses (grid box), em outras palavras, a região em que o ligante deve interagir center (x = 0.000, center_y = 0.000, center_z = -8.034, size_x = 40, size_y = 40, size_z = 40), a qual compreende toda a região do sítio ativo. Para realização dos experimentos selecionou-se um valor de exhaustiveness, num_modes e energy_range para 256, 20 e 10, respectivamente. As representações gráficas das estruturas de proteínas mostradas neste trabalho foram geradas pelo programa PyMOL (DeLano, 2008).

4.16.4 Cristalização da CauSMT e da AfSMT

A primeira etapa de triagem das condições de cristalização das proteínas CauSMT e AfSMT foram realizadas pelo método de difusão de vapor de gota pendurada (*hanging drop*) e de gota sentada (*sitting drop*). Para isto foram testados inicialmente cinco kits: JBScreen Membrane (Jena Bioscience), JCSG Plus (Molecular Dimensions), Morpheus (Molecular Dimensions) e Crystal Screen (Hampton Research). As microplacas continham 100 µL de cada uma das 96 soluções de cristalização de cada kit que diferenciam entre si pelos agentes precipitantes e concentrações; tampões, pHs e concentrações e agentes aditivos e concentrações.

As proteínas contidas em tampão Tris 75 mM pH 7,6, 150 mM NaCl, 1,3% Triton e 5% glicerol foram testadas nas concentrações listadas na tabela 5.

Tabela 5. Concentrações de CauSMT, AfSMT e SAM utilizadas na etapa de triagem das condições de cristalização.

	Proteína	Ligante
Cristalização	CauSMT	-
	[6,41 mg/mL]	
	AfSMT	-
	[7,63 mg/mL]	
Cocristalização	CauSMT	SAM
	[5,93 mg/mL]	[82,8 uM]
	CauSMT	Zimosterol
	[5,93 mg/mL]	[369,4 uM]
	AfSMT	SAM
	[7,30 mg/mL]	[37,3 uM]

Para os ensaios de cocristalização, as proteínas foram incubadas previamente com os ligantes por 2h a 4 °C. As concentrações dos ligantes para a cocristalização foram definidas como sendo 10 ou 20x a constante de afinidade das proteínas por seus substratos. Gotas de 300 e 450 nL foram obtidas nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1 (proteína/solução de cristalização) utilizando o robô de cristalização Labtech's Mosquito® Crystal. As microplacas foram analisadas periodicamente em lupa (modelo SM DIA STAND2 Nikon®) para a verificação do surgimento de cristais.

Após a obtenção de cristais de CauSMT cocristalizado com SAM no *screening*, as etapas de refinamento das condições de cristalização foram realizadas por meio do método de difusão de vapor em gota sentada, em placas de 24 poços, variando-se o pH, concentração do agente precipitante e concentração da proteína no poço. O volume total de cada gota foi de 4 µL, sendo que no qual foram testadas proporções de 1:1 e 2:1 da proteína e da solução de cristalização. O volume da solução de cristalização utilizado em cada poço foi de 500 µL. As placas foram analisadas periodicamente em lupa (modelo SM DIA STAND2 Nikon®) para a verificação do surgimento de cristais.

Além disso, ensaios de cristalização utilizando o método de *microbatch* foram realizados. Esse método consiste na adição da gota com a solução de cristalização em uma camada de óleo. A técnica é usada para variar a taxa da difusão de vapor usando diferentes proporções de óleo de parafina e de silicone (Chayen, 1997). Para o ensaio, 50 µL de óleo de parafina/silicone na proporção 1:1 foram adicionadas no reservatório e a este foi adicionado a gota de 4uL na

proporção 1:1 da proteína e da solução de cristalização. A microplaca utilizada nesse experimento foi a de 96 poços fundo redondo e o kit de condições de cristalização foi o JCSG Plus (Molecular Dimensions). As proteínas contidas em tampão Tris 75 mM pH 7,6, 150 mM NaCl, 1,3% Triton e 5% glicerol foram testadas nas concentrações listadas na tabela 6.

Tabela 6. Concentrações de CauSMT, AfSMT, SAM e zimosterol utilizadas no ensaio de *microbatch*.

	Proteína	Ligante
Cristalização	CauSMT [6,15 mg/mL]	-
	AfSMT [6,15 mg/mL]	-
Cocristalização	CauSMT [5,4 mg/mL]	Zimosterol [283,5 uM]
	AfSMT [5,93 mg/mL]	SAM [37,3 uM]

Outra etapa de triagem das condições de cristalização da proteína AfSMT e a cocristalização com o substrato SAM foram realizadas pelo método de difusão de vapor de gota sentada (*sitting drop*). Para isto foram testados os kits: PactPremier (Molecular Dimensions), JCSG Plus (Molecular Dimensions) e Morpheus (Molecular Dimensions). Os parâmetros de cocristalização e obtenção da gota foram os mesmos descritos previamente para a primeira etapa de triagem. As proteínas contidas em tampão Tris 75 mM pH 7,6, 150 mM NaCl, 1,3% Triton e 5% glicerol foram testadas nas concentrações listadas na tabela 7.

Tabela 7. Concentrações de AfSMT e SAM utilizadas na etapa de triagem das condições de cristalização.

	Proteína	Ligante
Cristalização	AfSMT [5,43 mg/mL]	-
Cocristalização	AfSMT [5,43 mg/mL]	SAM [37,3 uM]

4.16.5 Coleta de dados de difração de raios X

Os cristais da proteína CauSMT e AfSMT com e sem o SAM foram analisados por difração de raios X na linha de luz Manacá, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Sirius) (Campinas -São Paulo). Para proteger os cristais durante a difração, eles foram imersos em uma solução crioprotetora preparada com base na solução de cristalização da proteína, acrescida de 20% de glicerol. Os cristais foram removidos das gotas utilizando um *loop*, colocados em *pucks* e armazenados em nitrogênio líquido até serem transferidos para a linha de difração, onde foram expostos aos raios X sob um fluxo contínuo de nitrogênio a 100 K. O detector PILATUS2M® foi utilizado para capturar imagens. O processamento de dados foi feito com o programa XDS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de *Escherichia coli*

As cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, BL21 (DE3) PlysS, Lemo21 (DE3) e pGro (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET28a-CauSMT e pET28a-AfSMT foram induzidas com IPTG 1 mM e incubadas a 37 °C. As amostras foram coletadas após 6 h da indução. Na figura 11 pode se observar por meio do perfil de proteínas totais da *E. coli* que as proteínas heterólogas foram produzidas em todas as cepas, exceto em BL21 (DE3) pLysE, correspondendo ao tamanho aproximado de 44,5 kDa para CauSMT e 44,3 kDa para AfSMT.

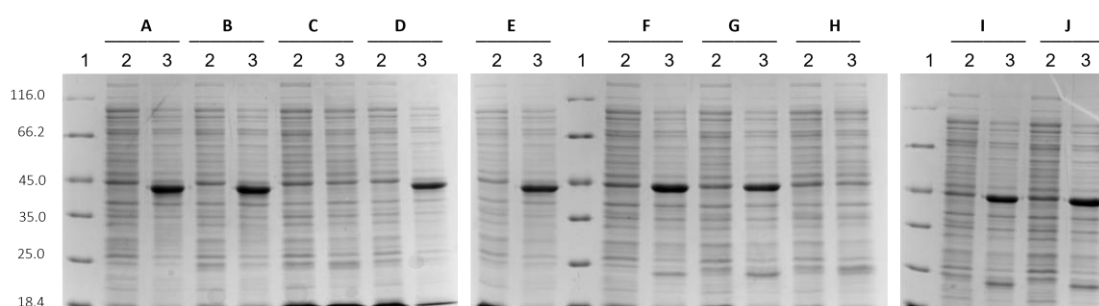


Figura 11. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio LB. 1: Marcador de massa molecular. 2: Perfil de PT antes da indução. 3: Perfil de PT após a indução. **A:** AfSMT em BL21 (DE3). **B:** AfSMT em BL21 (DE3) PlysS. **C:** AfSMT em BL21 (DE3) pLysE. **D:** AfSMT em Lemo21 (DE3). **E:** AfSMT em pGro (DE3). **F:** CauSMT em BL21 (DE3). **G:** CauSMT em BL21 (DE3) PlysS. **H:** CauSMT em BL21 (DE3) pLysE. **I:** CauSMT em Lemo21 (DE3). **J:** CauSMT em pGro (DE3).

5.2 Teste de Solubilidade da CauSMT e da AfSMT

Para avaliar a solubilidade das proteínas, os cultivos de cepas de *E. coli* transformadas com plasmídeo pET28a-CauSMT e pET28a-AfSMT que produziram as respectivas enzimas foram lisadas e centrifugadas. Em seguida, os precipitados celulares e sobrenadantes resultantes foram analisados em SDS PAGE 12%. Percebe-se que maior parte da proteína de interesse forma corpos de inclusão, ou seja, está presente na fração insolúvel (Figura 12).

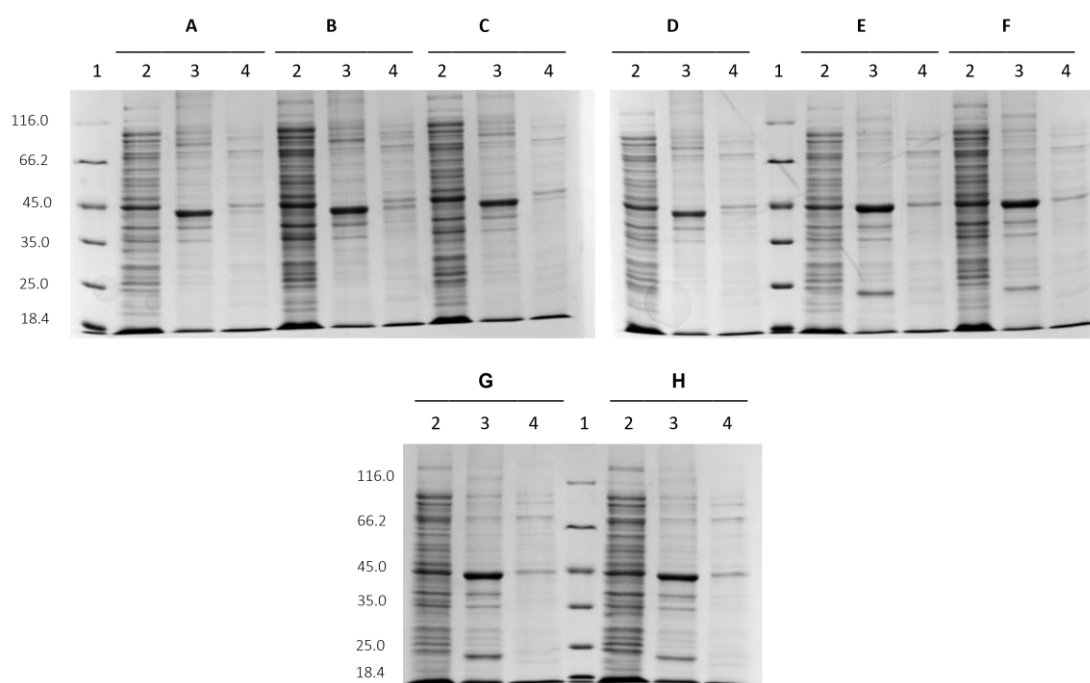


Figura 12. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio LB. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Perfil de PT antes da indução. **3:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **4:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **A:** AfSMT em pGro (DE3). **B:** AfSMT em BL21 (DE3). **C:** AfSMT em Lemo21 (DE3). **D:** AfSMT em BL21 (DE3) PlysS. **E:** CauSMT em pGro (DE3). **F:** CauSMT em BL21 (DE3). **G:** CauSMT em Lemo21 (DE3). **H:** CauSMT em BL21 (DE3) PlysS.

5.3 Otimização da produção da CauSMT e da AfSMT

Diante dos resultados anteriores, foi realizada a otimização da produção de CauSMT e AfSMT alterando-se o meio de cultura usado durante a produção. Neste caso, utilizou-se o meio auto-indutor visando obter alguma condição de expressão onde a CauSMT e AfSMT fosse produzida na fração solúvel. Este meio de cultura não possui a presença da molécula análoga de alolactose, o IPTG. A expressão ocorre através da redução dos níveis de glicose e a ativação do operon Lac pela presença de lactose, o que leva ao consequente desacoplamento do repressor Lac que bloqueava a região promotora do operon em questão. Este meio, em geral, apresenta maior produção da proteína alvo e densidade celular por volume de cultura. Além disso, ele possui menor taxa de formação de corpos de inclusão, possivelmente devido a uma taxa de crescimento mais lenta (Studier, 2005; Faust, Stand e Weuster-Botz, 2015; Krause, Neubauer e Neubauer, 2016).

As cepas de BL21 (DE3) PlysS e *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET28a-CauSMT e pET28a-AfSMT foram cultivadas em meio auto-indutor e amostras foram coletadas após 16h. Na figura 13 pode se observar por meio do perfil de proteínas totais da *E. coli* que as proteínas heterólogas foram produzidas em todas as cepas, correspondendo ao tamanho aproximado de 44,5 kDa para CauSMT e 44,3 kDa para AfSMT. Para avaliar a solubilidade das proteínas, os precipitados celulares resultantes dos cultivos foram lisados e centrifugados e analisados em SDS PAGE 12%. Observa-se que a CauSMT foi produzida na colônia 1 da cepa BL21 (DE3). A AfSMT foi produzida na colônia 1 da cepa BL21 (DE3) e na colônia 1 da cepa BL21 (DE3) PlysS. Entretanto, apesar de ambas as proteínas de interesse estarem presentes na fração solúvel, boa parte ainda forma corpos de inclusão.

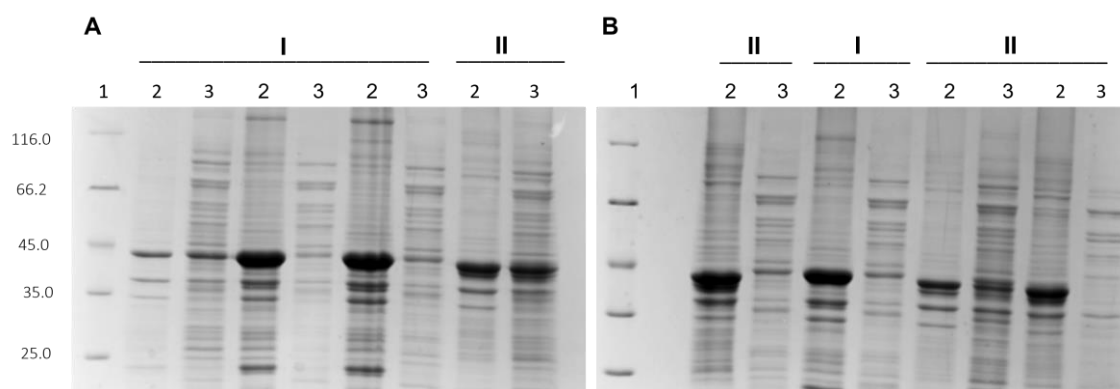


Figura 13. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio ZYM-5052. 1: Marcador de massa molecular. 2: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 3: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). (A) I: CauSMT em BL21 (DE3), colônia 1, 2 e 3. II: AfSMT em BL21 (DE3), colônia 1. (B) II: AfSMT em BL21 (DE3), colônia 2. I: CauSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônia 1. II: AfSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônias 1 e 2.

Diante desses resultados, outra otimização da produção de CauSMT e AfSMT foi realizada. Neste ensaio foi então utilizado o meio de cultura mínimo MDG na transformação das cepas e no pré-inóculo, ou seja, foi excluído totalmente o meio LB nessas etapas iniciais da expressão heteróloga. Como pode ser observado na figura 14, as proteínas de interesse foram produzidas em todas as colônias das cepas testadas. Além disso, nesse ensaio, observa-se que houve maior rendimento das proteínas nas frações solúveis quando comparado

às condições de expressão anteriores. As cepas/colônias com melhores resultados foram a AfSMT em BL21 (DE3) colônias 1 e 3, CauSMT em BL21 (DE3) colônias 2 e 3 e CauSMT em BL21 (DE3) PlysS colônia 3.

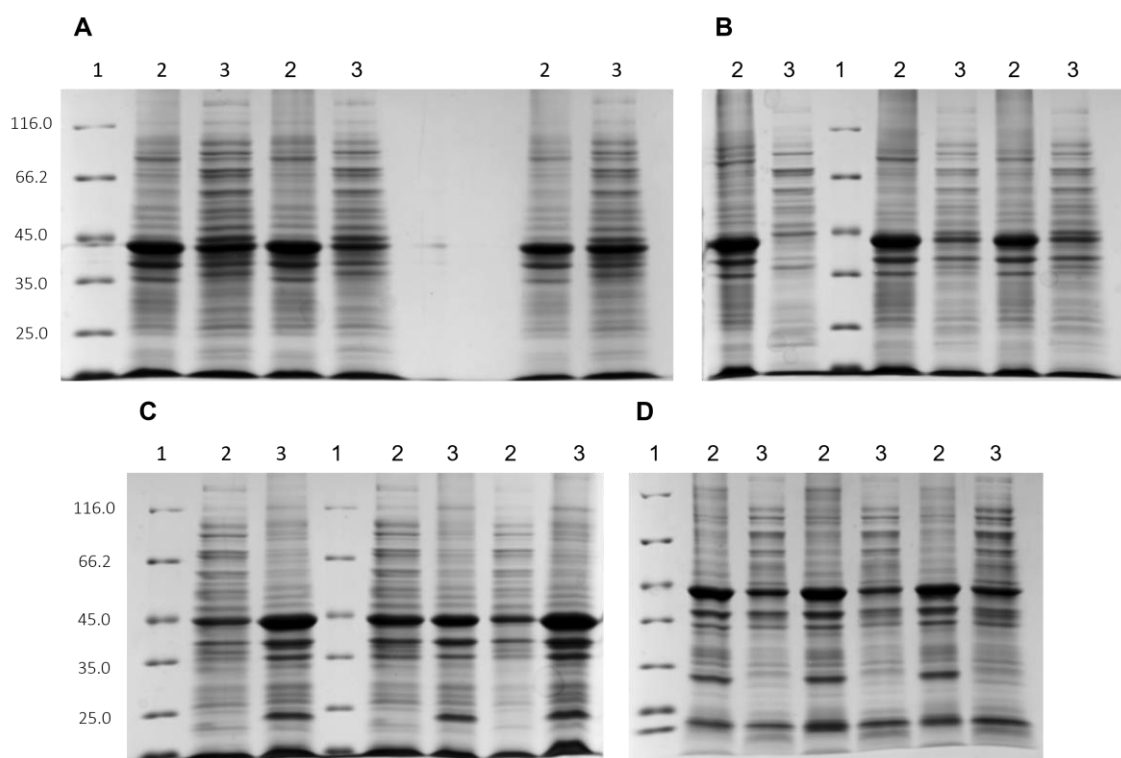


Figura 14. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais (PT) obtidas a partir da inoculação das células de *E.coli* transformadas em meio MDG e a produção heteróloga da CauSMT e AfSMT em meio ZYM-5052. 1: Marcador de massa molecular. 2: Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). 3: Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **(A)** AfSMT em BL21 (DE3), colônias 1, 2 e 3. **(B)** AfSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônias 1, 2 e 3. **(C)** CauSMT em BL21 (DE3), colônias 1, 2 e 3. **(D)** CauSMT em BL21 (DE3) PlysS, colônia 1, 2 e 3.

Os meios de cultura contendo peptona e caseína, como o meio LB, são extensivamente utilizados porque possibilitam o crescimento de diversas cepas de *E. coli* com diferentes necessidades nutricionais, e as culturas geralmente crescem duas a três vezes mais rápido do que em meios mínimos (Studier, 2005). Entretanto, o pré-inóculo realizado nesses meios de cultura contém traços de lactose e podem causar a indução precoce da proteína de interesse, como observado na figura 11. A expressão basal não controlada pode afetar o crescimento celular e diminuir o rendimento da produção da proteína de interesse.

Não foram encontrados relatos na literatura em que a CauSMT e a AfSMT são proteínas tóxicas para *E. coli*, no entanto estas parecem se comportar como tal, onde o meio mínimo MDG, que não contém traços de lactose e que possui sais minerais com glicose como fonte de carbono, proporcionou o crescimento lento e a não expressão basal resultando no aumento da solubilidade das proteínas de interesse.

5.4 Produção heteróloga da CauSMT e da AfSMT em sistema de expressão de *Escherichia coli* e purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

Após a otimização da produção da CauSMT e da AfSMT descrita no item anterior, uma colônia de cada cepa de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeos pET28a-CauSMT e pET28a-AfSMT foram cultivadas em 500 mL de meio auto-indutor, correspondendo a 2% da capacidade do frasco utilizado. Como pode ser observado na figura 15 e 16, ambas as proteínas formaram corpos de inclusão, ou seja, estão presentes na fração insolúvel.

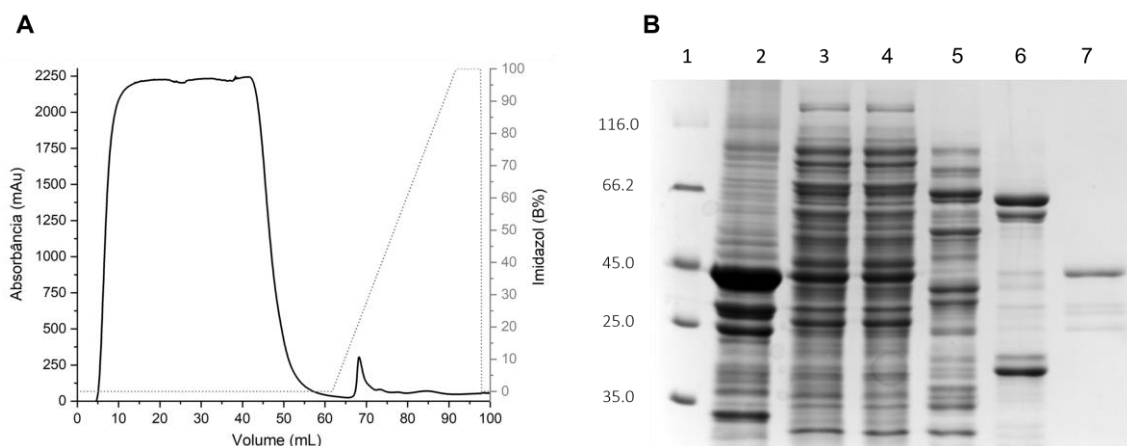


Figura 15. Purificação da CauSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais do processo de purificação da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** Flow through. **5,6 e 7:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol.

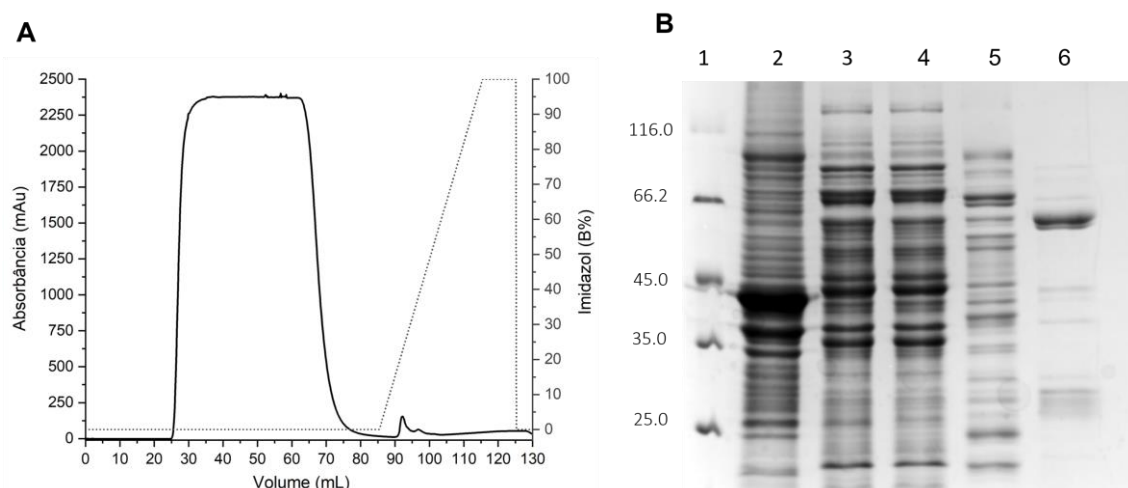


Figura 16. Purificação da AfSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais do processo de purificação da AfSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5 e 6:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol.

As proteínas insolúveis formando agregados são chamadas de corpos de inclusão, com perda de conformação da proteína. Os principais fatores que contribuem para a formação de corpos de inclusão em *E. coli* são super expressão de proteínas, altos percentuais de pontes dissulfeto exigidos para a manutenção da estrutura nativa, esgotamento de chaperonas e proteínas com alto grau de hidrofobicidade (Idicula-Thomas e Balaji, 2005).

Além disso, alguns dos fatores limitantes para a produção de proteína em meio de cultura de alta densidade celular é a aeração, onde conforme o número de células crescem por litro, a disponibilidade de oxigênio se torna um fator importante que pode influenciar no crescimento (O'Beirne e Hamer, 2000). A limitação de oxigênio induz a expressão de mais de 200 genes em uma tentativa de ajustar as capacidades metabólicas da célula à disponibilidade de oxigênio, o que impede o crescimento ideal do cultivo (Unden *et al.*, 1995).

De acordo com Konz e colaboradores, a baixa aeração pode diminuir a capacidade metabólica da célula, como por exemplo, do ciclo do ácido cítrico, causando a alteração da biossíntese podendo afetar o enovelamento da proteína (Konz, King e Cooney, 1998).

Para avaliar o efeito da aeração na solubilidade da CauSMT e da AfSMT, novos cultivos foram realizados, sendo o volume correspondente a 10% da

capacidade do frasco. Como pode ser observado na figura 17B e 18B, a presença de grande parte de CauSMT e AfSMT na fração solúvel.

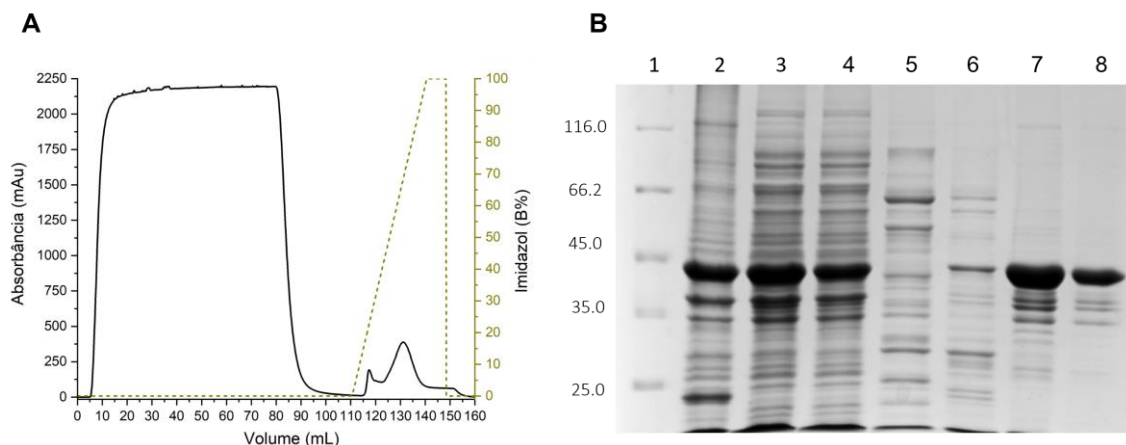


Figura 17. Purificação da CauSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5 e 6:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. **7 e 8:** Frações contendo a CauSMT purificada.

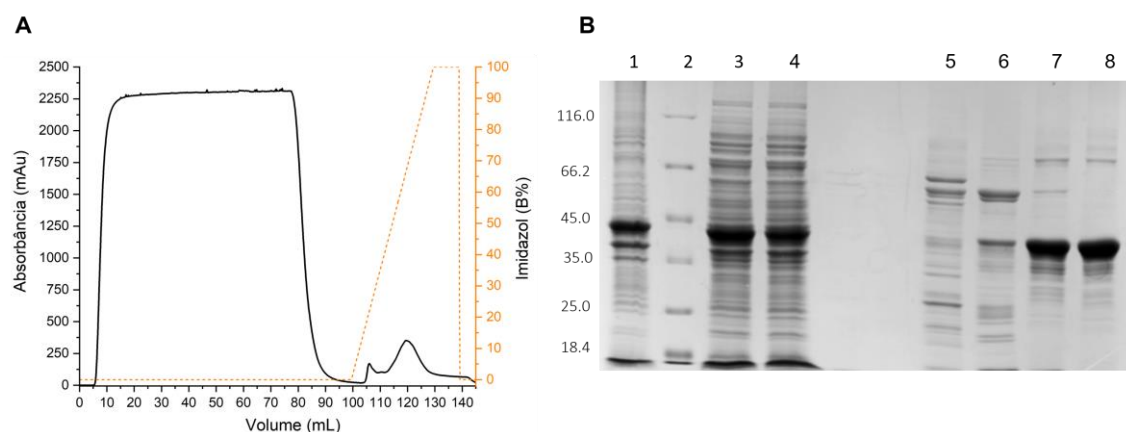


Figura 18. Purificação da AfSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da AfSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5 e 6:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. **7 e 8:** Frações contendo a AfSMT purificada.

O segundo pico de eluição, em 342,5 mM de imidazol, corresponde a CauSMT (Figura 17A). O perfil da proteína do pico foi analisado em SDS PAGE

12% podendo ser observado que a proteína está parcialmente pura no poço 7 e 8 (Figura 17B). Similarmente, na figura 18A, observa-se o segundo pico de eluição, em 336,5 mM de imidazol, corresponde a AfSMT. O perfil da proteína do pico foi analisado em SDS PAGE 12% podendo ser observado que a proteína está parcialmente pura no poço 7 e 8 (Figura 18B). Nota-se que ambas as proteínas apresentaram interação forte com a coluna de afinidade.

5.5 Imunodeteção da CauSMT e da AfSMT por Western Blot

Como descrito no item 4.1, os genes de CauSMT e AfSMT foram clonados em pET28a que possuem uma sequência para a síntese de uma cauda com seis histidinas (His_{6x}) que possibilitam a purificação por cromatografia de afinidade por íons imobilizados. Com o objetivo de confirmar se as proteínas produzidas eram as de interesse, o ensaio de Western Blot foi realizado. Como mostra a Figura 19, ambas as proteínas foram detectadas apresentando o tamanho aproximado de 44,5 kDa para CauSMT e 44,3 kDa para AfSMT.

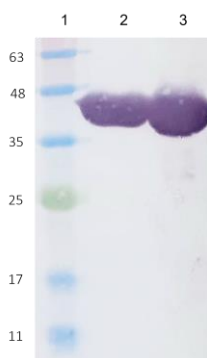


Figura 19. Imunodeteção das proteínas (Western Blot) usando anticorpo anti-His-tag. 1: Marcador de massa molecular. 2: CauSMT. 3: AfSMT.

5.6 Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Utilizando as proteínas parcialmente puras obtidas a partir da cromatografia de afinidade foi realizado um novo passo de purificação por SEC. Na figura 20A, observa-se que um único pico foi eluído e que este é corresponde a CauSMT parcialmente purificada. A massa molecular estimada pela curva de calibração foi de 658 kDa (Figura 20B). Similarmente, na figura 21A, observa-se que um único pico foi eluído e que este é corresponde a AfSMT parcialmente purificada.

A massa molecular estimada pela curva de calibração foi de 650 kDa (Figura 21B).

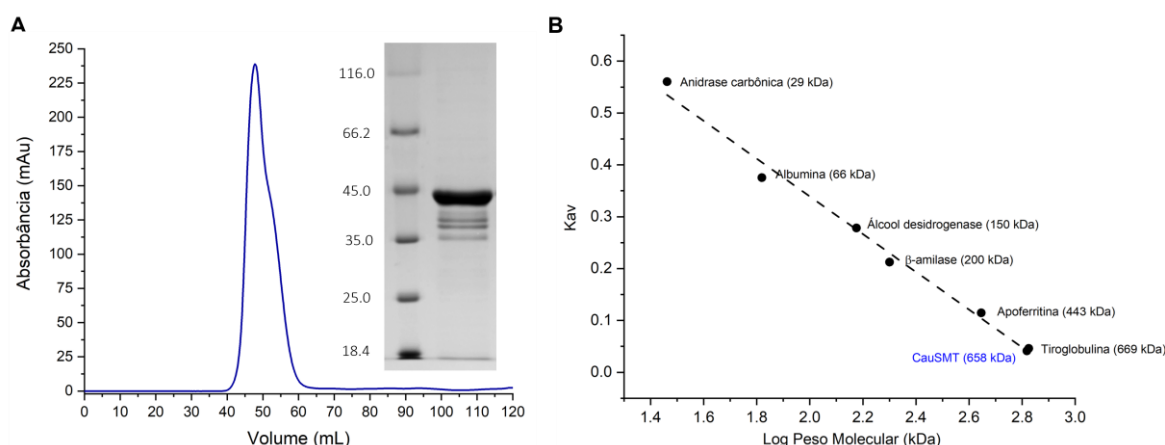


Figura 20. Purificação de CauSMT por SEC. **A)** Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da CauSMT pós purificação. **B)** Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.

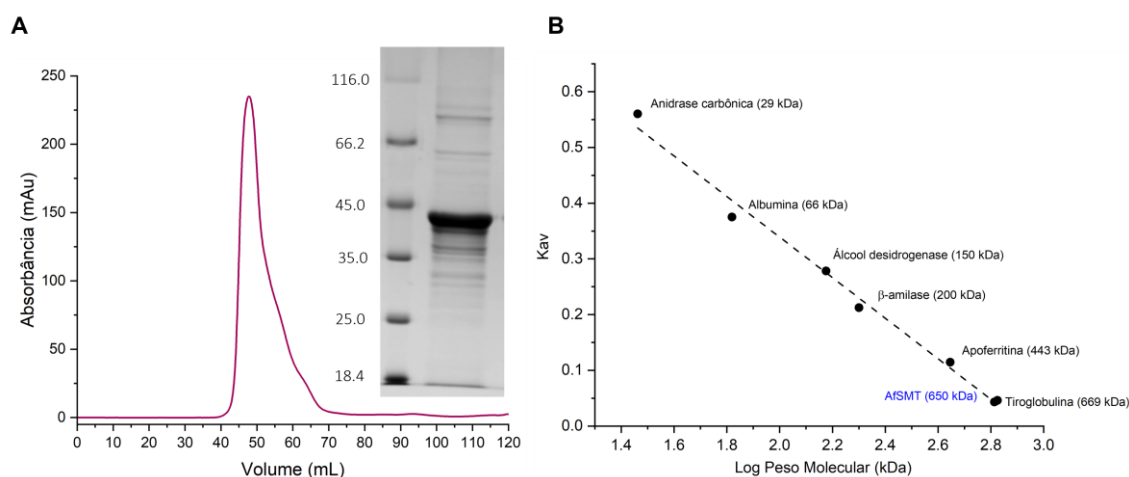


Figura 21. Purificação de AfSMT por SEC. **A)** Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da AfSMT pós purificação. **B)** Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.

5.7 Otimização da purificação

5.7.1 Purificação da CauSMT e da AfSMT por cromatografia de troca iônica (IEX)

Diante dos resultados de purificações parciais já apresentados, diversas tentativas de otimizações da purificação de CauSMT e AfSMT foram realizadas, como recromatografias de afinidade dos picos eluídos da SEC ampliando o

gradiente de imidazol e/ou fazendo lavagens extensas em etapas com imidazol (dado não divulgado), mas o perfil proteico apresentado no SDS-PAGE foi o mesmo em todos os ensaios.

Diante disso, outro método de purificação foi realizado para ambas as proteínas correspondendo a cromatografia de troca aniônica. Observa-se nas figuras 22 e 23, que o perfil da purificação de CauSMT e AfSMT permaneceu inalterado.

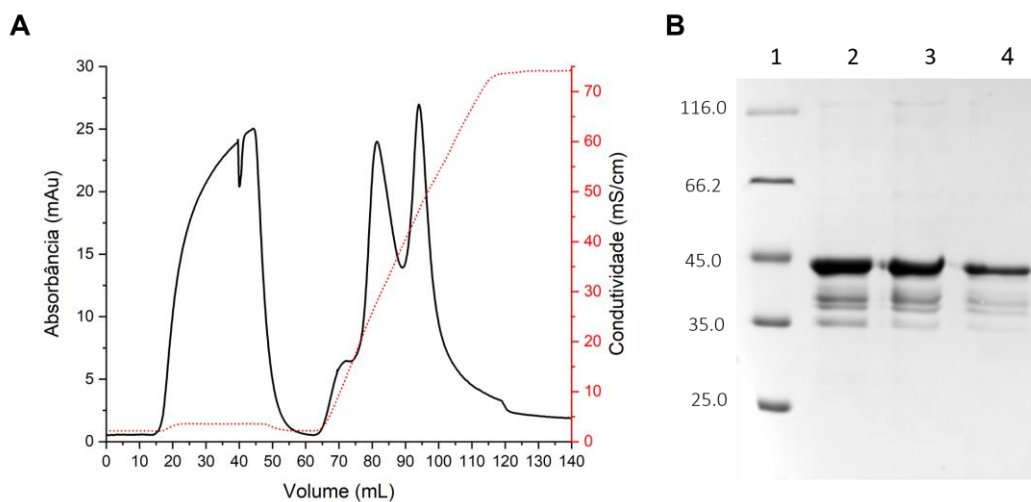


Figura 22. Purificação da CauSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de troca iônica. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas obtidas durante o processo de purificação da CauSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: *Flow through*. 3 e 4: Frações eluídas durante o gradiente de NaCl.

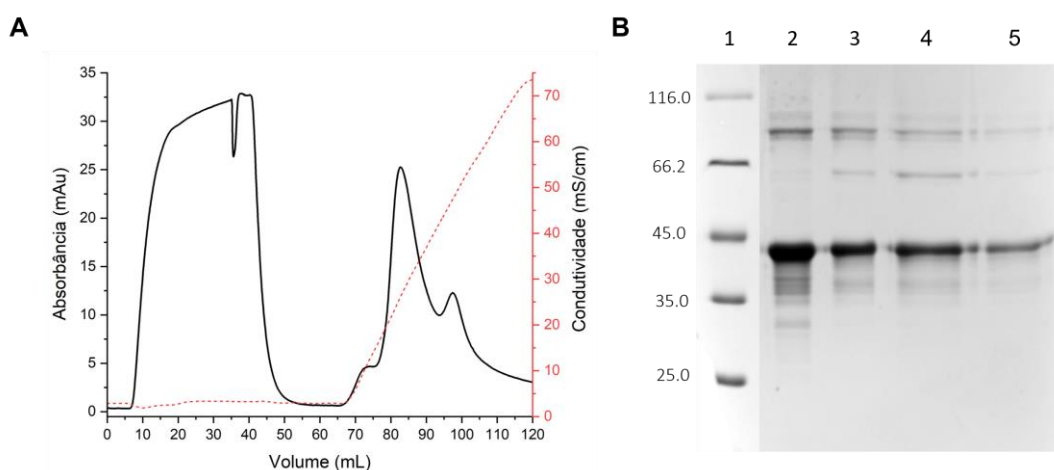


Figura 23. Purificação da AfSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de troca iônica. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas obtidas durante o processo de purificação da AfSMT. 1: Marcador de massa molecular. 2: *Flow through*. 3 e 4: Frações eluídas durante o gradiente de NaCl.

5.7.2 Purificação da CauSMT por IMAC na presença de inibidores de proteases

A fim de se verificar se as quatro bandas menores de 44 kDa observadas no SDS-PAGE de CauSMT poderiam ser resultado de degradação por proteases, foi realizada a cromatografia de afinidade na presença de quatro inibidores de proteases: aprotinina (inibidor de serino protease), pepstatina (inibidor de aspartil protease), leupeptina (inibidor de tripsina-like e cisteíno proteases) e PMSF (inibidor de serino proteases). Observa-se na figura 24, que as frações eluídas apresentam o mesmo padrão das purificações anteriores. Portanto, as bandas menores de 44 kDa observadas nas frações eluídas em todas as purificações realizadas, não são resultantes de degradação.

Considerando que a sequência primária da CauSMT possui 3 resíduos de cisteína em sua composição e que estes não formam pontes dissulfeto. Foi considerado que provavelmente as Cys presentes na superfície da proteína poderiam interagir com proteínas de *E. coli* durante a expressão heteróloga. Assim, foi realizado uma cromatografia de afinidade na presença de agente redutor. Entretanto, o resultado mostrou inalteração do perfil proteico da purificação, permanecendo similar às purificações anteriores (dado não divulgado).

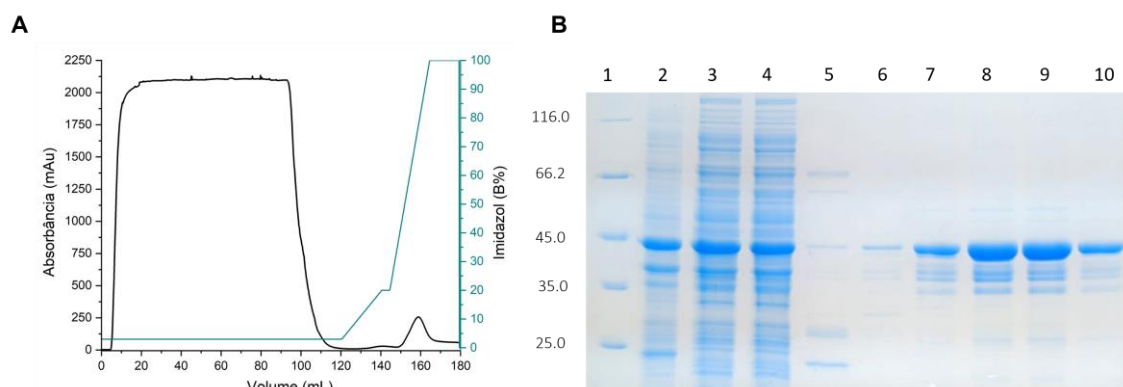


Figura 24. Purificação da CauSMT na presença de inibidores de proteases. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** Flow through. **5 e 6:** Frações eluídas durante o gradiente de imidazol. **7, 8, 9 e 10:** Frações contendo a CauSMT purificada.

5.7.3 Purificação da CauSMT por ultrafiltração

A CauSMT em Tris 75 mM pH 7,6, NaCl 300 mM, glicerol 5% apresentou mesmo padrão no SDS-PAGE pós purificações por afinidade, por exclusão molecular, por troca iônica, na presença de agente redutor e com inibidores de proteases. Além disso, o ensaio por ultrafiltração mostrou que as proteínas menores de 44 kDa não foram eluidas mesmo usando membrana de *cut-off* de 100 kDa (Figura 25). Portanto, inferiu-se a possível formação de hetero-oligômero de alta massa molecular (673 kDa) da CauSMT (44,5 kDa) com proteínas de *E.coli*, além da ausência de pontes dissulfeto e de interação eletrostática na estabilização do hetero-oligômero.

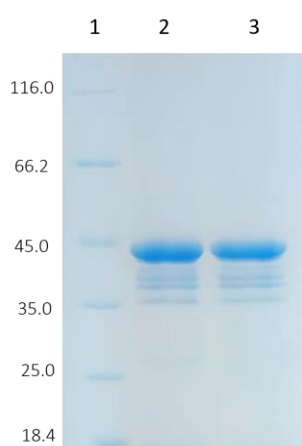


Figura 25. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil proteico da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Amostra de CauSMT após o processo de ultracentrifugação utilizando membrana com *cut-off* de 10 kDa. **3:** Amostra de CauSMT após o processo de ultracentrifugação utilizando membrana com *cut-off* de 100 kDa.

5.8 Análises de mudanças no estado oligomérico da CauSMT por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Diante dos resultados anteriores, foram realizados ensaios que consistiram na variação da concentração da proteína, na adição de diferentes concentrações de glicerol à proteína e na adição de diferentes concentrações dos detergentes CHAPS e Triton X-100 à proteína (Tabela 3), com o objetivo de observar o efeito desses aditivos no estado oligomérico da proteína. Diversas medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas a fim de obter dados estimado da massa molecular.

O glicerol tem um papel importante na estabilização da estrutura nativa das proteínas (Vagenende, Yap e Trout, 2009; Hirai *et al.*, 2018). Os detergentes como CHAPS (zwitteriônico) e Triton X-100 (não iônico) são comumente utilizados na solubilização de proteínas de membranas (Kalipatnapu e Chattopadhyay, 2005).

Na tabela 8 observa-se a massa molecular estimada em kDa para CauSMT na presença dos aditivos. Não houve mudanças no estado oligomérico da CauSMT quando se variou a concentração e nem na presença de diferentes concentrações de glicerol e CHAPS. Diferentemente, houve redução do estado oligomérico na presença de Triton X-100 (item 4). Observou-se também que o percentual mínimo do detergente em que a proteína mantém o menor estado oligomérico é 0,1%.

Tabela 8. Massa molecular estimada em kDa de CauSMT obtida por ensaios de DLS. **Condição 1:** Variação da concentração da proteína (1.1: 1,4 mg/mL, 1.2: 0,7 mg/mL, 1.3: 0,35 mg/mL e 1.4: 0,08 mg/mL). **Condição 2:** Concentração de glicerol (2.1: Glicerol 10% e 2.2: Glicerol 20%). **Condição 3:** Concentração de CHAPS (3.1: Glicerol 20% + CHAPS 1% e 3.2: Glicerol 20% + CHAPS 4%) e **Condição 4:** Concentração de Triton X-100 (4.1: 0,5%) e **Condição 5:** 5.1: 0,05%, 5.2: 0,1%, 5.3: 0,3% e 5.4: 0,5%.

Condições	Variações das condições	[mg/mL]	Massa molecular (kDa)
1	1.1	1,4	$4,8 \times 10^3$
	1.2	0,7	$6,49 \times 10^3$
	1.3	0,35	$1,58 \times 10^4$
	1.4	0,08	$1,28 \times 10^3$
2	2.1	0,35	$1,07 \times 10^3$
	2.2		$6,06 \times 10^3$
3	3.1	0,35	$1,33 \times 10^3$
	3.2		$4,58 \times 10^5$
4	4.1	0,35	270,6
5	5.1	0,35	7×10^4
	5.2		109
	5.3		121,4
	5.4		131,6

O efeito hidrofóbico é a principal força atuante nas associações proteína-proteína durante a oligomerização das moléculas (Young, Jernigan e Covell, 1994; Tsai *et al.*, 1997). O resultado deste trabalho mostrou a importância das interações hidrofóbicas na estabilização da estrutura da CauSMT, sendo demonstrado a redução na massa molecular do oligômero com a adição do detergente Triton X-100. Este detergente é um surfactante não iônico que apresenta um grupo óxido polietileno hidrofílico e um hidrocarbono lipofílico, ou seja, um grupamento hidrofóbico que pode mimetizar as interações outrora existentes com as proteínas de *E. coli*.

5.9 Purificação da CauSMT e da AfSMT por IMAC na presença de aditivo

Com o dado da redução na massa molecular do oligômero com a adição de no mínimo 0,1% de Triton X-100, uma nova expressão foi realizada na condição otimizada e para a purificação, desde a etapa de lise, foi adicionado 0,1% de Triton X-100. O segundo pico de eluição, em 340 mM de imidazol, corresponde a CauSMT (Figura 26A). O perfil da proteína do pico foi analisado em SDS PAGE 12% podendo ser observado a proteína pura no poço 6 (Figura 26B). Similarmente, na figura 27A, observa-se o segundo pico de eluição, em 340 mM de imidazol, corresponde a AfSMT. O perfil da proteína do pico foi analisado em SDS PAGE 12% podendo ser observado a proteína pura no poço 6 (Figura 27B). Nota-se que ambas as proteínas apresentaram interação forte com a coluna de afinidade.

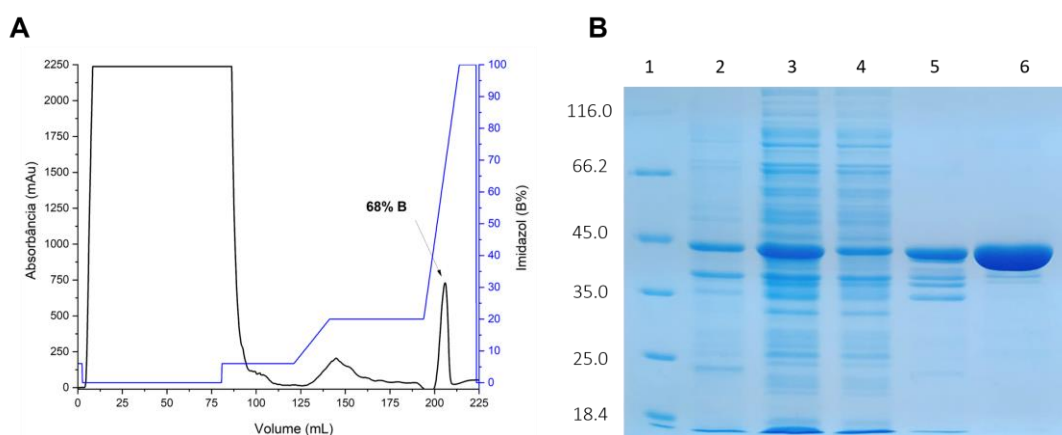


Figura 26. Purificação da CauSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de

proteínas totais e purificada do processo de purificação da CauSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5:** Fração eluída durante o gradiente de imidazol. **6:** Fração contendo a CauSMT purificada.

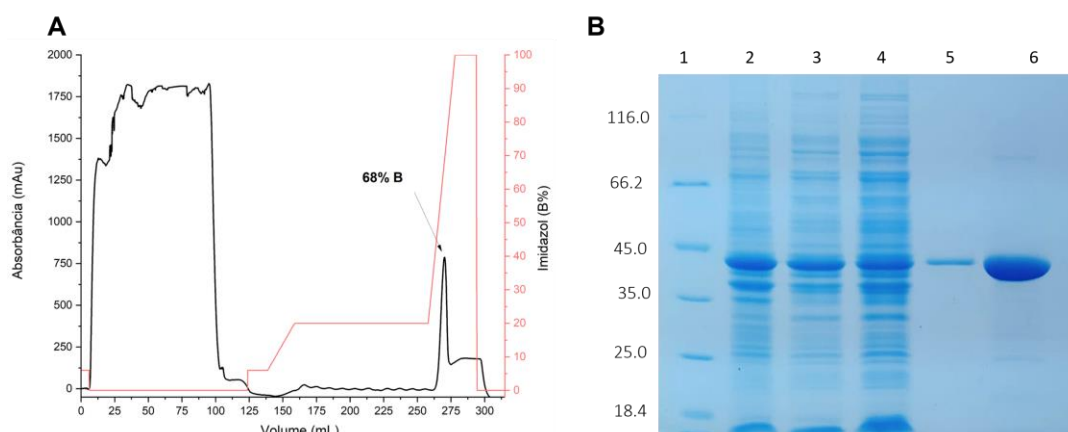


Figura 27. Purificação da AfSMT. **A)** Perfil cromatográfico da purificação na coluna de afinidade por íons metálicos imobilizados. **B)** Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil de proteínas totais e purificada do processo de purificação da AfSMT. **1:** Marcador de massa molecular. **2:** Precipitado celular das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração insolúvel). **3:** Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (fração solúvel). **4:** *Flow through*. **5:** Fração eluída durante o gradiente de imidazol. **6:** Fração contendo a AfSMT purificada.

A CauSMT e AfSMT pertencem a classe I da superfamília de metiltransferases dependentes de S-adenosil-L-metionina (Martin, 2002). Diversos estudos caracterizam as esterol metiltransferases (SMT) como proteínas associadas à membrana e que podem ser localizadas em diferentes frações subcelulares, incluindo o retículo endoplasmático e mitocôndria (Zinser, Paltauf e Daum, 1993; Nes, 2000, 2005; Pereira *et al.*, 2010). De acordo com David Nes (2000), as SMTs são instáveis e difíceis de purificar com um auto rendimento. O autor ainda destaca a importância da definição de condições de estabilização das SMTs (Nes, 2000).

Nesse trabalho, após diversas otimizações, a CauSMT e AfSMT foram purificadas com alto rendimento, estando elas estáveis.

5.10 Determinação do estado oligomérico da CauSMT e da AfSMT por SEC

As frações com a CauSMT e AfSMT puras foram utilizadas para o ensaio de SEC a fim de determinar o tamanho aproximado da massa molecular que

fornece dados para determinar o estado oligomérico de cada enzima. Na figura 28A, observa-se que um único pico foi eluído e que este corresponde a CauSMT pura. A massa molecular estimada pela curva de calibração foi de 234 kDa, correspondente a um pentâmero (Figura 28B). Similarmente, na figura 29A, observa-se que um único pico foi eluído e que este corresponde a AfSMT pura. A massa molecular estimada pela curva de calibração foi de 185 kDa, correspondente a um tetrâmero (Figura 29B).

Diversos estudos mostram que as SMTs são tetraméricas:

- *Candida albicans*: 178 kDa (Ganapathy *et al.*, 2011)
- *Saccharomyces cerevisiae*: 172 kDa*
- *Prototheca*: 154 kDa*
- *Arabidopsis thaliana*: 158 kDa*
- *Glycine max*: 161 kDa* * (Nes, 2000; Nes, Jayasimha e Song, 2008)

Nesse trabalho, foi determinado que a AfSMT é tetramérica e a CauSMT é pentamérica.

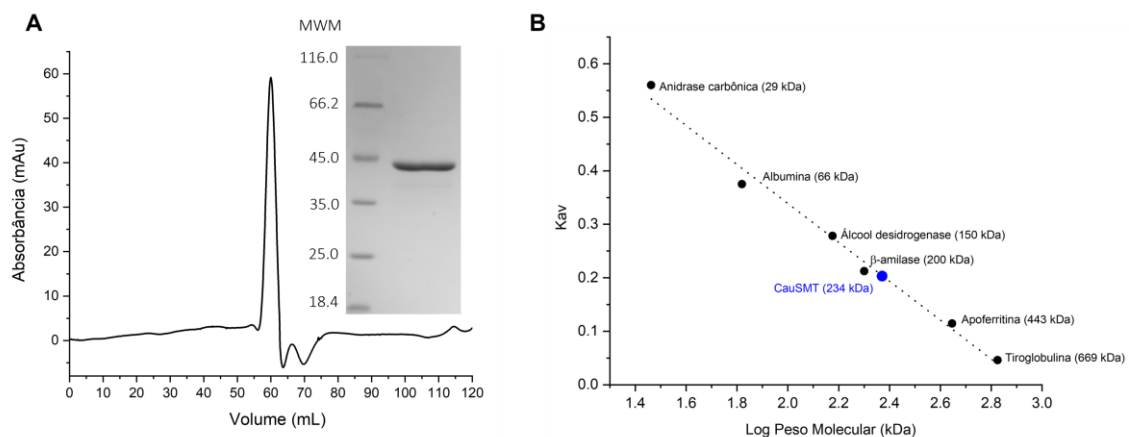


Figura 28. Purificação de CauSMT por SEC. **A:** Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da CauSMT pós purificação. **(B)** Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.

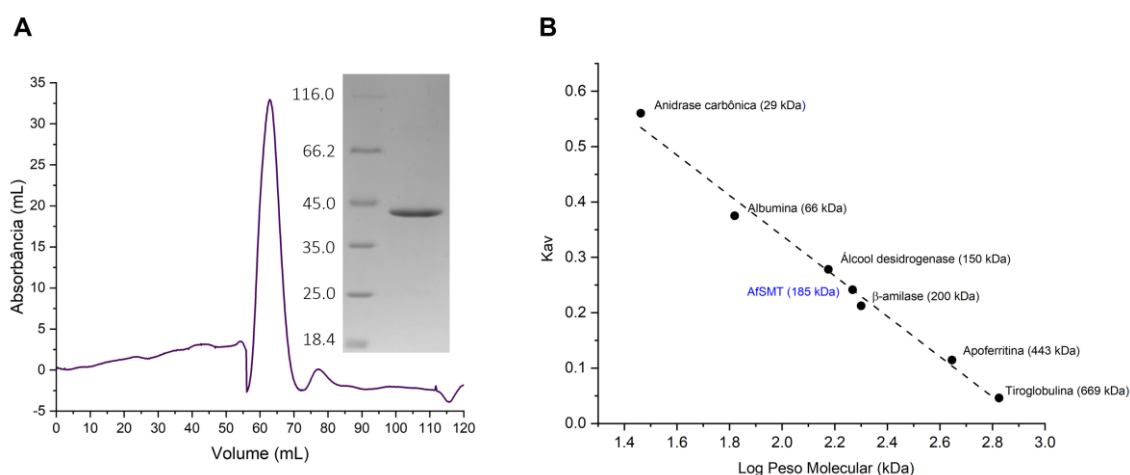


Figura 29. Purificação de AfSMT por SEC. **A:** Cromatograma da purificação mostrando o pico eluído. Análise em SDS PAGE 12% mostrando o perfil da AfSMT pós purificação. **(B)** Curva de calibração obtida a partir de proteínas com massa molecular definido.

5.11 Caracterização enzimática da CauSMT e da AfSMT

5.11.1 Determinação da especificidade em relação aos substratos esteróis

A fim de determinar qual via de biossíntese de ergosterol a CauSMT e AfSMT participavam, foi realizado o ensaio enzimático com cada enzima na presença de ambos os substratos. Como pode ser observado na figura 30A, a CauSMT tem preferência pelo substrato zimosterol quando comparado ao lanosterol. Diferentemente, a AfSMT tem maior atividade enzimática para o lanosterol e do que para o zimosterol (Figura 30B).

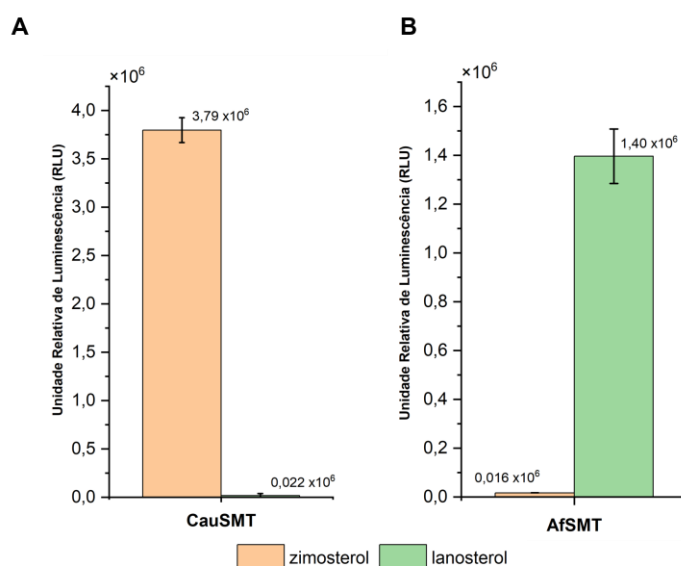


Figura 30. Identificação dos substratos esteróis utilizados pelas esterol C24-metiltransferases CauSMT **(A)** e AfSMT **(B)**.

Em *C. auris*, a biossíntese do ergosterol parece similar à que ocorre em *C. albicans*, onde lanosterol é primeiro desmetilado em quatro etapas enzimáticas que levam ao intermediário zimosterol e, em segundo lugar, um grupo metil é adicionado ao zimosterol pela estero 24-C-metiltransferase para formar fecosterol (Figuras 31 e 33) (Ganapathy *et al.*, 2011; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2013; Oliveira *et al.*, 2020).

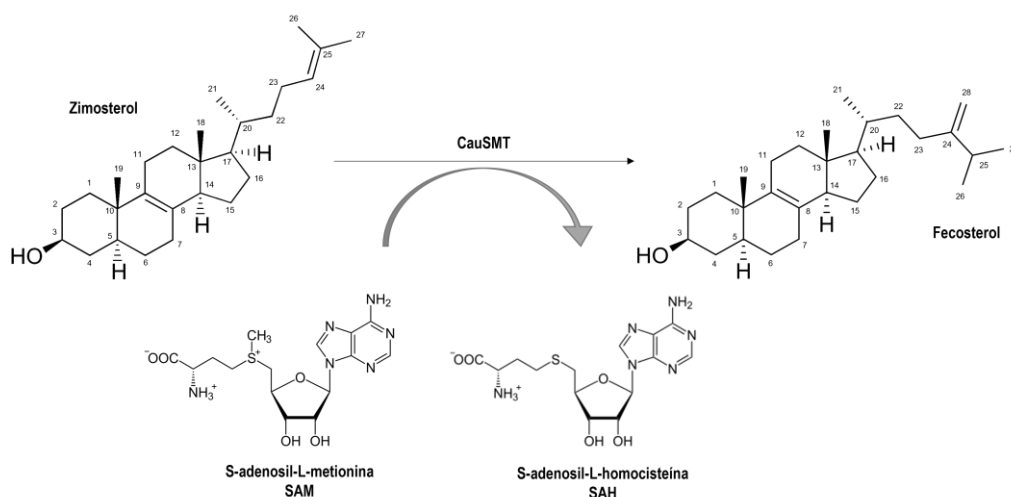


Figura 31: Reação de C-metilação catalisada pela CauSMT onde o zimosterol é o substrato aceptor formando o fecosterol.

Em *A. fumigatus*, a biossíntese do ergosterol difere de *S.cerevisiae* e *C. albicans* onde o lanosterol é primeiro transmetilado pela estero 24-C-metiltransferase levando ao intermediário eburicol e depois desmetilado em três etapas para formar fecosterol (Figuras 32 e 33) (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2013).

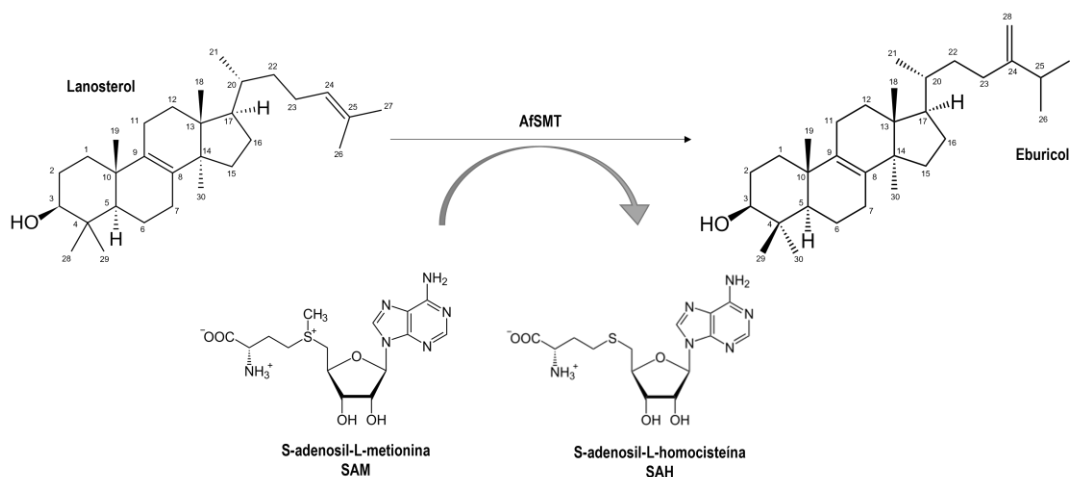


Figura 32: Reação de C-metilação catalisada pela AfSMT onde o lanosterol é o substrato aceptor formando o eburicol.

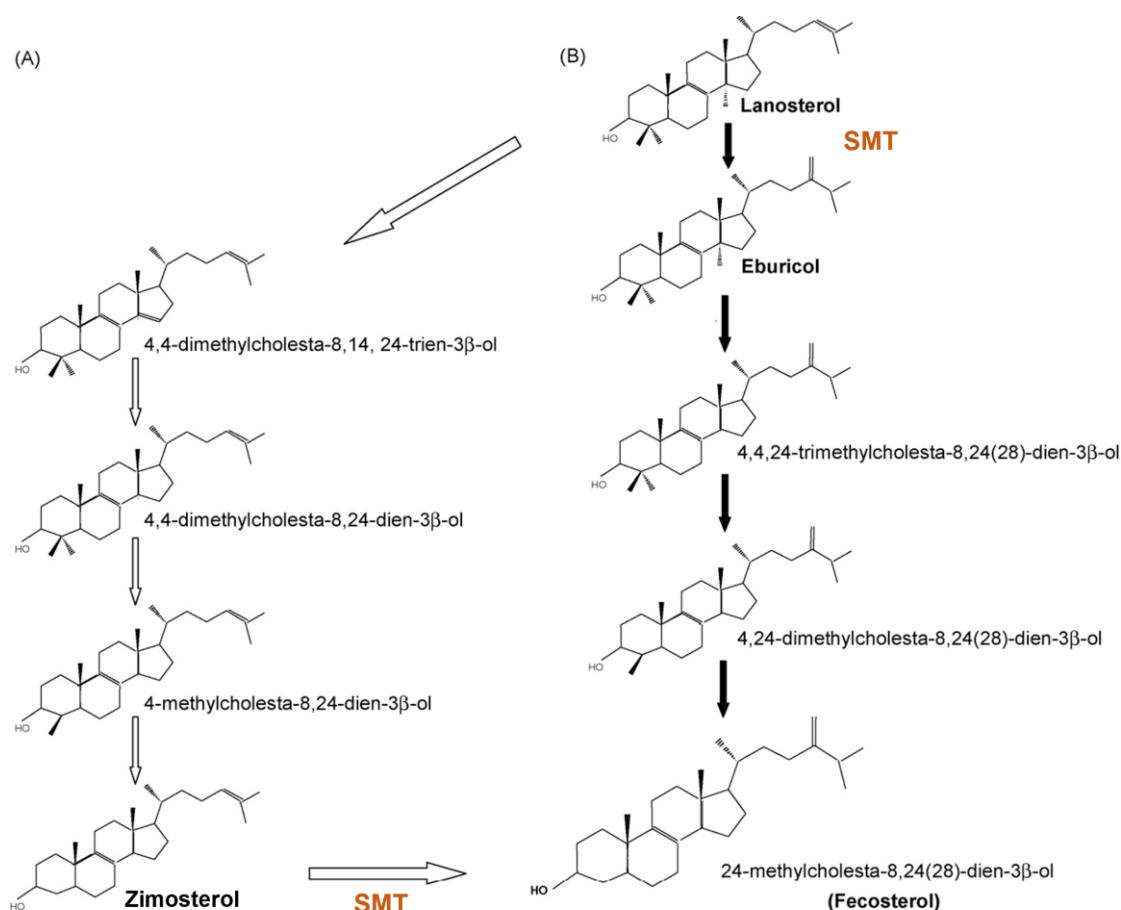


Figura 33: Via alternativa de síntese do lanosterol para o fecosterol. **(A)** Via de síntese em *S. cerevisiae*. **(B)** Via de síntese em *A. fumigatus* (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2013).

A via de biossíntese do ergosterol para *A. fumigatus* foi determinada por meio de análises de intermediários de esteróis e de *knockdown* de genes que codificam enzimas participantes da via (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2008; ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2013). Neste trabalho, a via alternativa foi confirmada por meio de ensaio enzimático.

Acredita-se que o fator importante para a especificidade e a eficiência enzimática seja a interação entre os resíduos presentes no sítio ativo da SMT com substrato esterol-SAM-enzima (Nes, 2000).

5.11.2 Determinação da concentração enzimática ótima

A fim de determinar a influência da concentração de enzima na atividade enzimática, um estudo foi realizado variando a concentração de enzima na presença de uma concentração fixa de substrato. No intervalo de

concentração enzimática estudado observa-se linearidade entre a unidade relativa de luminescência (RLU) e a concentração de enzima, sendo então escolhido a concentração de enzima de 50 nM para a realização dos ensaios enzimáticos (Figura 34).

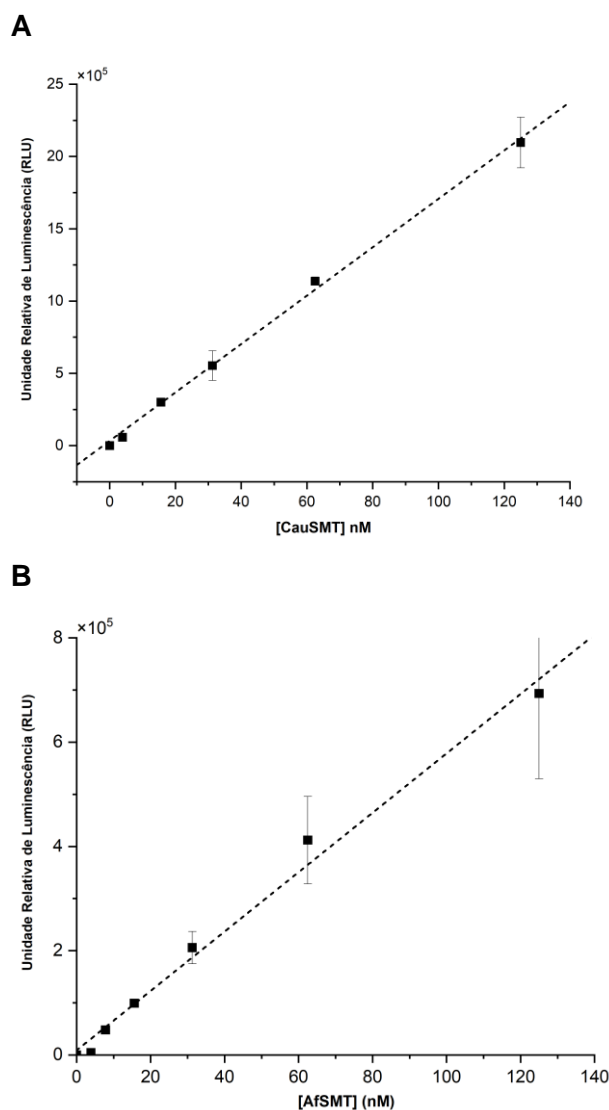


Figura 34. Efeito da concentração da CauSMT e AfSMT na reação enzimática. **(A)** Correlação linear entre a concentração enzimática de CauSMT em nM e a unidade relativa de luminescência. **(B)** Correlação linear entre a concentração enzimática de AfSMT em nM e a unidade relativa de luminescência.

5.11.3 Determinação da constante de afinidade pelos substratos

Ao analisar a variação de concentração do substrato zimosterol em concentração fixa de CauSMT, observa-se que a constante de afinidade (K_m) é $18,47 \pm 0,96 \mu\text{M}$. A afinidade de CauSMT por SAM é quatro vezes maior do que

a afinidade pelo substrato esteroide zimosterol, correspondendo a $4,14 \pm 0,82 \mu\text{M}$ (Figura 35A e B). Ao analisar a variação de concentração do substrato lanosterol em concentração fixa de AfSMT, observa-se que a constante de afinidade (K_m) é $66 \pm 24,29 \mu\text{M}$. A afinidade de AfSMT por SAM é trinta e cinco vezes maior do que a afinidade por lanosterol, correspondendo a $1,86 \pm 0,32 \mu\text{M}$ (Figura 35C e D).

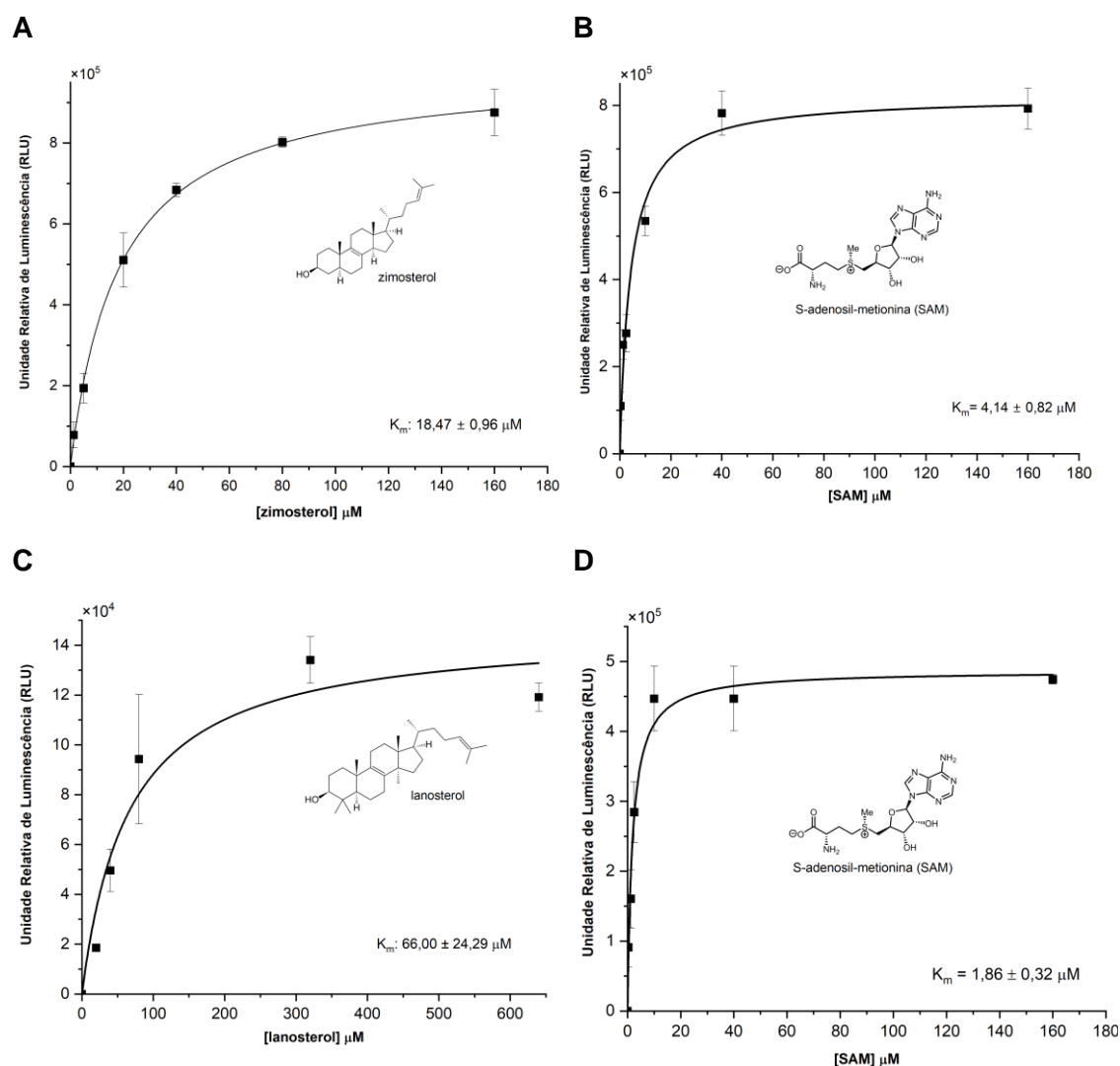


Figura 35. Determinação das constantes de afinidade de CauSMT e AfSMT pelos seus substratos. **(A)** Curva de constante de afinidade da CauSMT mostrando efeito da concentração do substrato zimosterol (2,5 μM a 160 μM). **(B)** Curva de constante de afinidade da CauSMT mostrando efeito da concentração do substrato SAM (0,31 a 160 μM). **(C)** Curva de constante de afinidade da AfSMT mostrando efeito da concentração do substrato lanosterol (20 μM a 640 μM). **(D)** Curva de constante de afinidade da AfSMT mostrando efeito da concentração do substrato SAM (0,31 μM a 160 μM).

Já é bem conhecida a diferença na preferência das SMTs eucarióticas pelos esteróis (Jayasimha *et al.*, 2006). Estudo anterior demonstrou a preferência de SMT de *P. brasiliensis* pelo lanosterol cujo o K_m foi de 38 μM (Pereira *et al.*, 2010). Embora já se tenha determinado a maior atividade da SMT de *Cryptococcus neoformans* ser para lanosterol, a constante de afinidade para o referido substrato ainda não foi determinada (Nes *et al.*, 2009). A SMT da alga saprófita *Prototheca wickerhamii* tem preferência para cicloartenol, entretanto apresenta atividade também para lanosterol tendo o K_m de 176 μM (Nes, 2000). Observamos que a constante de afinidade pelo lanosterol pode ser variável, onde para *A. fumigatus* é de 66 μM .

5.11.4 Determinação dos parâmetros cinéticos de CauSMT

Neste trabalho foram obtidos os primeiros valores de cinética enzimática para CauSMT. Como mostrado na Figura 36, a CauSMT apresentou $V_{\text{máx}}$ de $0,008 \pm 0,0005 \mu\text{M SAH} \cdot \text{min}^{-1}$ e K_m de $28,35 \pm 7,37 \mu\text{M}$.

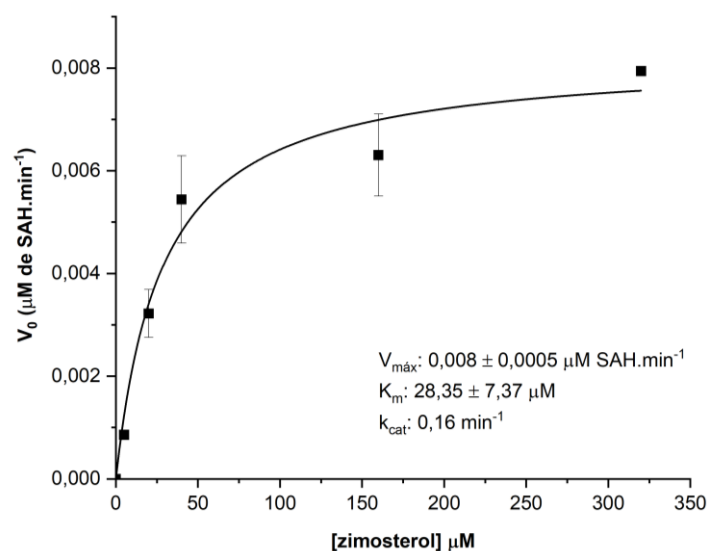


Figura 36. Curva de Michaelis-Menten mostrando efeito da concentração do substrato zimosterol (5 μM a 320 μM) sobre a velocidade da atividade da esterol C24-metiltransferases CauSMT.

Em *C. albicans*, a esterol C24-metiltransferase apresenta a K_m para o zimosterol de 50 μM (Ganapathy *et al.*, 2011). Em *Trypanosoma brucei*, o K_m é 47 μM (Zhou *et al.*, 2006). Em *S. cerevisiae*, o K_m determinado foi de 17 μM (Zhou *et al.*, 2006). Comparando com o mesmo gênero, a CauSMT apresenta maior afinidade pelo zimosterol do que a CaSMT. Entre os eucarióticos com

especificidade para o substrato zimosterol, a constante de afinidade parece não apresentar grandes variações, permanecendo relativamente estável ao longo do processo evolutivo.

A eficiência catalítica (k_{cat}) de CauSMT para o substrato zimosterol foi de $0,16 \text{ min}^{-1}$. Já é bem conhecido que a k_{cat} de SMTs é lenta, correspondendo a aproximadamente $0,6 \text{ min}^{-1}$ (Nes, 2000; Neelakandan *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010). A eficiência catalítica lenta típica das SMTs pode ser correlacionada com o processo lento de formação de esterol associado com a biogênese da membrana durante a proliferação celular, e representa algumas das k_{cat} mais lentas da bioquímica celular (Ganapathy *et al.*, 2011).

5.11.5 Inibição da atividade enzimática da CauSMT e da AfSMT pela tomatidina

Em busca de identificar um potencial antifúngico para *A. fumigatus* e *C. albicans*, a atividade enzimática das esterol C24-metiltransferases foi avaliada na presença da tomatidina. A tomatidina é um esterol alcalóide encontrado no tomate (*Solanum lycopersicum* L), e é responsável pela defesa contra patógenos de plantas e herbívoros (Bailly, 2021).

Como mostrado na Figura 37, a tomatidina apresentou atividade antifúngica contra a CauSMT, onde o IC_{50} foi de $1,82 \mu\text{M}$. Já para AfSMT, a tomatidina não inibiu a atividade da enzima.

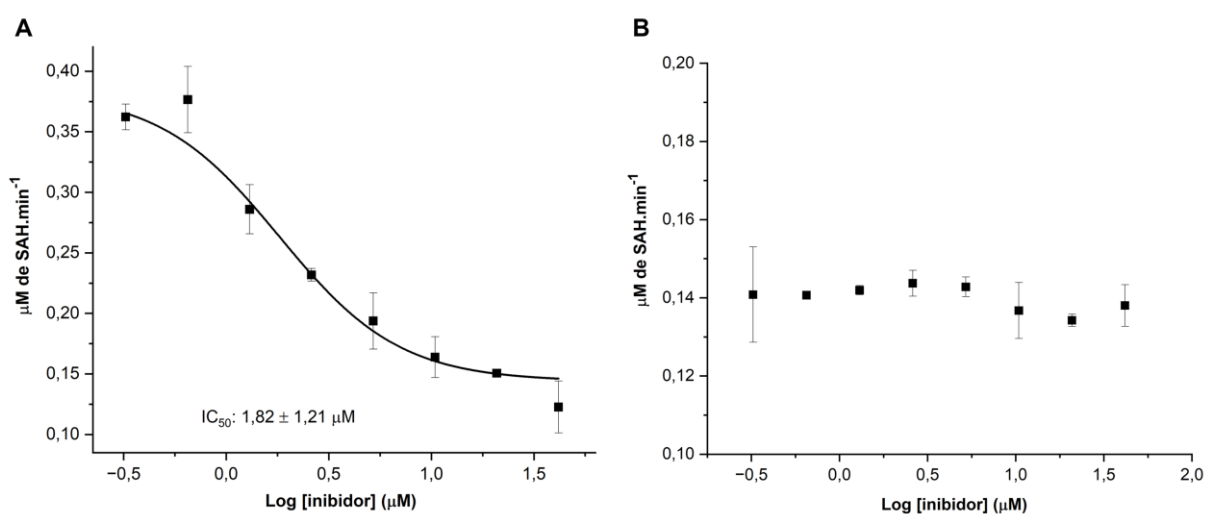


Figura 37. Determinação de IC_{50} da tomatidina ($0,32 \mu\text{M}$ a $41,66 \mu\text{M}$) na atividade enzimática das esterol C24-metiltransferases CauSMT (A) e AfSMT (B).

Já foi descrito a atividade antifúngica, antiparasitária e bactericida da tomatidina, exceto para *C. auris* e *A. fumigatus* (Bailly, 2021). Estudo realizados por Dorsaz e colaboradores (2017) mostra que a tomatidina teve atividade contra os fungos patogênicos *C. albicans* (MIC: 0, 31 μ M), *C. krusei* e *C. tropicalis* (MIC: 1,25 μ M), mas não contra *C. glabrata* (MIC >40 μ g/ mg) (Dorsaz *et al.*, 2017).

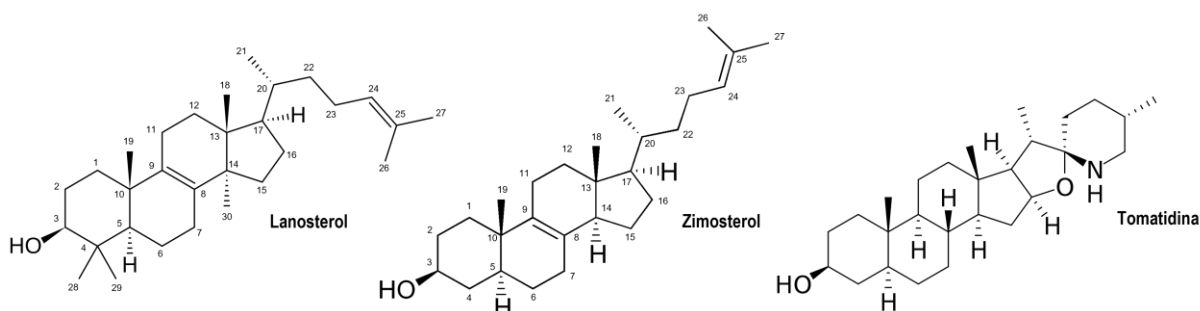


Figura 38: Comparação entre as estruturas dos substratos de SMT: lanosterol e zimosterol com o inibidor tomatidina.

O inibidor tomatidina é um análogo do substrato zimosterol, apresentando o núcleo similar e uma cadeia lateral ausente a partir do C17. Nos substratos aceptores, o grupo metil é transferido para o C24 presente nessa cadeia lateral. Outro fator que diferencia a tomatidina dos substratos, são os dois grupos metil (C28 e C29) presentes no C4 do lanosterol e ausentes no zimosterol e na tomatidina (Figura 38). Esses podem ser alguns dos fatores que não possibilitam a inibição de AfSMT quando comparado a CauSMT, além da diferença de resíduos no bolsão de interação com os substratos.

Como a SMT não existe na via de biossíntese de colesterol presente nos humanos (Maxfield e Tabas, 2005; Dupont *et al.*, 2012), a tomatidina pode potencialmente ser considerada como um antifúngico e/ou como composto líder para o desenho de novos antifúngicos para o tratamento das infecções causadas pela *C. auris*.

5.12 Caracterização Estrutural da CauSMT e da AfSMT

5.12.1 Efeito do pH e da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da CauSMT e da AfSMT por dicroísmo circular

Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190–260 nm) em variação crescente de temperatura foram obtidos para verificar mudanças na estrutura secundária de CauSMT e AfSMT em pH 5,6, 7,6 e 9,6. Os espectros dicroicos nos diferentes pHs a 25°C estão mostrados na figura 39.

O dicroísmo circular é um método usual para avaliação de estrutura secundária, estabilidade conformacional e estudos de interação de proteínas. O dicroísmo circular baseia-se na absorção diferencial de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita. As medidas realizadas na região distante de UV (190–260 nm) são obtidas por meio da transição eletrônica entre as amidas da cadeia principal das proteínas (Kelly, Jess e Price, 2005).

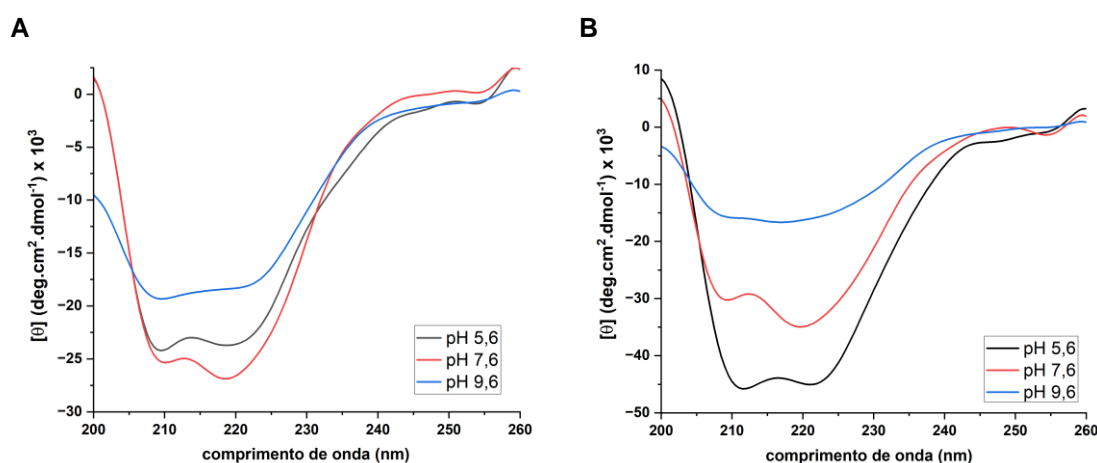


Figura 39: Efeito do pH nas estruturas secundárias por dicroísmo circular. A) CauSMT, B) AfSMT

Em pH neutro, a CauSMT apresenta predominância de hélice α (53%), seguido de folhas β antiparalela (26%). Por outro lado, no pH ácido e básico observa-se diminuição nesse conteúdo de estrutura secundária. O percentual de folha β diminui para 16% em ambas as condições, enquanto a hélice α diminui cerca de 50% e 32% em pH 5,6 e em pH 9,6, respectivamente (Tabela 9), acompanhado do aumento de estruturas desordenadas. Esses resultados

indicam a perda da estrutura nativa da proteína da condição neutra para a alcalina.

Tabela 9. Percentual de estruturas secundárias da CauSMT. Efeito dos pHs 5,6, 7,6 e 9,6 a 25°C nas estruturas secundárias comparado à estrutura predita pelo AlphaFold.

Estruturas	pH 5,6	pH 7,6	pH 9,6	Modelo 3D
Hélice α (%)	49,9	53,4	31,6	50,7
Folha β antiparalela (%)	16,1	26,6	16,3	14,4
Folha β paralela (%)	1,9	9,2	5,5	6,4
Turn (%)	7,1	3,5	8,6	12,3
Desordenada (%)	25,0	7,4	38,1	16,3

Em pH neutro, a AfSMT apresenta predominância de hélice α de estrutura secundária (67%), seguido de folhas β antiparalela (14%). Por outro lado, no pH ácido observa-se a diminuição de hélice α e formação de bolha β paralela. Em pH básico, ocorre diminuição do percentual de folha β e de hélice α acompanhado do aumento de estruturas desordenada (Tabela 10). Esses resultados indicam a perda da estrutura nativa da proteína da condição neutra para a alcalina.

Em CauSMT, a proporção de hélice α e folha β em pH 5,6 e 7,6 está em concordância com a estrutura tridimensional predita pelo AlphaFold (Tabela 9). As variações observadas nas folhas β paralelas e nas estruturas desordenadas podem ser atribuídas a organização oligomérica da enzima. Ao comparar as estruturas secundárias de AfSMT com a estrutura tridimensional observa-se maior percentual de hélice α em pH 7,6. Diferenças consideráveis foram observadas na estrutura desordenada de AfSMT em todos os pHs (Tabela 10). Parte dessas variações podem ser atribuídas a forma oligomérica da enzima. No geral, os resultados estão compatíveis ao observado para ScSMT (percentual de hélice α e folha β) e com a estrutura de SMT de *Fonsecaea pedrosoi* predita pelo AlphaFold e depositada no Banco de Dados de Proteínas (PDB) (CauSMT com RMSD de 0,238 e AfSMT com RMSD de 0,463) (Nes *et al.*, 2004).

Tabela 10: Percentual de estruturas secundárias da AfSMT. Efeito dos pHs 5,6, 7,6 e 9,6 a 25°C nas estruturas secundárias comparado à estrutura predita pelo AlphaFold.

Estruturas	pH 5.6	pH 7.6	pH 9.6	Modelo 3D
Hélice α (%)	55,4	67,7	25,3	50,7
Folha β -antiparalela (%)	11,1	14,6	26,3	14,3
Folha β paralela (%)	33,5	8,9	2,6	6,6
Turn (%)	0	8,9	14,9	12,5
Desordenada (%)	0	0	31,9	15,9

Mudanças significativas na estrutura secundária e na estabilidade estrutural de CauSMT e AfSMT foram observadas no pH ácido e neutro com o aumento da temperatura (Figuras 40A e B) (Figuras 41A e B).

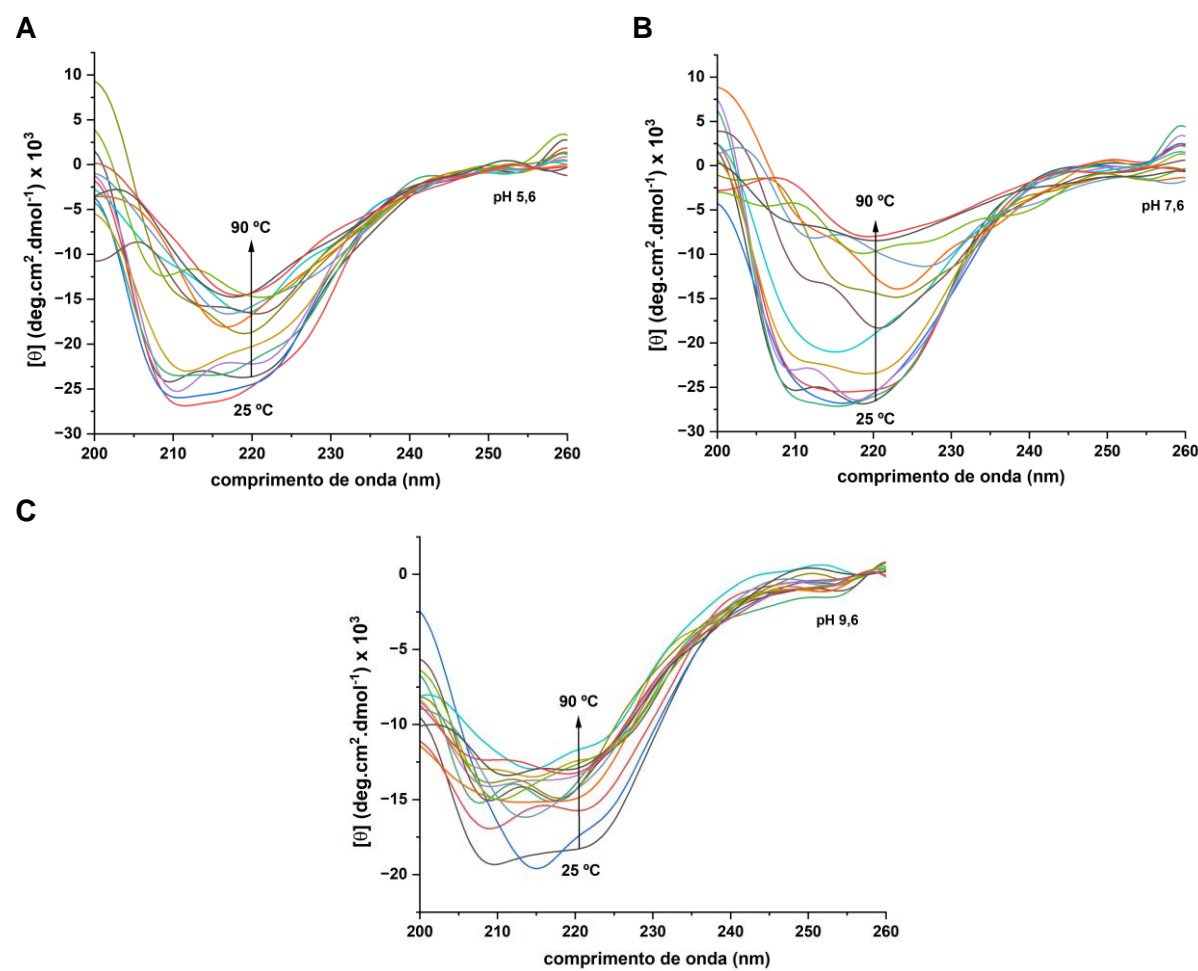


Figura 40. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da CauSMT avaliados por dicroísmo circular. Espectros dicroicos da CauSMT coletados entre 25 a 90 °C em pH (A) 5,6 (B) 7,6 e (C) 9,6.

Adicionalmente, observa-se a redução do sinal dicróico até ambas as proteínas atingirem o estado desnaturado, mostrando temperatura de transição (T_m) similares correspondendo a 52 °C e 59 °C, respectivamente para CauSMT e 48 °C e 59 °C, respectivamente para AfSMT (Tabela 11). Esses parâmetros foram monitorados com a diminuição do sinal dicróico centrado em 222 nm, associado a hélice α (Figura 42). No pH 9,6, foram observadas alterações na estrutura secundária de CauSMT e AfSMT, entretanto o T_m não pode ser estimado. Além disso, dois valores de transição térmica foram observados, um em 30-35°C e outro em 85 a 90°C. Os dados mostram que ambas as enzimas são mais estáveis em pHs 5,6 e 7,6, quando comparado ao pH 9,6.

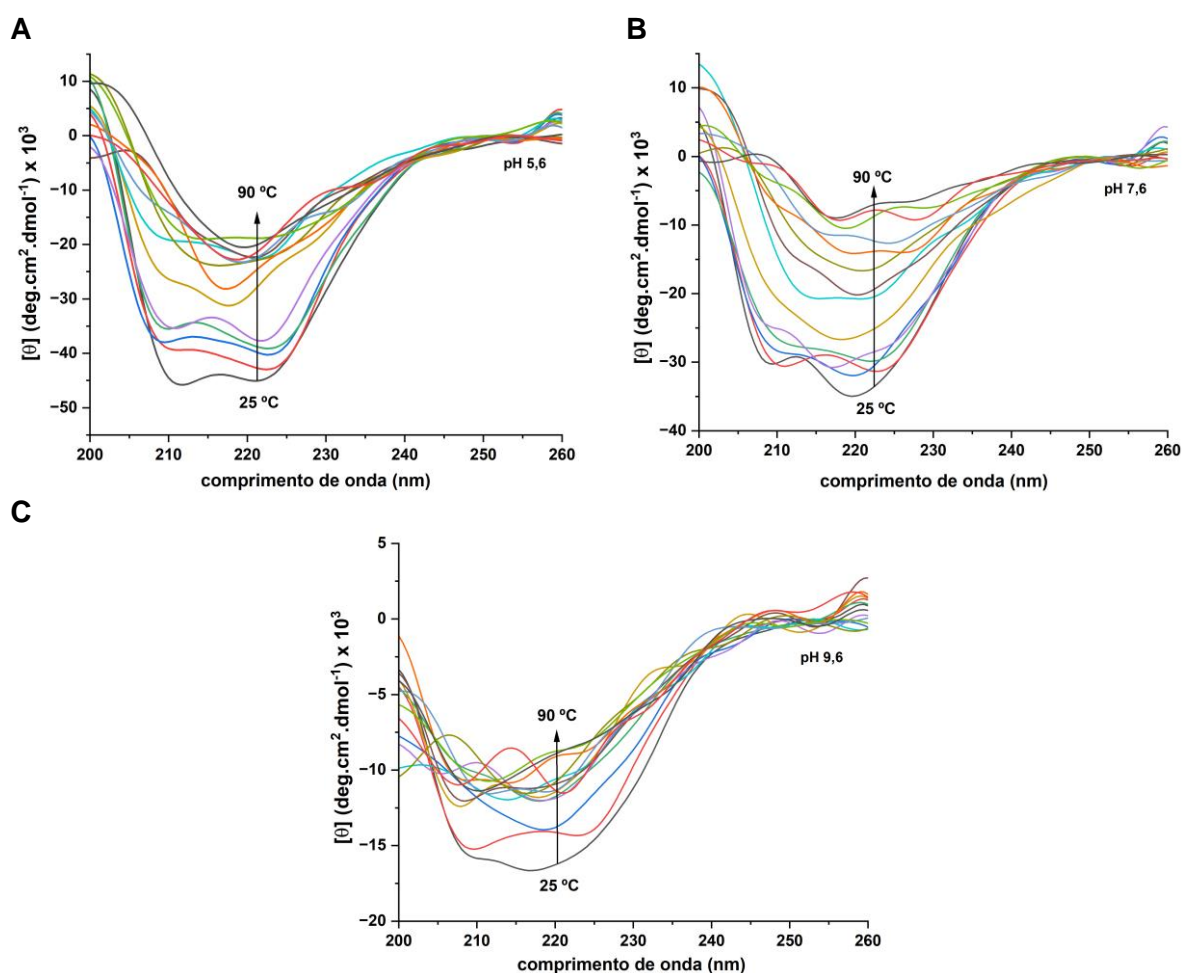


Figura 41. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias e estabilidade estrutural da AfSMT avaliados por dicróismo circular. Espectros dicróicos da AfSMT coletados entre 25 a 90 °C em pH (A) 5,6 (B) 7,6 e (C) 9,6.

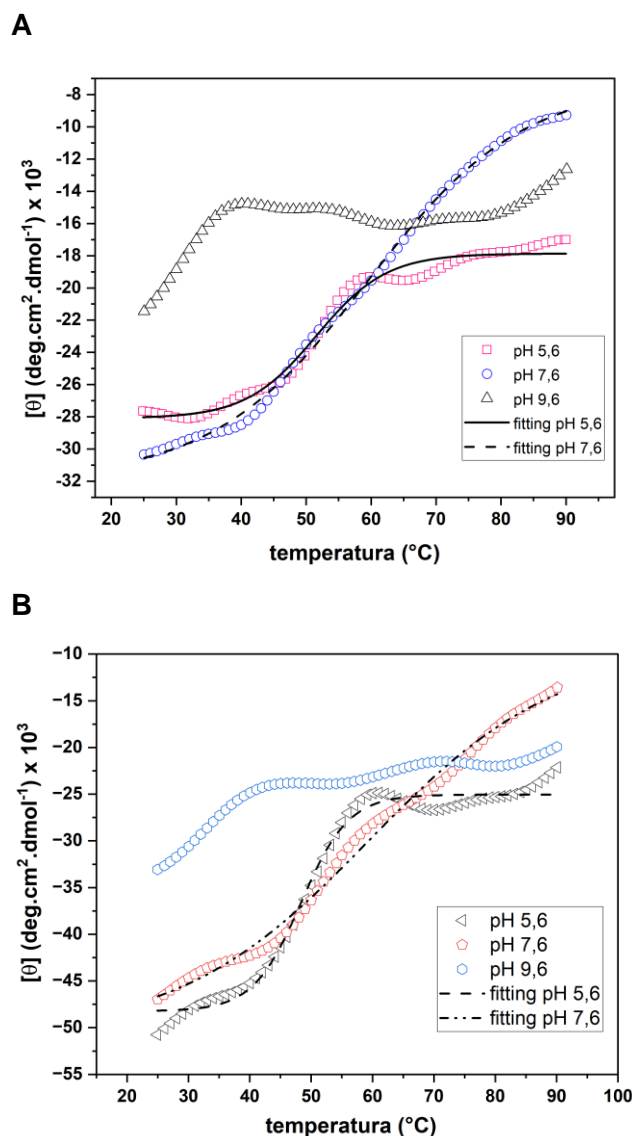


Figura 42. Efeito da temperatura na estabilidade estrutural da CauSMT e AfSMT. (A) Curvas de desnaturação térmica da CauSMT monitoradas em 222 nm para os pH 5,6, 7,6 e 9,6 com temperaturas variando entre 25 a 90 °C. **(B)** Curvas de desnaturação térmica da AfSMT monitoradas em 222 nm para os pH 5,6, 7,6 e 9,6 com temperaturas variando entre 25 a 90 °C

Tabela 11. Temperatura de transição (T_m) da CauSMT e AfSMT em diferentes pHs.

	pH	T_m (°C)
CauSMT	5, 6	52,12±0,19
	7, 6	59,68±0,14
	9, 6	–
AfSMT	5, 6	48,35±0,11
	7, 6	59,35±0,37
	9, 6	–

5.12.2 Análise da estrutura e identificação de potenciais sítios de interação de CauSMT e AfSMT com os substratos e inibidor

As sequências primárias de CauSMT e de AfSMT apresenta em torno de 47 a 58% de identidade com os aminoácidos das SMTs de *Saccharomyces cerevisiae* (ScSMT), *Arabidopsis thaliana* (AtSMT) e *Trypanosoma brucei* (TbSMT) (Figura 43). Embora a semelhança entre as SMTs eucarióticas seja relativamente alta, elas apresentam variações catalíticas que possibilitam a preferência por determinados esteróis (Neelakandan *et al.*, 2009; Dupont *et al.*, 2012).

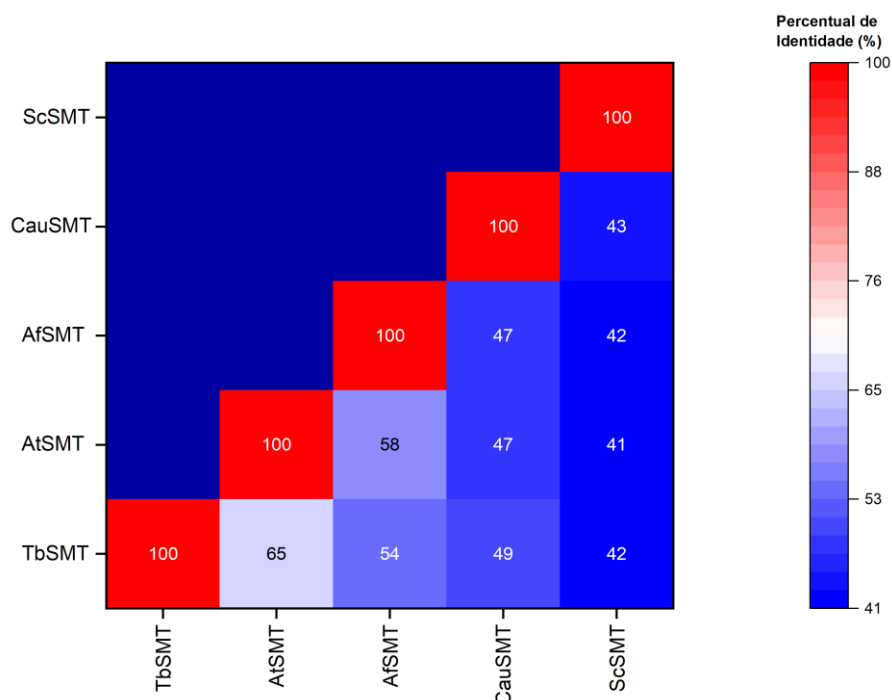


Figura 43: Matriz de identidade de sequência de aminoácidos mostrando o percentual de identidade (%) entre as SMTs dos fungos, de planta e de protozoário. As SMTs representadas são de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Candida auris* (Cau), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Arabidopsis thaliana* (At) e *Trypanosoma brucei* (Tb).

A estrutura de CauSMT e AfSMT apresenta o enovelamento característico da classe I de metiltransferases dependentes de SAM correspondendo ao tipo Rossmann-like com sete folhas- β unidas por hélices- α (Figura 44) (Schubert, Blumenthal e Cheng, 2003).

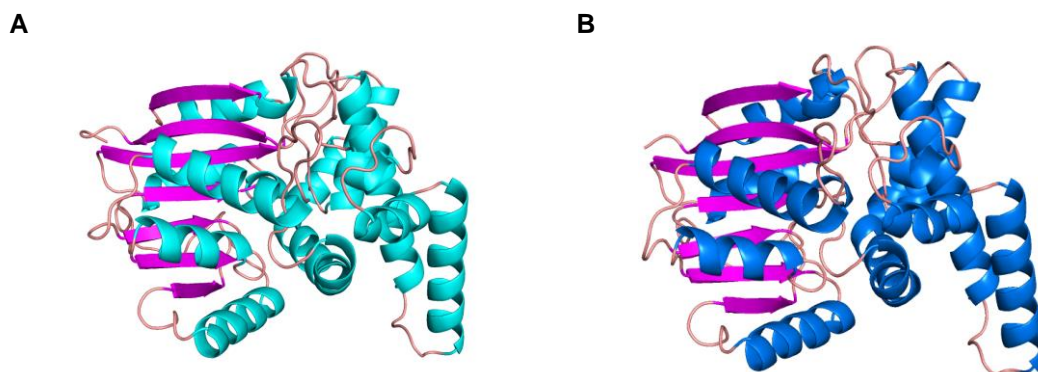


Figura 44: Estruturas tridimensionais de CauSMT (A) e AfSMT (B) preditas pelo AlphaFold. As folhas β , hélices α e os loops, estão em magenta, azul e rosa, respectivamente.

Como determinado experimentalmente, a AfSMT é tetramérica, sendo também demonstrado a importância das interações hidrofóbicas para a estabilização do oligômero (Figura 29). A estrutura tridimensional deste oligômero mostra que as interfaces entre as quatro subunidades são compostas por aminoácidos hidrofóbicos, possibilitando assim a estabilização do tetrâmero por meio das interações hidrofóbicas entre eles (Figura 45A e B) (Young, Jernigan e Covell, 1994; Tsai *et al.*, 1997; Nes, 2000; Ganapathy *et al.*, 2008).

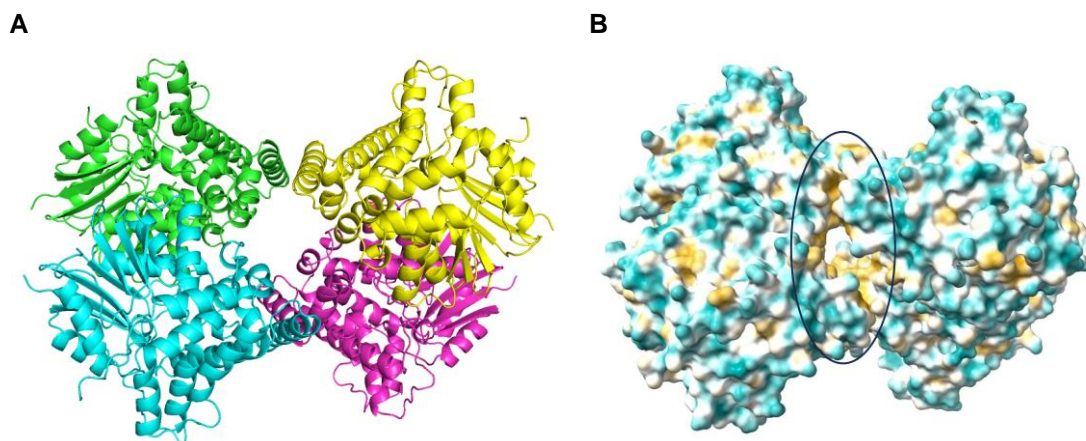


Figura 45: Estrutura tetramérica da AfSMT predita pelo AlphaFold-multimer. A) As subunidades estão em verde, azul, amarelo e rosa. B) Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos, onde em azul estão os hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos. O círculo destaca o core hidrofóbico.

Os experimentos de SEC e DLS indicaram que a CauSMT forma um oligômero, embora o tamanho tenha sido diferente entre as técnicas. No entanto, vários estudos que mostraram que as SMTs são proteínas tetraméricas (Nes, 2000; Nes, Jayasimha e Song, 2008; Ganapathy *et al.*, 2011). Neste trabalho os resultados podem indicar a existência de oligômero tetraméricos ou

pentaméricos. Assim, a realização de estudos mais aprofundados é necessária para melhor compreensão a respeito da organização da CauSMT. As interações hidrofóbicas participam da estabilização do oligômero de CauSMT (Figura 28). As interfaces entre as cinco subunidades que formam o pentâmero têm a presença majoritária de aminoácidos hidrofóbicos, reforçando o papel das interações hidrofóbicas na estabilização da estrutura quaternária de CauSMT (Figura 46A e B).

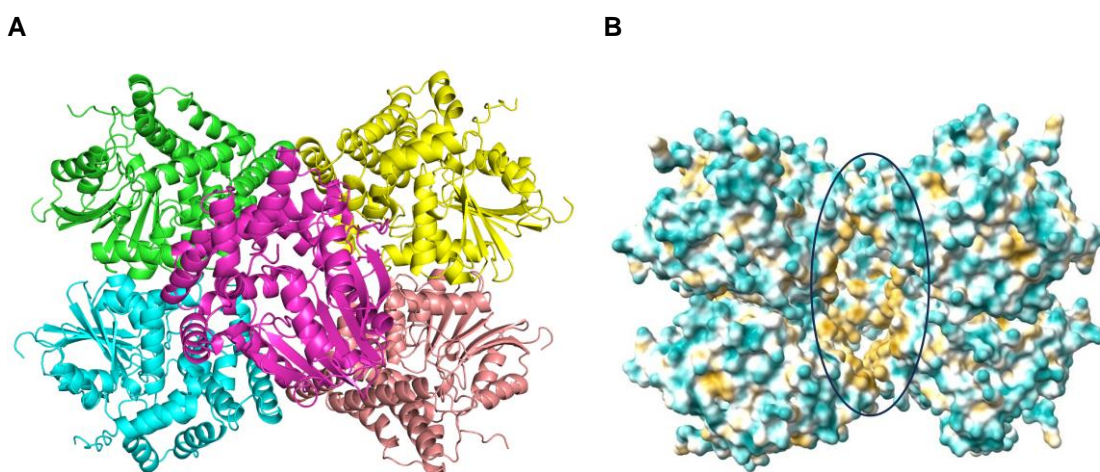


Figura 46: Estrutura pentamérica da CauSMT predita pelo AlphaFold-multimer. A) As subunidades estão em verde, azul, amarelo, rosa e magenta. **B)** Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos, onde em azul estão os hidrofílicos e em laranja os hidrofóbicos. O círculo destaca o core hidrofóbico.

Já é descrito que as SMTs estão localizadas no retículo endoplasmático e partículas lipídicas (Hu *et al.*, 2017; Chiu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Jordá e Puig, 2020). Além disso, a enzima catalisa a reação de C-metiltransferase de SAM para um esterol, onde nas figuras 47C e 48C podemos observar a região hidrofóbica no local de entrada do substrato. O efeito hidrofóbico parece atuar na formação do oligômero direcionando a interação entre as regiões com maior presença de aminoácidos hidrofóbicos, resultando na formação de um ambiente interno hidrofóbico no qual está direcionada a entrada dos substratos (Baldwin, 2007) (Figuras 45B e 46B).

As poses do docking molecular sugeriram dois sítios de interação em CauSMT e AfSMT. Em CauSMT, o sítio de ligação de SAM está posicionado no centro da enzima na região que envolve o loop entre a folha $\beta 1$ e a hélice $\alpha 7$. Os

resíduos que compõe o sítio são Y70, T74, Y78, Y85, F93, G131, C132, G133, L152, N153, N154, Q158, G180, D181, F182, I198, E199, A200, V202, H203, W229, D253 e I255. Enquanto o segundo sítio é ocupado pelo zimosterol sendo composto por um conjunto de 6 hélices α , no qual está em frente ao sítio de ligação de SAM e compreende dos resíduos F84, Y85, G88, W89, F93, H94, F95, E199, W229, D253, L294, R312, T321, T342, L345, E346, A349 e L352. Os aminoácidos selecionados em ambos os sítios então em até 4Å de pelo menos um átomo não hidrogênio dos substratos (Figura 47A).

Quanto a AfSMT, o sítio de ligação de SAM está igualmente posicionado e os resíduos que participam do sítio são T78, Y82, S96, F97, H98, G135, C136, G137, V138, P141, L156, N157, N158, N159, Q162, G184, D185, F186, I202, E203, A204 e H207. O lanosterol interage no segundo sítio composto por Y82, L88, Y89, G92, W93, F97, H98, F99, E203, W233, D257, L298, R316, M317, R322, A325, A346, L349, A350, A352, G353 e L356. Os resíduos descritos para cada sítio estão a 4Å de cada substrato (Figura 48A).

O sítio catalítico de CauSMT e AfSMT, assim como em outras SMTs, é composto por motivos conservados responsáveis pela interação com o esterol e o SAM, sendo chamado de regiões I, II, III e IV. Essas regiões de ligação dos substratos foram identificadas por meio de estudos de mutagênese sítio dirigida e de ligação covalente em ScSMT (Nes, 2003; Ganapathy *et al.*, 2008).

A região I é exclusiva de SMT e está envolvida na interação com o esterol. Estudos realizados em ScSMT indicaram que a Y81 contribui para a catálise por meio da interação com o intermediário no complexo ativado possibilitando a formação do produto (Ganapathy *et al.*, 2008). Em CauSMT e AfSMT, esse resíduo é conservado correspondendo a Y85 e Y89, respectivamente. Além disso, a mutação de H90L em ScSMT resultou na perda total da atividade enzimática. Este resíduo parece estar envolvido na etapa de desprotonação da reação de transmetilação (Nes *et al.*, 2004). Este resíduo é conservado em CauSMT e AfSMT correspondendo a H94 e H98, respectivamente (Figuras 47B e D e 48B e D).

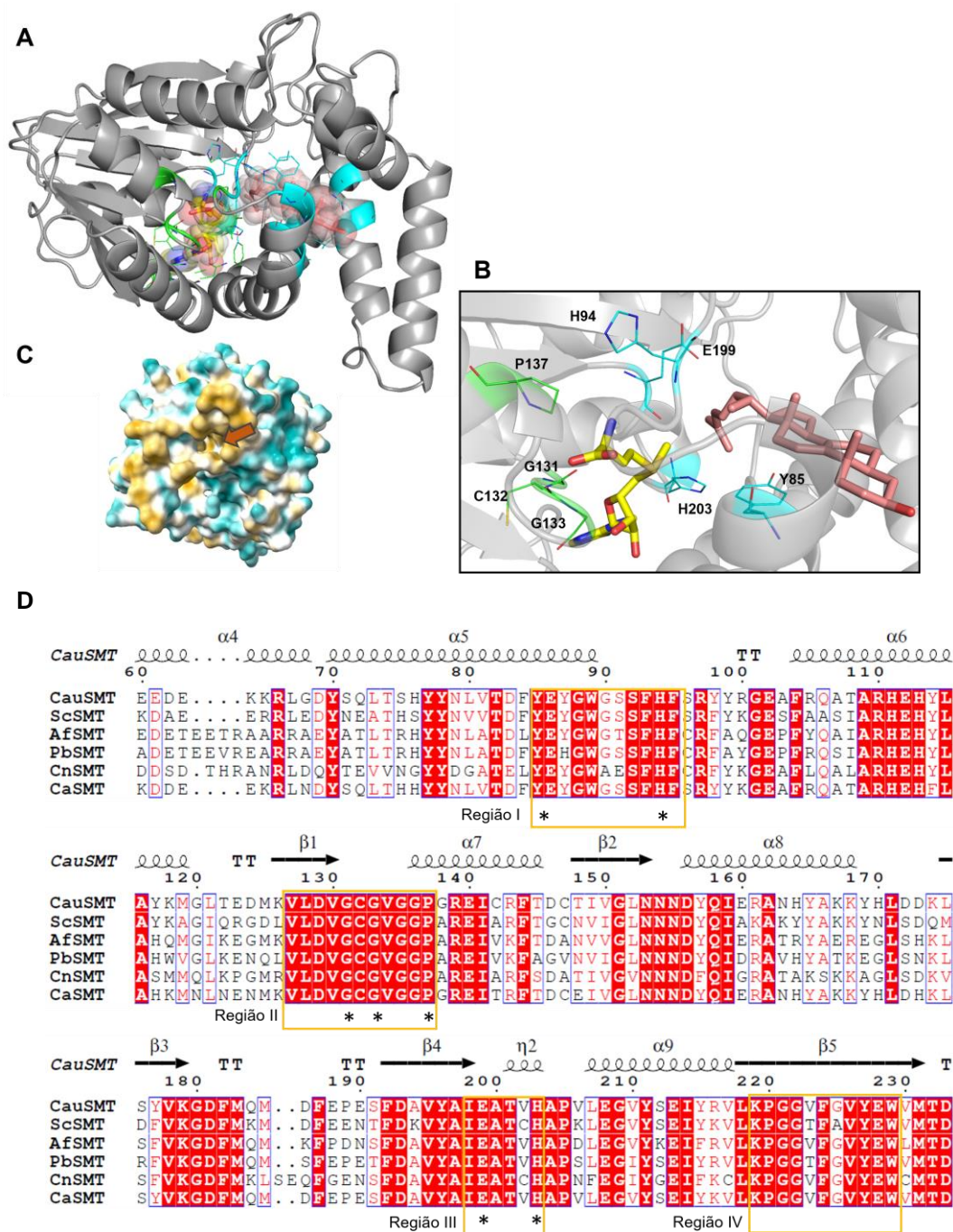


Figura 47: Análise estrutural das interações dos substratos zymosterol e SAM com CauSMT. **A)** Sítios de ligação do zymosterol (azul) e do SAM (verde). **B)** Os resíduos conservados envolvidos na catálise enzimática estão mostrados em azul (região I e III) e verde (região II). **C)** Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos mostrando abertura de entrada dos substratos. **D)** Alinhamento múltiplo de SMTs de *Candida auris* (Cau), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Candida albicans* (Ca), *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Cryptococcus neoformans* (Cn). Os resíduos marcados com * estão a 4Å dos substratos em CauSMT e foram experimentalmente observados serem importantes para a atividade enzimática em ScSMT. As setas indicam as folhas-β e as espirais as α-hélices.

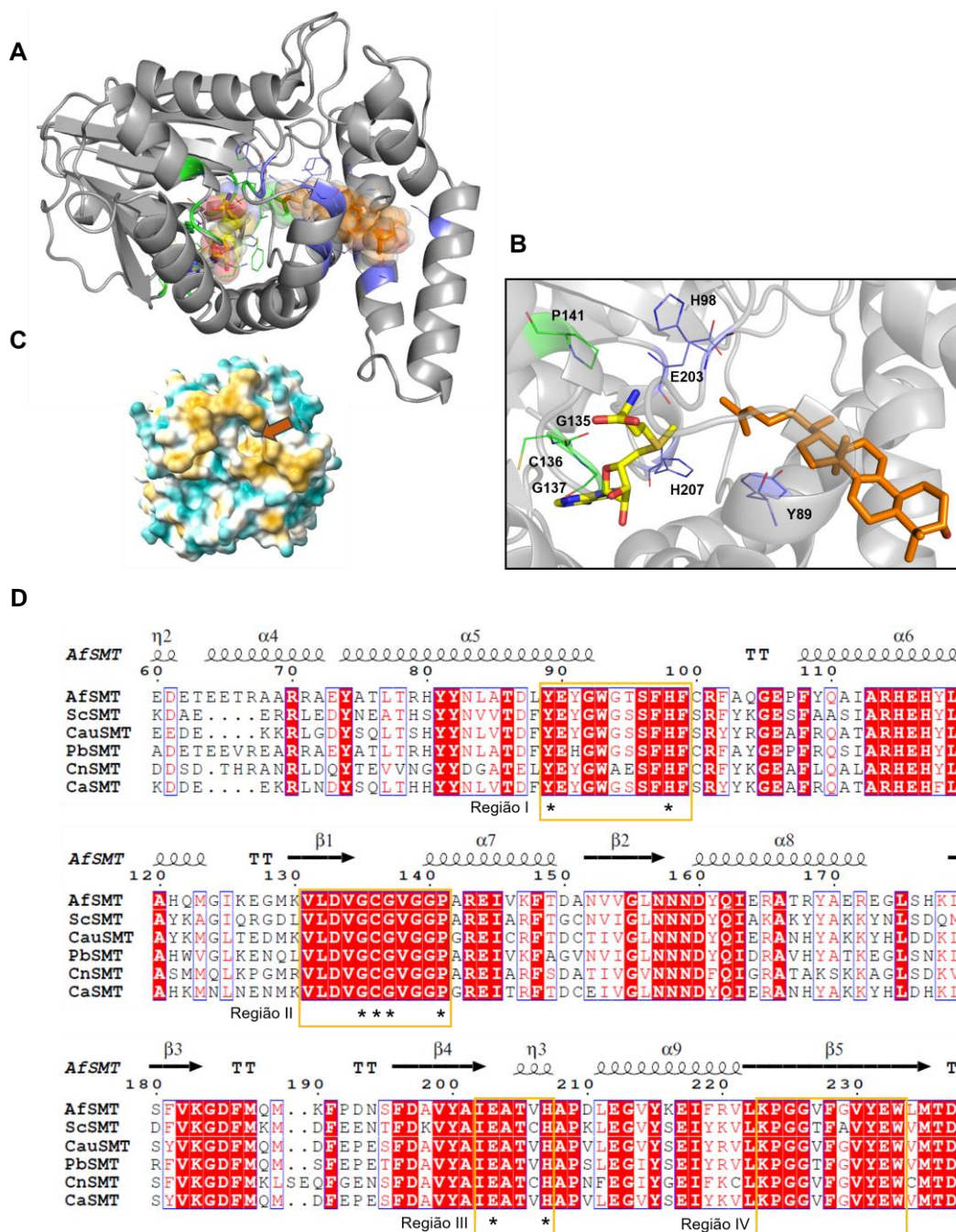


Figura 48: Análise estrutural das interações dos substratos lanosterol e SAM com AfSMT.

A) Sítios de ligação do lanosterol (roxo) e do SAM (verde). **B)** Os resíduos conservados envolvidos na catálise enzimática estão mostrados em roxo (região I e III) e verde (região II). **C)** Superfície molecular conforme a hidrofobicidade dos resíduos mostrado abertura de entrada dos substratos. **D)** Alinhamento múltiplo de SMTs de *Candida auris* (Cau), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Candida albicans* (Ca), *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Cryptococcus neoformans* (Cn). Os resíduos marcados com * estão a 4Å dos substratos em AfSMT e foram experimentalmente observados serem importantes para a atividade enzimática em ScSMT. As setas indicam as folhas-β e as espirais as α-hélices.

A região II compreende dos resíduos que compõem o sítio de ligação de SAM, sendo conservada em metiltransferases dependentes de SAM (Nes, 2003; Sun, Huang e Wei, 2021). Em CauSMT e AfSMT, este motivo está localizado entre a fita β 1 e a hélice α 7. Estudos prévios em ScSMT indicaram que mutações em resíduos dessa região (V126L, G127L, C128L, G129L, G131L e P133L) resultaram na perda de atividade da enzima, mostrando o papel dos resíduos na interação com SAM para a reação de C-metilação pela SMT (Ganapathy *et al.*, 2008). Em CauSMT, os resíduos correspondentes e que estão a 4Å de SAM são o G131, C132, G133 e P137 (Figura 47D). Para AfSMT, G135, C136, G137 e P141 (Figura 48D). Observa-se ainda que o SAM está posicionado próximo ao loop correspondente a região II (Figura 47B e 48B).

A região III está localizada entre o final da fita β 4 e hélice (3₁₀)3 e participa da interação com o esterol. As mutações sítio dirigidas realizadas em ScSMT indicaram a participação de E195 na atividade enzimática (Nes *et al.*, 2004). Os resíduos E199 e E203 em CauSMT e AfSMT, respectivamente, estão posicionados próximo ao terminal nucleófilo do esterol, e possivelmente interagem com o S-CH₃ de SAM. Foi demonstrado também o que o H199 em ScSMT tem papel crucial na atividade, sendo que este corresponde a H203 e H207 em CauSMT e AfSMT, respectivamente (Ganapathy *et al.*, 2008) (Figura 47B e 48B).

A região IV está localizada na fita β 5 e participa da interação com o esterol (Ganapathy *et al.*, 2008) (Figura 47D e 48D).

As análises de docking molecular indicaram que o inibidor tomatina ocupa o mesmo sítio de ligação do zimosterol em CauSMT, indicando uma possível inibição competitiva pelo substrato (Figura 49).

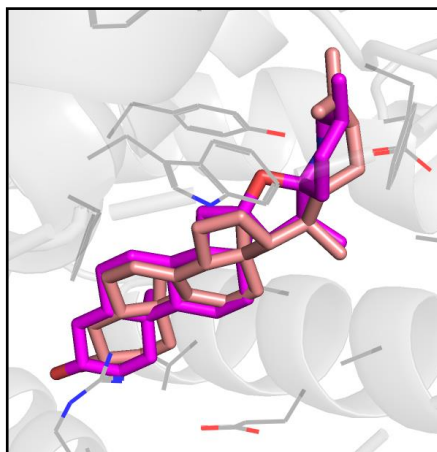


Figura 49: Sobreposição dos sítios de ligação do inibidor tomatidina (magenta) e do zimosterol (rosa).

5.12.3 Cristalização da CauSMT e da AfSMT

Cristais resultantes da primeira triagem foram identificados após 2 meses do preparo das microplacas. Na tabela 12, observa-se as condições em que os cristais foram obtidos por meio dos ensaios de cristalização e cocrystalização da proteína CauSMT e seus substratos SAM e zimosterol. Nesta etapa, não foram obtidos cristais de AfSMT e substratos.

Tabela 12. Condições de cristalização da CauSMT na etapa de *screening* utilizando o kit JCSG Plus (Molecular Dimensions).

	Proteína	Ligante	Condição de cristalização
1	CauSMT [5,93 mg/mL]	SAM [82,8 uM]	Fosfato de amônio dibásico 1M Acetato de sódio 0,1M pH 4,5
2	CauSMT [5,93 mg/mL]	SAM [82,8 uM]	Sulfato de magnésio heptahidratado 1,4M MES 0,1M pH 6,5
4	CauSMT [5,93 mg/mL]	SAM [82,8 uM]	10% PEG 6000 Bicine 0,1M pH 9,0
5	CauSMT [5,47 mg/mL]	Zimosterol [369,4 uM]	20% etanol 0,1M Tris pH 8,5

Na figura 50 observa-se os cristais de CauSMT-SAM e CauSMT-zimosterol obtidos pelo método de difusão de vapor de gota sentada (*sitting drop*) nas condições descritas na tabela 12.

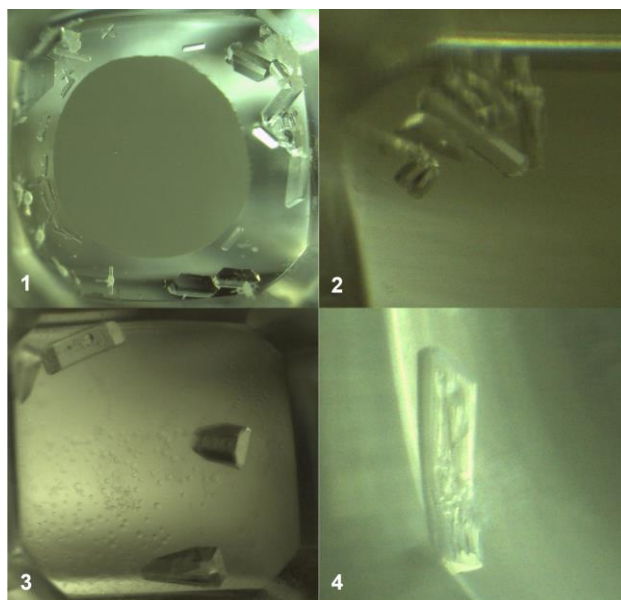


Figura 50. Cristais de CauSMT-SAM e CauSMT-zimosterol obtidos sob as condições de cristalização 1, 2, 3 e 4 (Tabela 12) do kit JCSG Plus (Molecular Dimensions).

Diante das condições de cristalização em que foram obtidos cristais na etapa de triagem, o refinamento das condições 1, 2 e 3 (tabela 12) foram realizados sendo utilizado o método de difusão de vapor de gota sentada (*sitting drop*), a fim de se obter cristais maiores para experimentos de difração de raios X. Nesta etapa, variou-se a concentração dos agentes precipitantes e pH dos tampões e concentração de CauSMT no poço. Na tabela 13 e figura 51, observa-se as condições que os cristais foram obtidos da proteína CauSMT e o substrato SAM e respectivas imagens.

Tabela 13. Condições de cristalização da CauSMT na etapa de refinamento da condição fosfato de amônio dibásico 1M, acetato de sódio 0,1M pH 4,5.

	Proteína	Ligante	Condição de Cristalização
1	CauSMT [5,93 mg/mL]	SAM [82,8 uM]	Fosfato de amônio dibásico 1,8M
			Acetato de sódio 0,1M pH 5,0
2	CauSMT [5,93 mg/mL]	SAM [24,84 uM]	Fosfato de amônio dibásico 1,2M
			Acetato de sódio 0,1M pH 5,5

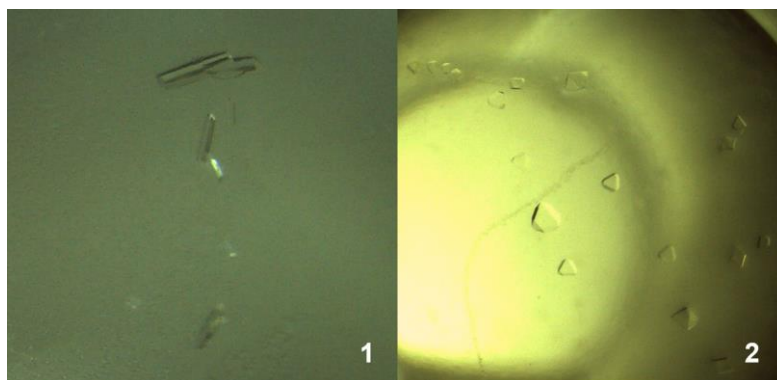


Figura 51. Cristais de CauSMT-SAM obtidos na etapa de refinamento nas condições 1 e 2 descritas na tabela 11.

Além disso, cristais foram obtidos por meio do método de *microbatch* (Figura 52). Esse método consiste na adição da gota com a solução de cristalização em uma camada de óleo de parafina e/ou silicone. Os cristais resultantes desse método foram identificados após 1 semana do preparo das microplacas. Observa-se as condições que os cristais foram obtidos na tabela 14.

Tabela 14. Condições de cristalização e cocrystalização da CauSMT, CauSMT-SAM, AfSMT e AfSMT-SAM por *microbatch*.

	Proteína	Ligante	Condição de Cristalização
1	AfSMT [6,15 mg/mL]	-	2,0M Ammonium sulfate; 0,1M Sodium acetate pH 4,6
2	CauSMT [5,4 mg/mL]	Zimosterol [283,5uM]	2,0M Ammonium sulfate; 0,1M Sodium acetate pH 4,6
3	CauSMT [5,4 mg/mL]	Zimosterol [283,5uM]	0,2M Lithium sulfate; 0,1M Sodium acetate pH 4,5; 30% PEG 8000
4	AfSMT [6,15 mg/mL]	-	3,2M Ammonium sulfate; 0,1M Citrate pH 5,0
5	AfSMT [5,93 mg/mL]	SAM [37,3uM]	3,2M Ammonium sulfate; 0,1M Citrate pH 5,0
6	AfSMT [5,93 mg/mL]	SAM [37,3uM]	3,0M Sodium chloride; 0,1M BIS-Tris pH 5,5

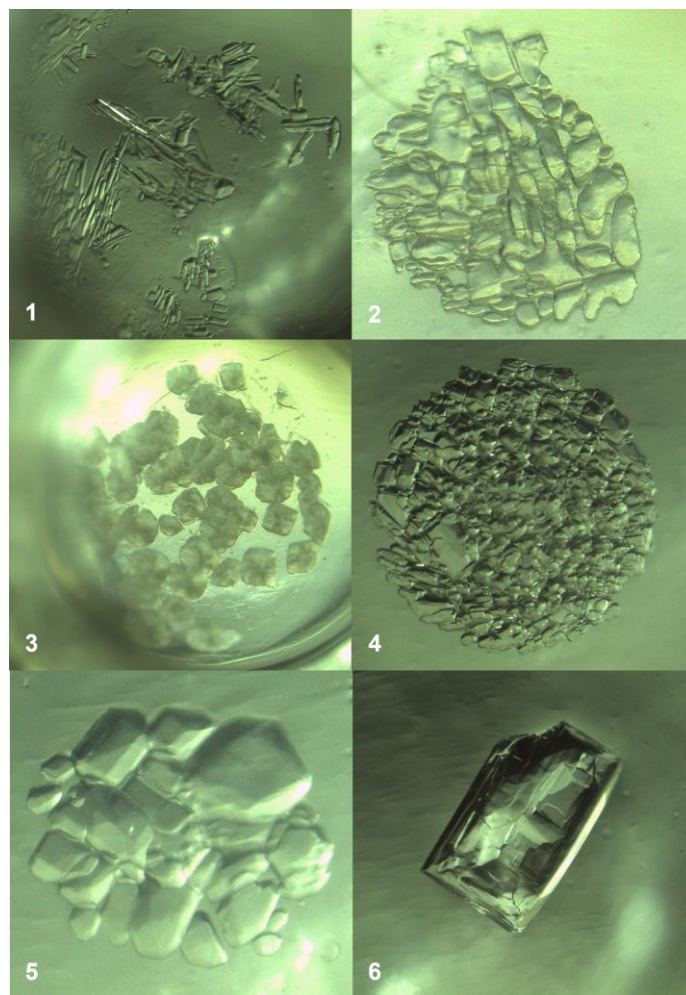


Figura 52. Cristais de CauSMT, CauSMT-SAM, AfSMT e AfSMT-SAM por *microbatch* nas condições descritas na tabela 12.

Outra etapa de triagem das condições de cristalização da proteína AfSMT e a cocrystalização com o substrato SAM foram realizadas pelo método de difusão de vapor de gota sentada (*sitting drop*). Na tabela 15 e figura 53 observa-se as condições que os cristais foram obtidos da proteína AfSMT e o substrato SAM e respectivas imagens.

Tabela 15. Condições de cristalização da CauSMT na etapa de *screening* utilizando o kit JCSG Plus (Molecular Dimensions).

	Proteína	Ligante	Condição de Cristalização
1	AfSMT [5,43 mg/mL]	SAM [37,3 µM]	0,04 M Potassium phosphate monobasic; 16% PEG 8000; 20% Glycerol
2	AfSMT	SAM	0,12 M Ethylene glycols (0,3M Diethylene glycol; 0,3M Triethylene

	[5,43 mg/mL]	[37,3 µM]	glycol; 0,3M Tetraethylene glycol; 0,3M Pentaethylene glycol); 0,1 M Buffer System 2 pH 7,5 (Sodium HEPES; MOPS (acid)); 37,5% Precipitant Mix 4 (25% MPD; 25% PEG 1000; 25% PEG 3350)
3	AfSMT [5,43 mg/mL]	SAM [37,3 µM]	0,12 M Monosaccharides (0,2M D-Glucose; 0,2M D-Mannose; 0,2M D-Galactose; 0,2M L-Fucose; 0,2M DXylose; 0,2M N-Acetyl-D-Glucosamine); 0,1 M Buffer System 2 pH 7,5 (Sodium HEPES; MOPS (acid)); 37,5% Precipitant Mix 4 (25% MPD; 25% PEG 1000; 25% PEG 3350)
4	AfSMT [5,43 mg/mL]	-	0,2 M Sodium chloride; 0,1 M BIS-Tris pH 5,5; 25% PEG 3350
5	AfSMT [5,43 mg/mL]	SAM [37,3 µM]	0,1 M Amino acids(0,2M DL-Glutamic acid monohydrate; 0,2M DL-Alanine; 0,2M Glycine; 0,2M DL-Lysine monohydrochloride; 0,2M DL-Serine); 0,1 M Buffer System 2 pH 7,5 (Sodium HEPES; MOPS (acid)); 37,5% Precipitant Mix 4 (25% MPD; 25% PEG 1000; 25% PEG 3350)
6	AfSMT [5,43 mg/mL]	SAM [37,3 µM]	0,2 M Sodium citrate tribasic dihydrate; 0,1 M Bis-Tris propane pH 6,5; 20% PEG 3350

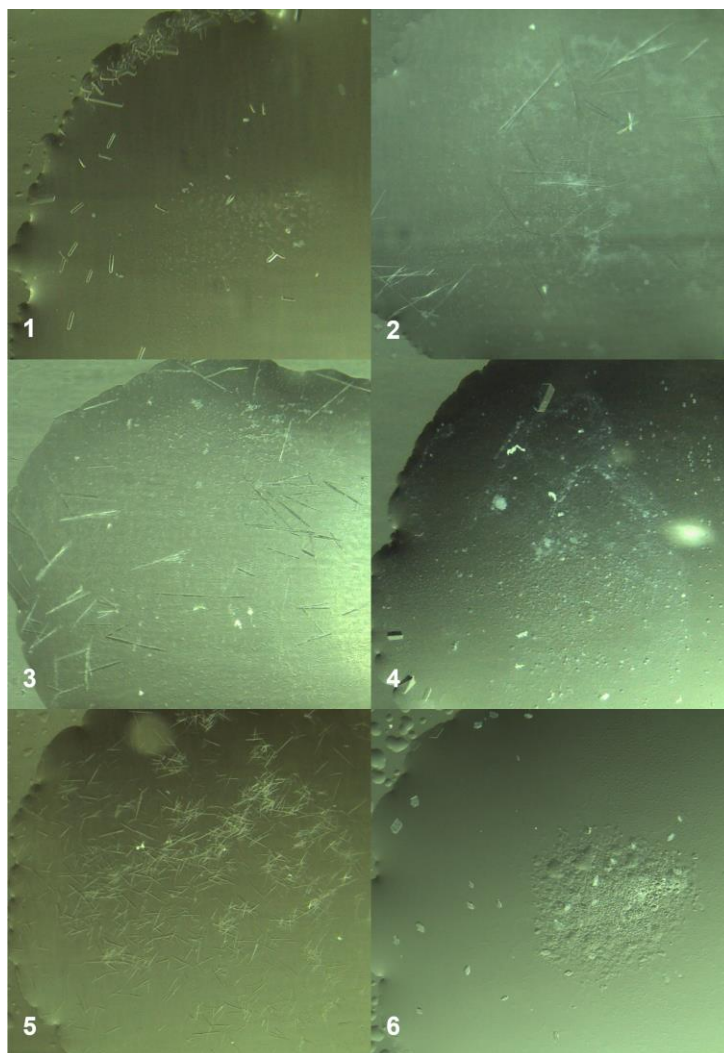


Figura 53. Cristais de AfSMT e AfSMT-SAM obtidos sob as condições de cristalização 1 a 6 (Tabela 13).

5.12.4 Coleta de dados de difração de raios X

Após congelamento em solução crioprotetora, os cristais de CauSMT e AfSMT, tanto com quanto sem o SAM, foram submetidos à difração de raios X, com a coleta de dados realizada pelo detector PILATUS2M®. Alguns cristais exibiram difração, com pontos observados a uma resolução máxima de 7 Å. Conforme previsto, o processamento não gerou dados confiáveis, resultando em um R_{merge} superior a 0,5. O grupo espacial sugerido pertence ao sistema tetragonal; entretanto, devido à baixa qualidade dos dados, não foi possível definir com precisão o grupo espacial. No entanto, a confirmação de que os cristais analisados eram de proteína é promissora, abrindo oportunidades para futuros experimentos que poderão elucidar uma estrutura inédita.

6 CONCLUSÕES

Os estudos estruturais, funcionais e de inibição das esterol C24-metiltransferases dos fungos patogênicos humanos *Candida auris* e *Aspergillus fumigatus* realizados neste trabalho mostraram que:

- A aeração é um fator crítico para a expressão heteróloga da CauSMT e AfSMT.
- Durante a expressão heteróloga, ambas as enzimas formam hetero-oligômeros de alta massa molecular com proteínas de *E. coli*, sendo a interação intermolecular do tipo hidrofóbica.
- O aumento da concentração não é um fator determinante para a formação dos hetero-oligômeros.
- A CauSMT parece ser uma esterol C24-metiltransferase pentamérica em solução.
- A AfSMT parece ser uma C24-metiltransferase tetramérica em solução.
- A CauSMT apresenta maior estabilidade térmica em pH ácido quando comparada à AfSMT. Ambas as enzimas são mais estáveis em pH neutro e não são estáveis em pH básico.
- Em *Candida auris*, a biossíntese do ergosterol ocorre preferencialmente via zimosterol.
- Em *Aspergillus fumigatus*, a biossíntese do ergosterol ocorre preferencialmente via lanosterol.
- A AfSMT apresenta 35 vezes mais afinidade pelo substrato S-adenosil-L-metionina em comparação à constante de afinidade do outro substrato, lanosterol.
- A CauSMT apresenta 4 vezes mais afinidade pelo substrato S-adenosil-L-metionina em comparação à constante de afinidade do outro substrato, zimosterol.

- A CauSMT exibe cinética de Michaelis-Menten, com maior afinidade pelo substrato zimosterol quando comparada à estero C24-metiltransferase de *Candida albicans*.
- A molécula tomatidina apresenta atividade inibitória contra CauSMT, mas não contra AfSMT.
- Cristais de CauSMT e AfSMT foram obtidos em diversas condições de cristalização.
- Cristais de CauSMT e AfSMT com os substratos S-adenosil-L-metionina e zimosterol foram obtidos em várias condições de cristalização.
- Os dados de difração coletados na linha de luz Manacá (LNLS/Sirius) com os cristais de CauSMT co-cristalizados com o substrato S-adenosil-L-metionina apresentaram resoluções de 7 Å.

7 PERSPECTIVAS

- Ensaios de *High Throughput Screening* (HTS) serão realizados com o objetivo de identificar compostos, por meio de triagens em bibliotecas de compostos, com potencial inibitório sobre as esterois C24-metiltransferases de *Candida auris* e *Aspergillus fumigatus*, acelerando o processo de descoberta de novos fármacos para o tratamento de infecções fúngicas invasivas.
- A construção de mutantes será realizada com o objetivo de investigar de forma mais aprofundada os resíduos envolvidos na atividade enzimática e no mecanismo de ação da enzima, permitindo uma melhor compreensão dos determinantes moleculares que influenciam sua função.
- O refinamento das condições de cristalização está sendo realizado para obter cristais que apresentem difrações com melhores resoluções, possibilitando, assim, a elucidação estrutural das proteínas de interesse.
- Análises de dinâmica molecular com os modelos obtidos pelo AlphaFold, acoplados ou não aos ligantes, serão realizadas com o objetivo de compreender as interações conformacionais das enzimas, validar os sítios de interação e identificar mudanças estruturais relevantes que possam ser importantes para sua função e o desenvolvimento de novos inibidores.

8 REFERÊNCIAS

ADLER, Alice J.; GREENFIELD, Norma J.; FASMAN, Gerald D. [27] Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *In: Methods in Enzymology*. [S. l.]: Elsevier, 1973. v. 27, p. 675–735. ISBN 978-0-12-181890-6. DOI 10.1016/S0076-6879(73)27030-1.

AHMAD, Suhail; e ALFOUZAN, Wadha. Candida auris: Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 807, 11 abr. 2021. ISSN 2076-2607. DOI 10.3390/microorganisms9040807.

ALCAZAR-FUOLI, Laura et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 339–347, mar. 2008. ISSN 0039128X. DOI 10.1016/j.steroids.2007.11.005.

ALCAZAR-FUOLI, Laura; e MELLADO, Emilia. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 3, 2013. ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2012.00439.

ARIKAN-AKDAGLI, Sevtap; GHANNOUM, Mahmoud; e MEIS, Jacques. Antifungal Resistance: Specific Focus on Multidrug Resistance in *Candida auris* and Secondary Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 129, 5 dez. 2018. ISSN 2309-608X. DOI 10.3390/jof4040129.

BAILLY, Christian. The steroidal alkaloids α -tomatine and tomatidine: Panorama of their mode of action and pharmacological properties. **Steroids**, [s. l.], v. 176, p. 108933, dez. 2021. ISSN 0039128X. DOI 10.1016/j.steroids.2021.108933.

BALDWIN, Robert L. Energetics of Protein Folding. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 371, n. 2, p. 283–301, ago. 2007. ISSN 00222836. DOI 10.1016/j.jmb.2007.05.078.

BEARDSLEY, Justin; HALLIDAY, Catriona L.; CHEN, Sharon C. A.; e SORRELL, Tania C. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1175–1191, ago. 2018. ISSN 1746-0913, 1746-0921. DOI 10.2217/fmb-2018-0059.

BHABHRA, R.; e ASKEW, D. S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 43, n. s1, p. 87–93, jan. 2005. ISSN 1369-3786, 1460-2709. DOI 10.1080/13693780400029486.

BHATTACHARYA, Somanon; ESQUIVEL, Brooke D.; e WHITE, Theodore C. Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e01291-18, 24 jul. 2018. ISSN 2150-7511. DOI 10.1128/mBio.01291-18.

BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; e FRIES, Bettina C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 312, 9 jun. 2020. ISSN 2079-6382. DOI 10.3390/antibiotics9060312.

BISWAS, Partha S. Vaccine-Induced Immunological Memory in Invasive Fungal Infections – A Dream so Close yet so Far. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 671068, 21 abr. 2021. ISSN 1664-3224. DOI 10.3389/fimmu.2021.671068.

BONGOMIN, Felix; GAGO, Sara; OLADELE, Rita; e DENNING, David. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017. ISSN 2309-608X. DOI 10.3390/jof3040057.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. ISSN 00032697. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3. Acesso em: 4 fev. 2016.

BRASIL. **Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa no 01/2023**. [S. l.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; e WHITE, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 19 dez. 2012. ISSN 1946-6234, 1946-6242. DOI 10.1126/scitranslmed.3004404.

BURKS, Caroline; DARBY, Alexandria; GÓMEZ LONDOÑO, Luisa; MOMANY, Michelle; e BREWER, Marin T.; XUE, Chaoyang (ed.). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. e1009711, 29 jul. 2021. ISSN 1553-7374. DOI 10.1371/journal.ppat.1009711.

CAVASSIN, Francelise B.; BAÚ-CARNEIRO, João Luiz; VILAS-BOAS, Rogério R.; e QUEIROZ-TELLES, Flávio. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. **Infectious Diseases and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 115–147, mar. 2021. ISSN 2193-8229, 2193-6382. DOI 10.1007/s40121-020-00382-7.

CHAYEN, N. E. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 198–202, 1 abr. 1997. ISSN 0021-8898. DOI 10.1107/S0021889896013532.

CHIU, Joy E.; THEKKINIATH, Jose; MEHTA, Sameet; MÜLLER, Christoph; BRACHER, Franz; e BEN MAMOUN, Choukri. The yeast pantothenate kinase Cab1 is a master regulator of sterol metabolism and of susceptibility to ergosterol biosynthesis inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 40, p. 14757–14767, out. 2019. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.RA119.009791.

CIRIGLIANO, Angela et al. Ergosterol reduction impairs mitochondrial DNA maintenance in *S. cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** -

Molecular and Cell Biology of Lipids, [s. l.], v. 1864, n. 3, p. 290–303, mar. 2019. ISSN 13881981. DOI 10.1016/j.bbalip.2018.12.002.

DE ALMEIDA, João N. et al. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 220, 17 mar. 2021. ISSN 2309-608X. DOI 10.3390/jof7030220.

DE MELO, Camylla Carvalho; DE SOUSA, Bruna Rodrigues; DA COSTA, Gisela Lara; OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista; e DE LIMA-NETO, Reginaldo Gonçalves. Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 1033707, 23 jan. 2023. ISSN 2235-2988. DOI 10.3389/fcimb.2023.1033707.

DELANO, WL. **The PyMOL Molecular Graphics System**. [S. l.]: DeLano Scientific, 2008.

DELATTIN, Nicolas; CAMMUE, Bruno Pa; e THEVISSEN, Karin. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 77–90, jan. 2014. ISSN 1756-8919, 1756-8927. DOI 10.4155/fmc.13.189.

DENNING, D. W. et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 1364–1368, jun. 1997. ISSN 0066-4804, 1098-6596. DOI 10.1128/AAC.41.6.1364.

DONG, Guangping et al. Optimization of High-Throughput Methyltransferase Assays for the Discovery of Small Molecule Inhibitors. **ACS Combinatorial Science**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 422–432, 10 ago. 2020. ISSN 2156-8952, 2156-8944. DOI 10.1021/acscombsci.0c00077.

DORSAZ, Stéphane et al. Identification and Mode of Action of a Plant Natural Product Targeting Human Fungal Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 9, p. e00829-17, set. 2017. ISSN 0066-4804, 1098-6596. DOI 10.1128/AAC.00829-17.

DU, Han; BING, Jian; HU, Tianren; ENNIS, Craig L.; NOBILE, Clarissa J.; e HUANG, Guanghua; XUE, Chaoyang (ed.). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. e1008921, 22 out. 2020. ISSN 1553-7374. DOI 10.1371/journal.ppat.1008921.

DUFOURC, Erick J. Sterols and membrane dynamics. **Journal of Chemical Biology**, [s. l.], v. 1, n. 1–4, p. 63–77, nov. 2008. ISSN 1864-6158, 1864-6166. DOI 10.1007/s12154-008-0010-6.

DUPONT, Sebastien; LEMETAIS, Guillaume; FERREIRA, Thierry; CAYOT, Philippe; GERVAIS, Patrick; e BENEY, Laurent. **Data from: Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?** [S. l.]: Dryad, 2012. 29696 bytes. 29696 bytes. DOI 10.5061/DRYAD.PD28PM7N.

EARLE, Kayleigh et al. Pathogenicity and virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 2172264, 31 dez. 2023. ISSN 2150-5594, 2150-5608. DOI 10.1080/21505594.2023.2172264.

ELIAS, Daniel; TOTH HERVAY, Nora; JACKO, Juraj; MORVOVA, Marcela; VALACHOVIC, Martin; e GBELSKA, Yveta. Erg6p is essential for antifungal drug resistance, plasma membrane properties and cell wall integrity in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. foac045, 24 set. 2022. ISSN 1567-1364. DOI 10.1093/femsyr/foac045.

EVANS, Richard et al. **Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer**. [S. l.]: Bioinformatics, 4 out. 2021. DOI 10.1101/2021.10.04.463034.

FAKHIM, Hamed et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. **Mycoses**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 377–382, jun. 2018. ISSN 1439-0507. DOI 10.1111/myc.12754.

FAUST, Georg; STAND, Alexandra; e WEUSTER-BOTZ, Dirk. IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 824–829, nov. 2015. ISSN 16180240. DOI 10.1002/elsc.201500011.

FINN, Robert D. et al. HMMER web server: 2015 update. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. W1, p. W30–W38, 1 jul. 2015. ISSN 0305-1048, 1362-4962. DOI 10.1093/nar/gkv397.

FRYBERG, M.; OEHLISCHLAGER, A. C.; e UNRAU, A. M. Biosynthesis of ergosterol in yeast. Evidence for multiple pathways. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 95, n. 17, p. 5747–5757, ago. 1973. ISSN 0002-7863, 1520-5126. DOI 10.1021/ja00798a051.

GANAPATHY, Kulothungan; JONES, Christopher W.; STEPHENS, Camille M.; VATSYAYAN, Rit; MARSHALL, Julie A.; e NES, W. David. Molecular probing of the *Saccharomyces cerevisiae* sterol 24-C methyltransferase reveals multiple amino acid residues involved with C2-transfer activity. **Biochimica Et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1781, n. 6–7, p. 344–351, jul. 2008. ISSN 0006-3002. DOI 10.1016/j.bbalip.2008.04.015.

GANAPATHY, Kulothungan; KANAGASABAI, Ragu; NGUYEN, Thi Thuy Minh; e NES, W. David. Purification, characterization and inhibition of sterol C24-methyltransferase from *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 505, n. 2, p. 194–201, jan. 2011. ISSN 00039861. DOI 10.1016/j.abb.2010.10.008.

GEORGOPAPADAKOU, Nafsika H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 547–557, out. 1998. ISSN 13695274. DOI 10.1016/S1369-5274(98)80087-8.

GODDARD, Thomas D. et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis: UCSF ChimeraX Visualization System. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 14–25, jan. 2018. ISSN 09618368. DOI 10.1002/pro.3235.

HARGROVE, Tatiana Y.; WAWRZAK, Zdzislaw; LAMB, David C.; GUENGERICH, F. Peter; e LEPESHEVA, Galina I. Structure-Functional Characterization of Cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and Molecular Basis for the Development of Antifungal Drugs. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 39, p. 23916–23934, set. 2015. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M115.677310.

HIRAI, Mitsuhiro et al. Direct Evidence for the Effect of Glycerol on Protein Hydration and Thermal Structural Transition. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 313–327, jul. 2018. ISSN 00063495. DOI 10.1016/j.bpj.2018.06.005.

HSIAO, Kevin; ZEGZOUTI, Hicham; e GOUELI, Said A. Methyltransferase-Glo: a universal, bioluminescent and homogenous assay for monitoring all classes of methyltransferases. **Epigenomics**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 321–339, mar. 2016. ISSN 1750-1911, 1750-192X. DOI 10.2217/epi.15.113.

HSIAO, Kevin; ZEGZOUTI, Hicham; e GOUELI, Said. **High throughput Bioluminescent assay to characterize and monitor the activity of SARS-CoV-2 Methyltransferases**. [S. l.]: Biochemistry, 13 set. 2022. DOI 10.1101/2022.09.12.505486.

HU, Zhihong; HE, Bin; MA, Long; SUN, Yunlong; NIU, Yali; e ZENG, Bin. Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 270–277, set. 2017. ISSN 0046-8991, 0973-7715. DOI 10.1007/s12088-017-0657-1.

IDICULA-THOMAS, Susan; e BALAJI, Petety V. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. **Protein Science**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 582–592, mar. 2005. ISSN 09618368, 1469896X. DOI 10.1110/ps.041009005.

JAYASIMHA, Pruthvi; BOWMAN, C. Bryson; PEDROZA, Julia M.; NES, W. David. Engineering Pathway Enzymes to Understand the Function and Evolution of Sterol Structure and Activity. In: **Recent Advances in Phytochemistry**. [S. l.]: Elsevier, 2006. v. 40, p. 211–251. ISBN 978-0-08-045125-1. DOI 10.1016/S0079-9920(06)80043-2.

JEFFERY-SMITH, Anna et al. *Candida auris*: a Review of the Literature. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. e00029-17, jan. 2018. ISSN 0893-8512, 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.00029-17.

JENSEN-PERGAKES, K. L.; KENNEDY, M. A.; LEES, N. D.; BARBUCH, R.; KOEGEL, C.; e BARD, M. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility

studies in *erg6* mutants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 1160–1167, maio 1998. ISSN 0066-4804.

JIN, Xueyang et al. Characterization of an allosteric inhibitor of fungal-specific C-24 sterol methyltransferase to treat *Candida albicans* infections. **Cell Chemical Biology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 553-568.e7, maio 2023a. ISSN 24519456. DOI 10.1016/j.chembiol.2023.04.010.

JIN, Xueyang; LUAN, Xiaoyi; XIE, Fei; CHANG, Wenqiang; e LOU, Hongxiang; KOVACS, Renato (ed.). *Erg6 Acts as a Downstream Effector of the Transcription Factor Flo8 To Regulate Biofilm Formation in Candida albicans*. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e00393-23, 15 jun. 2023b. ISSN 2165-0497. DOI 10.1128/spectrum.00393-23. Acesso em: 3 jun. 2024.

JONES, Gareth; WILLETT, Peter; GLEN, Robert C.; LEACH, Andrew R.; e TAYLOR, Robin. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997. ISSN 00222836. DOI 10.1006/jmbi.1996.0897.

JORDÁ, Tania; e PUIG, Sergi. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 795, 15 jul. 2020. ISSN 2073-4425. DOI 10.3390/genes11070795.

JUMPER, John et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [s. l.], 2021. DOI 10.1038/s41586-021-03819-2.

KABSCH, Wolfgang; e SANDER, Christian. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dez. 1983. ISSN 0006-3525, 1097-0282. DOI 10.1002/bip.360221211.

KALIPATNAPU, Shanti; e CHATTOPADHYAY, Amitabha. Membrane Protein Solubilization: Recent Advances and Challenges in Solubilization of Serotonin1A Receptors. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 505–512, 1 jul. 2005. ISSN 1521-6543, 1521-6551. DOI 10.1080/15216540500167237.

KANESHIRO, Edna S.; JOHNSTON, Laura Q.; NKININ, Stephenson W.; ROMERO, Becky I.; e GINER, José-Luis. Sterols of *Saccharomyces cerevisiae erg6* Knockout Mutant Expressing the *Pneumocystis carinii* S - Adenosylmethionine: Sterol C-24 Methyltransferase. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 298–306, maio 2015. ISSN 1066-5234, 1550-7408. DOI 10.1111/jeu.12181.

KEIGHLEY, C. et al. *Candida auris*: Diagnostic Challenges and Emerging Opportunities for the Clinical Microbiology Laboratory. **Current Fungal Infection Reports**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 116–126, set. 2021. ISSN 1936-3761, 1936-377X. DOI 10.1007/s12281-021-00420-y.

KELLY, Sharon M.; JESS, Thomas J.; e PRICE, Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins**

and Proteomics, [s. l.], v. 1751, n. 2, p. 119–139, ago. 2005. ISSN 15709639. DOI 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.

KHAN, Ziauddin et al.; KHALAF, Roy Aziz (ed.). Changing trends in epidemiology and antifungal susceptibility patterns of six bloodstream *Candida* species isolates over a 12-year period in Kuwait. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. e0216250, 1 maio 2019. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0216250.

KODEDOVÁ, Marie; e SYCHROVÁ, Hana; SOVERAL, Graça (ed.). Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. e0139306, 29 set. 2015. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0139306.

KONECNA, Alexandra; TOTH HERVAY, Nora; VALACHOVIC, Martin; e GBELSKA, Yveta. *ERG6* gene deletion modifies *Kluyveromyces lactis* susceptibility to various growth inhibitors: *ERG6* gene in *Kluyveromyces lactis* susceptibility. **Yeast**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 621–632, dez. 2016. ISSN 0749503X. DOI 10.1002/yea.3212.

KONZ, J. O.; KING, J.; e COONEY, C. L. Effects of Oxygen on Recombinant Protein Expression. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 393–409, 5 jun. 1998. ISSN 8756-7938. DOI 10.1021/bp980021l.

KOSELNY, Kristy; MUTLU, Nebibe; MINARD, Annabel Y.; KUMAR, Anuj; KRYSAN, Damian J.; e WELLINGTON, Melanie; LORENZ, Michael (ed.). A Genome-Wide Screen of Deletion Mutants in the Filamentous *Saccharomyces cerevisiae* Background Identifies Ergosterol as a Direct Trigger of Macrophage Pyroptosis. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e01204-18, 5 set. 2018. ISSN 2161-2129, 2150-7511. DOI 10.1128/mBio.01204-18.

KRAUSE, Mirja; NEUBAUER, Antje; e NEUBAUER, Peter. The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 110, dez. 2016. ISSN 1475-2859. DOI 10.1186/s12934-016-0513-8.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. ISSN 0028-0836. DOI 10.1038/227680a0.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [s. l.], v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 1 nov. 2007. ISSN 1367-4811. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.

LATGÉ, Jean-Paul. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 310–350, abr. 1999. ISSN 0893-8512, 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.12.2.310.

LATGÉ, Jean-Paul; e CHAMILOS, Georgios. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. e00140-18, 18 dez. 2019. ISSN 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.00140-18.

LEAVER, David. Synthesis and Biological Activity of Sterol 14 α -Demethylase and Sterol C24-Methyltransferase Inhibitors. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1753, 17 jul. 2018. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules23071753.

LESTRADE, P. P. A.; MEIS, J. F.; MELCHERS, W. J. G.; e VERWEIJ, P. E. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 799–806, jul. 2019. ISSN 1198743X. DOI 10.1016/j.cmi.2018.11.027.

LIU, Jun-Feng; XIA, Jun-Jie; NIE, Kai-Li; WANG, Fang; e DENG, Li. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 98, jul. 2019. ISSN 0959-3993, 1573-0972. DOI 10.1007/s11274-019-2673-2.

LOCKHART, Shawn R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 134–140, 15 jan. 2017. ISSN 1537-6591. DOI 10.1093/cid/ciw691.

MARTIN, J. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 783–793, 1 dez. 2002. ISSN 0959440X. DOI 10.1016/S0959-440X(02)00391-3.

MAXFIELD, Frederick R.; e TABAS, Ira. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**, [s. l.], v. 438, n. 7068, p. 612–621, 1 dez. 2005. ISSN 0028-0836, 1476-4687. DOI 10.1038/nature04399.

MCCAMMON, M. T.; HARTMANN, M. A.; BOTTEMA, C. D.; e PARKS, L. W. Sterol methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 157, n. 2, p. 475–483, fev. 1984. ISSN 0021-9193, 1098-5530. DOI 10.1128/jb.157.2.475-483.1984.

MESA-ARANGO, Ana C.; SCORZONI, Liliana; e ZARAGOZA, Oscar. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 3, 2012. ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2012.00286.

MICSONAI, András et al. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2 jul. 2018. ISSN 0305-1048, 1362-4962. DOI 10.1093/nar/gky497.

MIRDITA, Milot; SCHÜTZE, Konstantin; MORIWAKI, Yoshitaka; HEO, Lim; OVCHINNIKOV, Sergey; e STEINEGGER, Martin. ColabFold: Making Protein

folding accessible to all. **Nature Methods**, [s. l.], 2022. DOI 10.1038/s41592-022-01488-1.

NEELAKANDAN, Anjanasree K. et al. Cloning, functional expression and phylogenetic analysis of plant sterol 24C-methyltransferases involved in sitosterol biosynthesis. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 70, n. 17–18, p. 1982–1998, dez. 2009. ISSN 00319422. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.09.003.

NES, W. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1529, n. 1–3, p. 63–88, 15 dez. 2000. ISSN 13881981. DOI 10.1016/S1388-1981(00)00138-4.

NES, W. David. Enzyme mechanisms for sterol C -methylations. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 75–95, set. 2003. ISSN 00319422. DOI 10.1016/S0031-9422(03)00349-2.

NES, W. David et al. Sterol Methyltransferase: Functional Analysis of Highly Conserved Residues by Site-Directed Mutagenesis. **Biochemistry**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 569–576, 1 jan. 2004. ISSN 0006-2960, 1520-4995. DOI 10.1021/bi035257z.

NES, W. D. Enzyme redesign and interactions of substrate analogues with sterol methyltransferase to understand phytosterol diversity, reaction mechanism and the nature of the active site. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 33, n. Pt 5, p. 1189–1196, nov. 2005. ISSN 0300-5127. DOI 10.1042/BST20051189.

NES, W. David et al. Sterol 24-C-methyltransferase: An enzymatic target for the disruption of ergosterol biosynthesis and homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 481, n. 2, p. 210–218, jan. 2009. ISSN 00039861. DOI 10.1016/j.abb.2008.11.003.

NES, W. David; JAYASIMHA, Pruthvi; e SONG, Zhihong. Yeast sterol C24-methyltransferase: Role of highly conserved tyrosine-81 in catalytic competence studied by site-directed mutagenesis and thermodynamic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 477, n. 2, p. 313–323, set. 2008. ISSN 00039861. DOI 10.1016/j.abb.2008.05.016.

NGUYEN, Stephanie; TRUONG, Jia Q.; e BRUNING, John B. Targeting Unconventional Pathways in Pursuit of Novel Antifungals. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 7, p. 621366, 12 jan. 2021. ISSN 2296-889X. DOI 10.3389/fmolb.2020.621366.

NUCCI, Marcio; e PERFECT, John R. When Primary Antifungal Therapy Fails. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 1426–1433, maio 2008. ISSN 1058-4838, 1537-6591. DOI 10.1086/587101.

O'BEIRNE, D.; e HAMER, G. Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W3110: A problem exacerbated by scale-up. **Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 487–494, 22 nov. 2000. ISSN 16157591. DOI 10.1007/s004499900185.

OLIVEIRA, Fabiana Freire M. et al. Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 140, p. 103368, jul. 2020. ISSN 10871845. DOI 10.1016/j.fgb.2020.103368.

OSTROSKY-ZEICHNER, Luis; CASADEVALL, Arturo; GALGANI, John N.; ODDS, Frank C.; e REX, John H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 719–727, set. 2010. ISSN 1474-1776, 1474-1784. DOI 10.1038/nrd3074.

PALMIERI, Fabio; KOUTSOKERA, Angela; BERNASCONI, Eric; JUNIER, Pilar; VON GARNIER, Christophe; e UBAGS, Niki. Recent Advances in Fungal Infections: From Lung Ecology to Therapeutic Strategies With a Focus on *Aspergillus* spp. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 9, p. 832510, 21 mar. 2022. ISSN 2296-858X. DOI 10.3389/fmed.2022.832510.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. e1–e50, 15 fev. 2016. ISSN 1537-6591, 1058-4838. DOI 10.1093/cid/civ933.

PEREIRA, Maristela et al. Cloning, mechanistic and functional analysis of a fungal sterol C24-methyltransferase implicated in brassicasterol biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1801, n. 10, p. 1163–1174, out. 2010. ISSN 13881981. DOI 10.1016/j.bbalip.2010.06.007. Acesso em: 12 nov. 2017.

PERFECT, John R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 603–616, set. 2017. ISSN 1474-1776, 1474-1784. DOI 10.1038/nrd.2017.46.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004. ISSN 0192-8651. DOI 10.1002/jcc.20084.

PFALLER, M. A.; e DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 133–163, jan. 2007. ISSN 0893-8512, 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.00029-06.

RAKSHA, null; SINGH, Gurjeet; e URHEKAR, A. D. Virulence Factors Detection in *Aspergillus* Isolates from Clinical and Environmental Samples. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. DC13–DC18, jul. 2017. ISSN 2249-782X. DOI 10.7860/JCDR/2017/24055.10211.

ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D.; e COWEN, Leah E.; HEITMAN, Joseph (ed.). Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 4, n. 5, 4.5.19, 14 out. 2016. ISSN 2165-0497. DOI 10.1128/microbiolspec.FUNK-0002-2016. Acesso em: 26 jul. 2023.

ROBERT, Xavier; e GOUET, Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. Web Server issue, p. W320-324, jul. 2014. ISSN 1362-4962. DOI 10.1093/nar/gku316.

ROCHA, Wilma Raianny Vieira da; NUNES, Luanne Eugênia; NEVES, Marina Luízy Rocha; XIMENES, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo; e ALBUQUERQUE, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e43910414283, 17 abr. 2021. ISSN 2525-3409. DOI 10.33448/rsd-v10i4.14283.

RODRIGUES, Marcio L. The Multifunctional Fungal Ergosterol. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. e01755-18, 7 nov. 2018. ISSN 2161-2129, 2150-7511. DOI 10.1128/mBio.01755-18.

SATOH, Kazuo; MAKIMURA, Koichi; HASUMI, Yayoi; NISHIYAMA, Yayoi; UCHIDA, Katsuhisa; e YAMAGUCHI, Hideyo. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 41–44, jan. 2009. ISSN 0385-5600. DOI 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.

SCHUBERT, Heidi L.; BLUMENTHAL, Robert M.; e CHENG, Xiaodong. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 329–335, jun. 2003. ISSN 0968-0004. DOI 10.1016/S0968-0004(03)00090-2.

SCHWARZ, Patrick; JANBON, Guilhem; DROMER, Françoise; LORTHOLARY, Olivier; e DANNAOUI, Eric. Combination of Amphotericin B with Flucytosine Is Active In Vitro against Flucytosine-Resistant Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 383–385, jan. 2007. ISSN 0066-4804, 1098-6596. DOI 10.1128/AAC.00446-06.

SHAPIRO, Rebecca S.; ROBBINS, Nicole; e COWEN, Leah E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 213–267, jun. 2011. ISSN 1092-2172, 1098-5557. DOI 10.1128/MMBR.00045-10.

SILVER, Peter M.; OLIVER, Brian G.; e WHITE, Theodore C. Role of *Candida albicans* Transcription Factor Upc2p in Drug Resistance and Sterol Metabolism. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 1391–1397, dez. 2004. ISSN 1535-9778, 1535-9786. DOI 10.1128/EC.3.6.1391-1397.2004.

SORIANO, Alex et al. Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 1569–1585, 5 jul. 2023. ISSN 0305-7453, 1460-2091. DOI 10.1093/jac/dkad139.

STUDIER, F. William. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 207–234, maio 2005. ISSN 10465928. DOI 10.1016/j.pep.2005.01.016.

SUN, Qiu; HUANG, Mengyuan; e WEI, Yuquan. Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 632–650, mar. 2021. ISSN 22113835. DOI 10.1016/j.apsb.2020.08.011.

TARKOWSKÁ, Danuše; e STRNAD, Miroslav. Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones. **Planta**, [s. l.], v. 244, n. 3, p. 545–555, set. 2016. ISSN 0032-0935, 1432-2048. DOI 10.1007/s00425-016-2561-z.

TORTORANO, Anna Maria; PRIGITANO, Anna; MORRONI, Gianluca; BRESCINI, Lucia; e BARCHIESI, Francesco. Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], Volume 14, p. 5543–5553, dez. 2021. ISSN 1178-6973. DOI 10.2147/IDR.S274872.

TROTT, Oleg; e OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010. ISSN 1096-987X. DOI 10.1002/jcc.21334.

TSAL, Chung-Jung; LIN, Shuo Liang; WOLFSON, Haim J.; e NUSSINOV, Ruth. Studies of protein-protein interfaces: A statistical analysis of the hydrophobic effect: Protein-protein interfaces: The hydrophobic effect. **Protein Science**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 53–64, jan. 1997. ISSN 09618368. DOI 10.1002/pro.5560060106.

UNDEN, G.; BECKER, S.; BONGAERTS, J.; HOLIGHAUS, G.; SCHIRAWSKI, J.; e SIX, S. O₂-Sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 81–90, 1 ago. 1995. ISSN 0302-8933, 1432-072X. DOI 10.1007/s002030050238.

VAGENENDE, Vincent; YAP, Miranda G. S.; e TROUT, Bernhardt L. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 46, p. 11084–11096, 24 nov. 2009. ISSN 0006-2960, 1520-4995. DOI 10.1021/bi900649t.

VERMES, A. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 171–179, 1 ago. 2000. ISSN 14602091. DOI 10.1093/jac/46.2.171.

WHITE, Theodore C.; MARR, Kieren A.; e BOWDEN, Raleigh A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 382–402, abr. 1998. ISSN 0893-8512, 1098-6618. DOI 10.1128/CMR.11.2.382.

WIEDERHOLD, Nathan P. Epidemiology and Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*: What Is Our Understanding of the Situation? **Current Fungal Infection Reports**, [s. l.], 29 maio 2023. ISSN 1936-3761, 1936-377X. DOI 10.1007/s12281-023-00469-x.

WOODY, Robert W.; DUNKER, A. Keith. Aromatic and Cystine Side-Chain Circular Dichroism in Proteins. *In*: FASMAN, Gerald D. (ed.). **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. Boston, MA: Springer US, 1996. p. 109–157. ISBN 978-1-4419-3249-5. DOI 10.1007/978-1-4757-2508-7_4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. [S. l.: s. n.], 2022. Acesso em: 17 jul. 2023.

XIE, Jinhong et al. The sterol C-24 methyltransferase encoding gene, *erg6*, is essential for viability of *Aspergillus* species. **Nature Communications**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 4261, 20 maio 2024. ISSN 2041-1723. DOI 10.1038/s41467-024-48767-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-48767-3>. Acesso em: 3 jun. 2024.

YOUNG, L.; JERNIGAN, R. L.; e COVELL, D. G. A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition: Using surface hydrophobicity to locate ligand attachment sites. **Protein Science**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 717–729, maio 1994. ISSN 09618368. DOI 10.1002/pro.5560030501.

YUE, Huizhen et al. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 188, 28 nov. 2018. ISSN 2222-1751. DOI 10.1038/s41426-018-0187-x.

ZHOU, Wenxu et al. Mechanism-based Enzyme Inactivators of Phytosterol Biosynthesis. **Molecules**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 185–203, 31 mar. 2004. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/90400185.

ZHOU, Wenxu; LEPESHEVA, Galina I.; WATERMAN, Michael R.; e NES, W. David. Mechanistic Analysis of a Multiple Product Sterol Methyltransferase Implicated in Ergosterol Biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 10, p. 6290–6296, mar. 2006. ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M511749200.

ZINSER, E.; PALTAUF, F.; e DAUM, G. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 175, n. 10, p. 2853–2858, maio 1993. ISSN 0021-9193, 1098-5530. DOI 10.1128/jb.175.10.2853-2858.1993.

9 APÊNDICES

a) Scores de *docking* dos substratos lanosterol e SAM com a AfSMT.

Pose	Lanosterol	SAM
GOLD fitness score		
1	46,63	78,47
2	59,40	80,77
3	63,36	79,18
4	-57,00	77,03
5	-99,76	87,74
6	-92,30	82,51
7	-93,21	81,38
8	-106,06	81,22
9	-98,14	62,25
10	-104,53	60,43
11	-124,56	60,92
12	-113,83	62,38

b) Scores do docking dos substratos zimosterol e SAM, e do inibidor tomatidina com a CauSMT.

Pose	Zimosterol	Tomatidina	SAM
Afinidade (kcal/mol)			
1	-13.6	-14.5	-7.7
2	-12.6	-13.6	-7.4
3	-11.6	-12.6	-7.2
4	-11.5	-12.1	-7.2
5	-11.5	-11.6	-7.2
6	-11.4	-11.5	-7.2
7	-11.3	-11.4	-7.1
8	-10.6	-10.9	-7.0
9	-10.2	-10.7	-7.0
10	-10.2	-10.1	-7.0
11	-10.1	-9.7	-7.0
12	-9.9	-9.4	-7.0
13	-9.6	-9.2	-7.0
14	-9.6	-9.0	-6.9
15	-9.6	-8.9	-6.9
16	-9.3	-8.9	-6.9
17	-9.2	-8.8	-6.8
18	-9.2	-8.5	-6.8
19	-9.1	-8.4	-6.8
20	-9.1	-8.4	-6.7

c) Produção e purificação da enzima esterol C24-metiltransferase de *Paracoccidioides lutzii* (PISMT)

As células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET21a-PISMT (construção GS44872 sintetizada em outubro de 2009 (Figura 1)), foram inoculadas em meio LB, induzidas com IPTG 1 mM e incubadas a 37 °C.

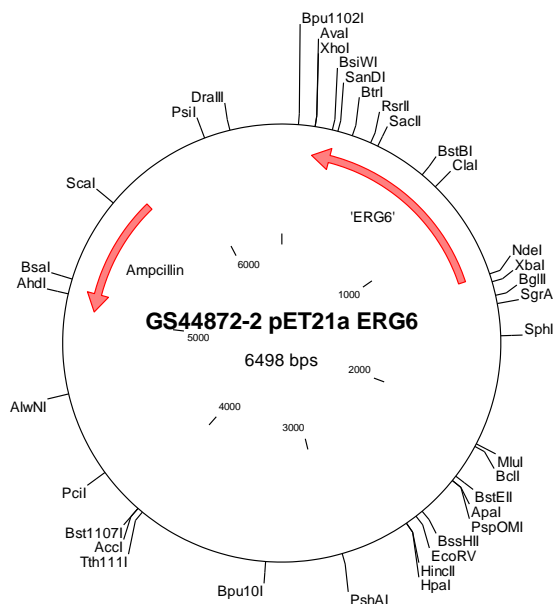


Figura 1: Plasmídeo de expressão pET21a contendo o gene *erg6* do fungo *Paracoccidioides lutzii*.

A amostra foi coletada após 6 h da indução. Para avaliar a solubilidade da proteína, as células de *E. coli* foram lisadas e centrifugadas. Em seguida, os precipitados celulares e sobrenadantes resultantes foram analisados em SDS PAGE 12%. Ao observar por meio do perfil de proteínas totais da *E. coli*, que a proteína heteróloga provavelmente tinha sido produzida, o sobrenadante foi aplicado na coluna de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Observa-se na figura 2 que a PISMT foi eluída totalmente no *flow through*, ou seja, não houve interação da proteína com a coluna.

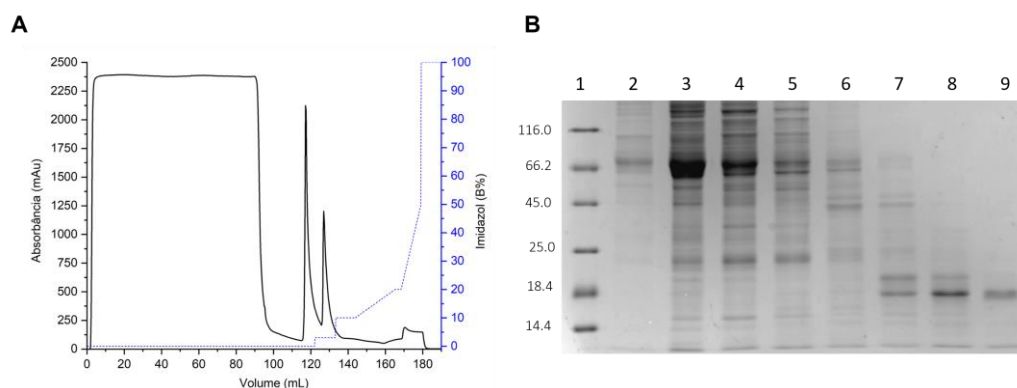


Figura 2: Purificação da PISMT. A) Perfil cromatográfico da purificação por IMAC. **B)** Análise em SDS PAGE 15% mostrando o perfil de proteínas obtidas durante o processo de purificação. Marcador Molecular (1); Precipitados celulares (frações insolúveis) (2); sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (frações solúveis) (3); Flow through (4); Frações eluídas (5 a 8).

Diante desse dado, foram testados diversos métodos de purificação como de cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular que resultaram na não purificação da enzima estudada, ou seja, o perfil proteico permaneceu o mesmo da amostra injetada. Objetivando verificar se a proteína produzida é a PISMT com cauda de histidina, foram realizados vários ensaios imunológicos de *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina e os resultados foram negativos. Além disso, a frequência de códons raros para *E. coli* foi realizada por meio do %MinMax Codon calculator disponibilizado no site <http://www.codons.org/>. Como pode ser observado na figura 3, a presença de códon raros ao longo do gene.

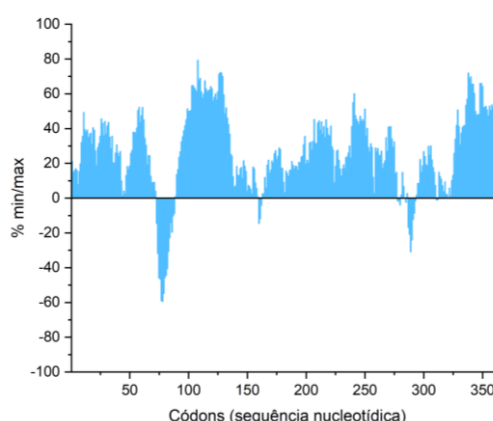


Figura 3: Análise dos códons do gene da PISMT. %Max (>0) correspondem a agrupamentos de códons comuns; %Min (<0) correspondem a códons raros.

Os diversos resultados não esperados levaram a não continuação dos experimentos com essa construção.

d) Síntese, transformação, produção e teste de solubilidade das esterol C24-metiltransferases de cinco fungos patogênicos humanos.

Os genes *erg6* que codificam para as enzimas esterol C24-metiltransferases dos fungos foram selecionados do banco de dados Uniprot. Após análises das sequências, os genes foram clonados no vetor de pET28a. As células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com os plasmídeos pET28a-SMTs, as colônias selecionadas foram inoculadas em meio autoindutor ZYM-5052 e incubadas a 37 °C por 16h. Para avaliar a solubilidade das proteínas, as células de *E. coli* foram lisadas e centrifugadas. Em seguida, os precipitados celulares e sobrenadantes resultantes foram analisados em SDS PAGE 12%. Nas figuras 4A e 4B pode-se observar por meio do perfil de proteínas totais da *E. coli*, que a esterol C24-metiltransferases de *Coccidioides immitis* (CiSMT) e de *Cryptococcus neoformans* (CnSMT) foram produzidas correspondente ao tamanho de 46,9 e 42,9 kDa, respectivamente. A SMT de *Pneumocystis jiroveci* não foi produzida (Figura 4C). Diferentemente, a SMT de *Candida albicans* (CaSMT) e de *Paracoccidioides lutzii* (PISMT) foram produzidas, ambas com 46,9 e 46,2 kDa, respectivamente (Figura 4D e 4E). Percebe-se que as proteínas de interesse está presente na fração insolúvel, indicando a formação de corpos de inclusão.

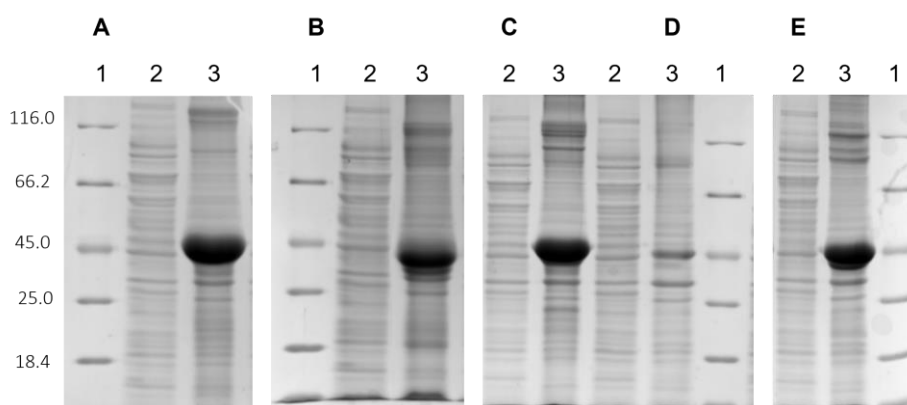


Figura 4: Produção das enzimas esterol C24-metiltransferase dos principais fungos patogênicos humanos. (A) CiSMT (B) CnSMT (C) PjSMT (D) CaSMT (E) PISMT. Marcador Molecular (1). Sobrenadante das células lisadas e centrifugadas após cultivo (frações solúveis) (2). Precipitados celulares (frações insolúveis) (3).

e) Análise de mudanças conformacionais resultantes da interação do cofator NADPH com as enzimas tioredoxina redutase de *Candida albicans* (CaTrxR) e *Cryptococcus neoformans* (CnTrxR) em complexo com o cofator FAD.

As CaTrxR e CnTrxR foram produzidas e purificadas conforme protocolo pré-estabelecido pela Dra. Cláudia Bravo-Chaucanes et al, 2017 (ver se é a data da tese). O efeito da interação do cofator NADPH na estrutura das tioredoxinas redutases foi analisado por meio de cromatografia de exclusão molecular. Como pode ser observado na figura 5, os volumes de eluição do complexo CaTrxR-FAD-NADPH e CnTrxR-FAD-NADPH divergem quando se comparado aos complexos CaTrxR-FAD e CnTrxR-FAD, corroborando então, com estudos anteriores dos quais descrevem que a TrxR apresenta duas conformações distintas: conformação oxidada (FO) no qual o NADPH encontra-se espacialmente distante do FAD, e o FAD está orientado para a transferência de elétrons para o dissulfeto da TrxR, e na conformação reduzida (FR), onde os dois cofatores estão em contato e permite a redução do FAD pelo NADPH e a da Trx pela TrxR.

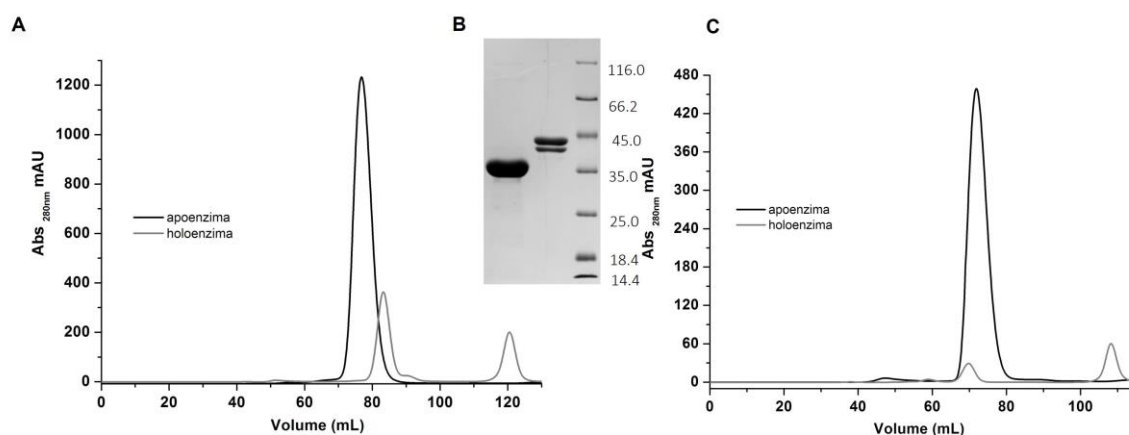


Figura 5: Efeito do cofactor NADPH na estrutura da CaTrxR e CnTrxR analisado por cromatografia de exclusão molecular. (A) Sobreposição dos dois cromatogramas de CaTrxR-FAD e CaTrxR-FAD-NADPH. (B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12 % resultante da purificação dos complexos de ambas as enzimas. (C) Sobreposição dos dois cromatogramas de CnTrxR-FAD e CnTrxR-FAD-NADPH.

A caracterização termodinâmica da interação do cofator NADPH foi realizada por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Como pode ser observado na figura 6 que a energia livre de Gibbs negativa confirma que a interação do NADPH com o CaTrxR-FAD é favorável e espontânea.

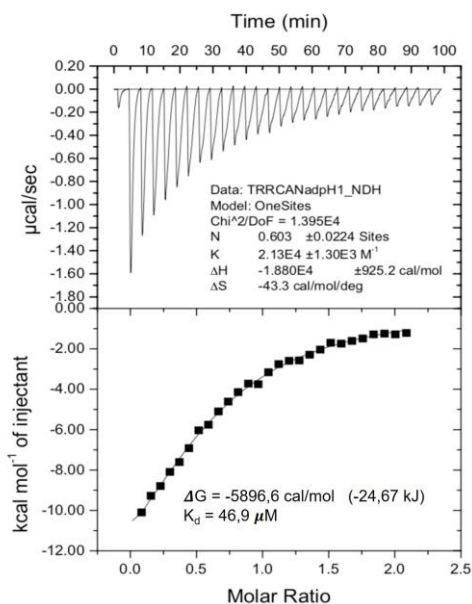


Figura 6: Análise de calorimetria de titulação isotérmica de CaTrxR-FAD mais NADPH.
Parâmetros termodinâmicos obtidos para a interação de NADPH com CaTrxR.

Diversos ensaios de cocristalização da CnTrxR-FAD e CaTrxR-FAD com o cofator NADPH foram realizados não sendo obtido cristais.

Biophysical Journal
Supports open access

Structural Characterization and Crystallization of Human TMPRSS2 Protease

Gideane Mendes de Oliveira • Aisel Valle Garay • Amanda Araújo Souza • ... de Freitas • João Alexandre • Ribeiro Gonçalves Barbosa • Show all authors

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3102>

Article Info

Related Articles

TMPRSS2 is a transmembrane serine protease predominantly associated with the luminal face membrane of the prostatic epithelium. The TMPRSS2 gene is androgen-driven and overexpressed in patients with prostate cancer. This protease induces tumorigenesis through the proteolytic conversion of proHGF, activation of c-Met signaling and engagement of the PI3K-Akt-mTOR pathway. The enzyme participates in viral infection by performing cleavage and activation of glycoproteins. Due to its crucial role in prostate cancer and viral replication, structural studies of TMPRSS2 are a strategic part of the design of potent and selective therapeutic drugs. Thus, the objectives of this work were to express, purify and perform structural studies of the protease domain of TMPRSS2. The gene corresponding to the zymogen of the catalytic extracellular domain was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The solubilized protease was purified and renatured by affinity chromatography. The secondary structure profile of TMPRSS2 was determined by circular dichroism (CD). These studies showed changes in the secondary structure to abroad pH variation, and thermostability between 25 and 95°C. In addition, the homology modeling of the catalytic domain of TMPRSS2 and docking with the benzamidine inhibitor was performed. The model is in agreement with the content of the secondary structure found in the CD experiments. The predicted TMPRSS2-benzamidine complex showed the residue Asp189 present at the S1 site binds form hydrogen bonds to the amidine group of the inhibitor, as in other trypsin-like enzymes. The TMPRSS2 was crystallized from sitting drops and the reservoir solution composed of 50 % PEG 200, 100 mM Potassium Phosphate and Sodium pH 6.2 and 200 mM Sodium Chloride. Afterwards, the protein tridimensional structure is going to be defined and inhibition assays are going to be realized aiming to find potent and selective drugs for the TMPRSS2.

Article Info

Biophysical Journal
Supports open access

This journal Journals Publish News & events About

ABSTRACT VOLUME 114, ISSUE 3, SUPPLEMENT 1, 567A, FEBRUARY 02, 2018

The Functional Characterization of the Heterologous Acid Phosphatase from *Trichoderma harzianum*

Amanda A. Souza • Viviane Castelo Reis • Marcelo Soller Henrique Ramada • Gideane Mendes Oliveira • Azadeh Mehdad • Fernando Araripe Torres • Cirano José Ulhoa • Raphaela De Castro Georg • Sonia Maria De Freitas • Show less

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3100>

Structural and functional characterization of a novel lipolytic enzyme from a Brazilian Cerrado soil metagenomic library

Paula Istvan · Amanda Araújo Souza · Aisel Valle Garay · Debora Farage Knupp dos Santos · Gideane Mendes de Oliveira · Renata Henrique Santana · Fabyano Alvares Cardoso Lopes · Sonia Maria de Freitas · João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa · Ricardo Henrique Krüger

Received: 6 April 2018 / Accepted: 25 July 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract

Objective To isolate putative lipase enzymes by screening a Cerrado soil metagenomic library with novel features.

Results Of 6720 clones evaluated, Clone W (10,000 bp) presented lipolytic activity and four predicted coding sequences, one of them LipW. Characterization of a predicted esterase/lipase, LipW, showed 28% sequence identity with an arylesterase from *Pseudomonas fluorescens* (pdb13HEA) from protein database (PDB). Phylogenetic analysis showed LipW clustered with family V lipases; however, LipW was clustered in different subclade belonged to family V, suggesting a different subgroup of family V. In

addition, LipW presented a difference in family V GH motif, a glycine replaced by a serine in GH motif. Estimated molecular weight and Stokes radius values of LipW were 29,338.67–29,411.98 Da and 2.58–2.83 nm, respectively. Optimal enzyme activity was observed at pH 9.0–9.5 and at 40 °C. Circular dichroism analysis estimated secondary structures percentages as approximately 45% α -helix and 15% β -sheet, consistent with the 3D structure predicted by homology.

Conclusion Our results demonstrate the isolation of novel family V lipolytic enzyme with biotechnological applications from a metagenomic library.

Keywords Cerrado · Lipolytic enzymes · Metagenome · Soil

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2598-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Istvan · D. F. K. dos Santos · F. A. C. Lopes · R. H. Krüger (✉)
Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Instituto Central de Ciências Sul, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, DF 70091-900, Brazil
✉-mail: kruger@unb.br

A. A. Souza · A. V. Garay · G. M. de Oliveira · S. M. de Freitas · J. A. R. G. Barbosa
Laboratório de Biofísica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

R. H. Santana
Instituto Federal de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Published online: 30 July 2018

Introduction

The global market for industrial enzymes has grown significantly and is expected to reach USD 6.3 billion in 2021 (Dewan 2017). The biotechnological potential of industrial enzymes relies on improved processes, efficient microbial producing species, the orientation of enzymes to specific reactions, metabolic engineering, and metagenomics (Xing et al. 2012; Borrelli and Trono 2015). Industrial enzymes produced with the help of genetically modified organisms are used in various sectors (e.g., pharmaceuticals, detergents,

 Springer



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste

Sadia Fida Ullah^a, Amanda Araújo Souza^b, Pedro Ricardo V. Hamann^a, Alonso Roberto P. Ticona^a, Gideane M. Oliveira^b, Joao Alexandre R.G. Barbosa^b, Sonia M. Freitas^b, Eliane Ferreira Noronha^{a,*}

^a Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, DF, Brazil

^b Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Cellular Biology, University of Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2018

Received in revised form 28 December 2018

Accepted 11 January 2019

Available online 14 January 2019

Keywords:

Biotechnological products

Lignocellulosic biomass

Phenolic compounds

Protein structural stability

Secondary structure

Xylanase

ABSTRACT

Commercial interest in plant cell wall degrading enzymes (PCWDE) is motivated by their potential for energy or bioproduct generation that reduced dependency on non-renewable (fossil-derived) feedstock. Therefore, underlying work analysed the *Penicillium chrysogenum* isolate for PCWDE production by employing different biomass as a carbon source. Among the produced enzymes, three xylanase isoforms were observed in the culture filtrate containing sugarcane bagasse. Xylanase (PcX1) presenting 35 kDa molecular mass was purified by gel filtration and anion exchange chromatography. Unfolding was probed and analysed using fluorescence, circular dichroism and enzyme assay methods. Secondary structure contents were estimated by circular dichroism 45% α -helix and 10% β -sheet, consistent with the 3D structure predicted by homology. PcX1 optimally active at pH 5.0 and 30 °C, presenting $t_{1/2}$ 19 h at 30 °C and 6 h at 40 °C. Thermodynamic parameters/melting temperature 51.4 °C confirmed the PcX1 stability at pH 5.0. PcX1 have a higher affinity for oat spelt xylan, K_M 1.2 mg·mL⁻¹, in comparison to birchwood xylan K_M 29.86 mg·mL⁻¹, activity was inhibited by Cu²⁺ and activated by Zn²⁺. PcX1 exhibited significant tolerance for vanillin, *trans*-ferulic acid, *p*-coumaric acid, syringaldehyde and 4-hydroxybenzoic acid, activity slightly inhibited (17%) by gallic and tannic acid.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plant cell wall degrading enzymes (PCWDE) can be applied to different industrial processes. Therefore, there is a crescent demand of these enzymes, especially PCWDE presenting kinetic properties compatible with industrial processes. The alternative use of lignocellulosic biomass as a source of fermentable sugars to produce second generation ethanol and chemicals derived from lignocellulose and hemicelluloses also boost the search for PCWDE to deconstruct the feedstock [1]. Lignocellulosic biomass is daily produced and accumulated as a result of agro-industrial activities around the world and might be used as raw material to obtain a set of products with commercial value. Lignocellulose is composed of cellulose (45–60%), hemicellulose (20–40%), pectin (5–10%) and lignin (10–40%) [2]. Cellulose filaments are tightly linked and microfibrils are covered by hemicelluloses, pectin and lignin. It hampers their degradation and contributes to plant cell wall recalcitrance, one of the major limitation in the conversion of lignocellulosic biomass to value-added products [3]. Microorganisms are able to deconstruct lignocellulosic biomass by employing a consortium of enzymes, acts in synergism to depolymerise this complex material. At

first, considered as accessory activities, hemicelluloses degrading enzymes including xylanases are essential to complete the deconstruction of lignocellulose [4].

Hemicelluloses hydrolysing enzymes are classified into *endo*- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8), β -xylosidases (EC 3.2.1.37), and debranching enzymes, including α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), L-arabinase, feruloyl esterase (EC 3.1.1.73) and *p*-coumaric esterase (EC 3.1.1.1). *Endo*- β -1,4-xylanases catalyse the hydrolysis of β -1,4 linkages of xylan backbone. This cleavage is not random and depends on the nature of substrate, size ramification of the chain, as well as the degree of branching [5]. These enzymes are classified into GH10 and GH11 glycoside hydrolases families. In general, GH10 xylanases are characterised as a higher molecular mass (M_m > 30 kDa), lower *pI* values with a three-dimensional folding in barrel (β/α), whereas GH11 presents a lower molecular mass (M_m < 30 kDa), higher *pI* value of xylanases and three-dimensional folding in β -jelly-roll [6].

Previous literature has largely debated the *Trichoderma* and *Aspergillus* species particularly efficient in the production of cellulases and their ability to deconstruct the lignocellulose [8,9]. However, other species are also focused of the research due to their potential to produce in addition to cellulases, hemicellulases and lignin active enzymes [7–10].

Penicillium species, such as *Penicillium chrysogenum*, studied previously as a source of antimicrobial activities, nowadays are gaining

* Corresponding author.

E-mail address: enoronha@unb.br (E.F. Noronha).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Functional and structural characterization of a novel GH3 β -glucosidase from the gut metagenome of the Brazilian Cerrado termite *Syntermes wheeleri*

Raul Alcântara Teixeira Lima^a, Gideane De Oliveira^a, Amanda Araújo Souza^a, Fabyano Alvares Cardoso Lopes^b, Renata Henrique Santana^{c,d}, Paula Istvan^{a,e}, Betania Ferraz Quirino^f, João Barbosa^a, Sonia De Freitas^a, Aisel Valle Garay^a, Ricardo Henrique Krüger^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Darcy Ribeiro Campus, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^b Laboratory of Microbiology, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, TO 77500-000, Brazil

^c Instituto Federal de Brasília, Planaltina Campus, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^d Genomic Sciences and Biotechnology, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF 70790-160, Brazil

^e Zuckerberg Institute for Water Research, Jacob Blaustein Institutes for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Department of Environmental Hydrology & Microbiology, Israel

^f Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica (PqEB), PqEB s/n, Brasília, DF 70770-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2020

Received in revised form 24 September 2020

Accepted 25 September 2020

Available online 01 October 2020

Keywords:

GH3- β -glucosidase

Syntermes wheeleri

Metagenome

ABSTRACT

In this study, a GH3 family β -glucosidase (Bgl7226) from metagenomic sequences of the *Syntermes wheeleri* gut, a Brazilian Cerrado termite, was expressed, purified and characterized. The enzyme showed two optimum pHs (pH 7 and pH 10), and a maximum optimum temperature of about 40 °C using 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG) as substrate. Bgl7226 showed higher enzymatic activity at basic pH, but higher affinity (K_m) at neutral pH. However, at neutral pH the Bgl7226 enzyme showed higher catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for pNPG substrate. Predictive analysis about the enzyme structure-function relationship by sequence alignment suggested the presence of multi-domains and conserved catalytic sites. Circular dichroism results showed that the secondary structure composition of the enzyme is pH-dependent. Small conformational changes occurred close to the optimum temperature of 40 °C, and seem important for the highest activity of Bgl7226 observed at pH 7 and 10. In addition, the small transition in the unfolding curves close to 40 °C is typical of intermediates associated with proteins structured in several domains. Bgl7226 has significant β -glucosidase activity which could be attractive for biotechnological applications, such as plant roots detoxification; specifically, our group is interested in cassava roots (*Manihot esculenta*) detoxification.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bioprospecting is defined as the exploration of biodiversity for commercially valuable biochemical and genetic resources to achieve economic and conservation objectives. To achieve these purposes, the existing diversity of microorganisms can act as a reservoir of resources from which individual species with special characteristics can be explored [1]. Microorganisms comprise the majority of soil biomass and diversity and are crucial for its function. Microbial diversity and the pathways used for the production of enzymes, metabolites, bioactive compounds, together with more advanced biotechnological tools such as functional genomics, metagenomics, green chemistry, systems biology, synthetic biology, bioinformatics and metabolic engineering may

become an ideal platform for the production of value-added products [2,3].

The study of microorganisms is traditionally performed by laboratory cultivation techniques, however, only 0.1 to 1% can be considered cultivable in these conditions [4]. Over the years, many techniques have emerged to improve the analysis of “non-cultivable” majority, or rather, those of difficult cultivation. Metagenomics works, which use total DNA of a microbial community, have been widely used in bioprospecting to assess the potential of species present in natural ecosystems, such as thermal sources and termite guts for obtaining thermoenzymes and lignocellulose-enzymes, respectively, for example [4–6]. This approach has enabled the discovery of new genes originated from “non-cultivable” microorganisms that encode enzymes with biochemical and biophysical characteristics compatible with industrial applications [7].

Biorefineries have been using lignocellulose biomass to obtain co-products [8]. Lignocellulose is the most abundant biopolymer in terrestrial environments [9]. It is composed of cellulose (30–60%),

* Corresponding author at: Universidade de Brasília – UnB, Instituto Central de Ciências Sul – Dept. de Biologia Celular, Laboratório de Enzimologia, 70910-900 Brasília, DF, Brazil.
E-mail address: kruger@unb.br (R.H. Krüger).

11 ANEXOS - Participação em Eventos Científicos, Premiações e Cursos



Certificado

A aluna **Gideane Mendes** participou do curso online oferecida pela ABCr – Associação Brasileira de Cristalografia – intitulado *“Tópicos em difração e espalhamento: foco em biomacromoléculas – 2021”* entre 06/08/2021 e 12/11/2021 correspondendo a 60 horas, conforme ementa em anexo. Após avaliação oral a estudante foi considerada APROVADA no curso.

Prof. Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira

Secretário da ABCr para assuntos de Ensino / Organizador do Curso

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Conselheiro da ABCr / Co-Organizador do Curso

Prof. Dr. Eduardo Granado Monteiro da Silva

Presidente da Associação Brasileira de Cristalografia

CERTIFICADO



X Simpósio do Programa
de Pós-graduação em 
Biologia Molecular IB UnB
23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

Certifico que o reconhecimento de **melhor trabalho** na grande área

Bioquímica, Biofísica e Biologia Estrutural, foi concedido a

Gideane Mendes de Oliveira pelo trabalho intitulado

Structural and functional studies of C24-methyltransferase sterol enzymes from human pathogenic fungi Candida auris and Aspergillus fumigatus aiming at the development of potential antifungal drugs no X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB



CERTIFICADO



X Simpósio do Programa
de Pós-graduação em 
Biologia Molecular IB UnB
23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

Certifico que o trabalho dos autores

Gideane Mendes de Oliveira, Renata Vieira Bueno, Aisel Valle Garay, Sonia Maria de Freitas, Maria Sueli

Soares Felipe, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa,
intitulado

Structural and functional studies of C24-methyltransferase sterol enzymes from human pathogenic fungi Candida auris and Aspergillus fumigatus aiming at the development of potential antifungal drugs

foi apresentado em **formato de resumo em vídeo** no X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB



CERTIFICADO



X Simpósio do Programa
de Pós-graduação em 
Biologia Molecular IB UnB

23 e 24 de novembro, 2021 - ONLINE

Certifico que

Gideane Mendes de Oliveira participou

do X Simpósio do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

Brasília, novembro de 2021.


Prof.ª Dra. Andréa Queiroz Maranhão
Coordenadora PPGBioMol – IB - UnB



IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular

Brasília - DF 27 a 29 Novembro 2019

CERTIFICADO

Certificamos que Gideane Mendes de Oliveira apresentou o trabalho intitulado “Biophysical characterization of antifungal therapeutic targets thioredoxin reductase and sterol methyltransferase from five different pathogenic fungi” no IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), realizado na Universidade de Brasília, de 27 a 29 de Novembro de 2019.


Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Coordenador do PPG-BioMol-UnB



**IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular**

Brasília - DF 27 a 29 Novembro 2019

CERTIFICADO

Certificamos que Gideane Mendes de Oliveira participou do IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), realizado na Universidade de Brasília, de 27 a 29 de novembro de 2019.


Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Coordenador do PPG-BioMol-UnB



**VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular**

Brasília - DF 07 a 09 Novembro 2018

CERTIFICADO

Certificamos que Gideane Mendes de Oliveira apresentou o trabalho na forma de pôster intitulado “Crystallization of Thioredoxin Reductase-ligands complexes of *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*” no VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), realizado na Universidade de Brasília, de 07 de novembro a 09 de novembro de 2018.


Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Coordenador do PPG-BioMol-UnB



VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular

Brasília - DF 07 a 09 Novembro 2018

CERTIFICADO

Certificamos que Gideane Mendes de Oliveira participou do VIII Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), realizado na Universidade de Brasília, de 07 de novembro a 09 de novembro de 2018.



Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Coordenador do PPG-BioMol-UnB



CNPEM
Centro Nacional de Pesquisa
em Energia e Materiais

ORGANIZAÇÃO SOCIAL DO MCTI

SAU - SERVIÇOS DE APOIO AOS USUÁRIOS

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que GIDEANE MENDES DE OLIVEIRA esteve no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - Sírius - LNLS-SÍRIUS, entre os dias 04/11/2022 a 05/11/2022 realizando medidas como pesquisador(a) pela proposta de pesquisa abaixo:

Proposta de Pesquisa	Título	Data de Realização
MANACA-20220881	Structural studies of enzymes	04/11/2022 a 05/11/2022

Atenciosamente,

Serviços de Apoio aos Usuários

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES

CNPEM é uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI)
Campus: Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia - Caixa Postal 6192 - 13083-970 - Campinas/SP
Fone: +55.19.3512.1000 | Fax: +55.19.3512.1004 | www.cnpem.br
CNPJ 01.576.817/0001-75 Inscr. Estadual: 244.610.437.111



CERTIFICATE OF PRESENTATION

This is to certify that:

Jônatas Cunha Barbosa Lima, Daniel Vieira Neves, Gideane Mendes de Oliveira, Jefferson Faro Gois, Aisel Valle Garay, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

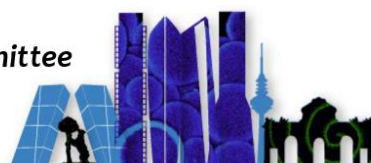
presented the POSTER titled:

STRUCTURAL ANALYSIS OF PROTEASES NS3 OF FLAVIVIRUS ZIKA AND DENGUE, AND NSP2 OF ALPHAVIRUS CHIKUNGUNYA AND MAYARO BY IN SILICO AND IN VITRO TOOLS

during the *Joint 12th EBSA-10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress* held in Madrid (Spain), from July 20th to 24th, 2019.

DIGITALLY SIGNED DOCUMENT

Jesus Perez-Gil
Chair of the Organizing Committee



P-270



30º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF A GH3 α -GLUCOSIDASE OBTAINED FROM SYNTERMES WHEELERI GUT METAGENOME** com a autoria de: LIMA, R.A.T., SANTANA, R.H., OLIVEIRA, G.M., GARAY, A.V., SOUZA, A.A, BARBOSA, J.A.R.G, FREITAS, S.M, KRÜGER, R.H. foi apresentado na forma de pôster durante o 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso, na cidade de Maceió, AL, no período de 6 a 9 de outubro de 2019.


Carlos P. Taborda
Presidente


Jorge Luis Mello Sampaio
1º Secretário

De 06 a 09 de Outubro de 2019 - Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso - Maceió - AL

Eventos Satélites

ONE HEALTH

1º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ESPOROTRICOSE HUMANA E FELINA

DO ISHAM WORKING GROUP ON SPOROTRICHOSIS

Organização
e Realização:

 Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

Patrocínio:

 BD

 FAPESP

 CAPES

 CNPq