

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – UNESP, CAMPUS DE BOTUCATU**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA GERAL E APLICADA**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

“SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR NO ESTUDO ESTRUTURAL  
DA MIOTOXINA MjTX-II DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops moojeni*”

**MATHEUS FAZIAN IGE GONDO**

Orientador: **PROF. ADJUNTO MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES**

Co-orientador: **DR. ANTÔNIO SÉRGIO KIMUS BRAZ**

BOTUCATU – SP

ABRIL/2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*I'D LIKE --*

*“I'd like to know  
what this whole show  
is about  
before it's out.”*

*Piet Hein*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

ao meu orientador e amigo Professor Adjunto Marcos Roberto de Mattos Fontes e ao meu co-orientador Doutor Antonio Sérgio Kimus Braz pela confiança e paciência durante a produção desse trabalho

ao Professor Assistente Doutor Ney Lemke pela sua valiosa assistência.

meus colegas de trabalho, especialmente ao Doutor Ângelo José Magro por sua colaboração constante.

à minha família que me apoiou e incentivou quando necessário.

à Vanessa, sem seu apoio eu não chegaria aqui.

aos meus amigos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a conclusão desse trabalho.

## RESUMO

Um dos principais componentes dos venenos botrópicos são as fosfolipases  $A_2$  homólogas (Lys49-PLA<sub>2</sub>s), pequenas moléculas estáveis com aproximadamente 14 kDa que caracterizam-se por não apresentar atividade enzimática e possuir como seu mais pronunciado efeito biológico a capacidade de romper células musculares (miotoxicidade). Neste trabalho foram realizados estudos estruturais da MjTX-II, uma Lys49-PLA<sub>2</sub>s encontrada no veneno de *Bothrops moojeni*, através da realização de simulações de dinâmica molecular. Para tanto, foram submetidas às simulações duas conformações oligoméricas diméricas desta miotoxina complexadas ou não a moléculas de ácido esteárico: a convencional, tradicionalmente atribuída às Lys49-PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpentes, e a alternativa, proposta por Murakami et al. (2005). O objetivo destes experimentos foi o de avaliar-se a estabilidade estrutural destas conformações oligoméricas em solução, levando-se em conta, também, os efeitos da interação com o ácido esteárico, um ligante lipídico análogo aos constituintes lipídicos de membranas de células musculares (sarcolema). A análise dos resultados das simulações de dinâmica molecular permitiram concluir que os modelos teóricos da forma dimérica alternativa da miotoxina MjTX-II de *Bothrops moojeni* complexada ou não a moléculas de ácido são mais estáveis em solução quando comparados a seus correspondentes convencionais. Tais resultados confirmam que a forma dimérica alternativa da MjTX-II possui uma maior probabilidade de corresponder à forma biologicamente ativa desta miotoxina. Adicionalmente, foram realizados testes de desempenho entre compiladores com o intuito de identificar aqueles mais indicados à realização de simulações de dinâmica molecular com o programa GROMACS. Os dados

relativos a estes testes mostraram que o *software* Intel é mais vantajoso em comparação ao GCC para a compilação do programa GROMACS, provavelmente em função do melhor uso de instruções geradas durante a compilação, que possibilitaram a otimização dos processos de cálculo.

## ABSTRACT

One of the main components of bothropic venoms are the phospholipases A2 homologues (Lys49-PLA2s), small stable molecules with approximately 14kDa which characterize for not showing enzymatic activity and having as its most pronounced biological effect the capacity of breaking muscular cells (miototoxicity). In this work were performed structural studies of the MjTX-II, a Lys-PLA2s found in the venom of the *Bothrops moojeni*, by the realization of molecular dynamics simulations. Two dimeric oligomeric conformations of this miotoxin complexed or not to stearic acids molecules were submitted to the simulations: the conventional, traditionally attributed to the Lys-PLA2s of snake venoms, and the alternative proposed by Murakami et al (2005). The objective of these experiments was to evaluate the structural stability of these oligomeric conformations in solution taking also into account the effects of the interaction with the stearic acid, an analogue lipidic ligand to the lipidics constituents of the muscular cells membranes (sarcolemma). The analysis of the molecular dynamics simulations results allowed to conclude the theoretical models of the alternative dimerical form of the miotoxin MjTX-II from the *Bothrops moojeni* complexed and non-complexed to the stearic acids molecules are more stable in solution when compared to their conventional correspondents. Such results confirm the alternative dimeric form of the MjTX-II has a higher probability of corresponding to the biologically active form of this miotoxin. In addition, benchmark tests between compilers were performed to identify the more indicated to the realization of molecular dynamics simulations with the GROMACS software. The data related to these tests show that the Intel

software has more advantages when compared to the GCC for compiling the software GROMACS, probably due to the better use of instructions generated during the compiling that allow the optimization of the processes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação das contribuições para o cálculo da energia potencial de um campo de força. .... 19
- Figura 2 – Representação em *cartoon* do modelo dimérico original da MjTX-II complexado a seis moléculas de ácido esteárico (*sticks* em azul) (PDB 1XXS) (Watanabe et al., 2005)..... 29
- Figura 3 – Gráfico da variação dos valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica convencional da MjTX-II com presença e ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 33
- Figura 4 – Gráfico da variação da distância entre os centros de massa dos monômeros que compõem os modelos finais com conformação oligomérica convencional da MjTX-II com presença e ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 33
- Figura 5 – Gráfico da variação dos valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica alternativa da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 34
- Figura 6 – Gráfico da variação da distância entre os centros de massa dos monômeros que compõem os modelos finais com conformação oligomérica alternativa da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 35
- Figura 7 – Variação das áreas de superfície com acesso ao solvente (SAS) dos modelos com conformação oligomérica convencional da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) durante as simulações de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 36
- Figura 8 – Variação das áreas de superfície com acesso ao solvente (SAS) dos modelos com conformação oligomérica alternativa da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) durante as simulações de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 37
- Figura 9 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na ausência de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)..... 38

Figura 10 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na presença de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).....	39
Figura 11 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.f. dos resíduos dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na ausência de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).....	40
Figura 12 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.f. dos resíduos dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na presença de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).....	41
Figura 13 – Gráfico de Ramachandran do modelo convencional da MjTX-II complexado com moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993). .....	42
Figura 14 – Gráfico de Ramachandran do modelo convencional da MjTX-II desprovido de moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993). .....	43
Figura 15 – Gráfico de Ramachandran do modelo alternativo da MjTX-II complexado com moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993). .....	44
Figura 16 – Gráfico de Ramachandran do modelo alternativo da MjTX-II desprovido de moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993). .....	45
Figura 17 – Conformação oligomérica convencional (em azul ciano) das Lys49-PLA <sub>2</sub> s a forma alternativa (em roxo) proposta por Murakami et al. (2005). A molécula de suramina (em amarelo) demonstra que o dímero alternativo é a mais apropriada para a complexação com este inibidor.....	47
Figura 18 – Disposição relativa das regiões C-terminais dos monômeros A dos modelos oligoméricos alternativos (em azul) e convencionais (em vermelho) obtidos após as simulações de dinâmica molecular. Nos modelos alternativos estas regiões estão mais voltadas para a interface dimérica em comparação com os modelos convencionais, onde se encontram mais expostas ao solvente. Ilustração gerada pelo programa PyMol (Delano, 2002).....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Desempenho do <i>software</i> GROMACS v.3.3.1 por compilador (picossegundos processados por dia de cálculo (ps/d)).....	31
Tabela 2 - Análise da área de interface e variação de energia livre ( $\Delta^iG$ ) dos modelos diméricos alternativos e convencionais da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) após um período calculado de cinco mil picossegundos nas simulações de dinâmica molecular. Os dados de $\Delta^iG$ (em Kcal/M) indicam o ganho de energia livre de solvatação após a formação da interface dimérica (valores negativos correspondem a interfaces hidrofóbicas ou afinidade protéica positiva). Cálculos realizados com o programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007).....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**GROMACS** : Groningen Machine for Chemical Simulations

**GNU** : Gnu's Not Unix

**GPL** : General Public Licence

**ANSI**: American National Standards Institute

**PERL**: Practical Extraction and Report Language

**kDa**: Kilo Dalton

**PLA2s**: Phospholipase A2

**Lys49**: Lisina número 49

**Ca<sup>++</sup>**: Íon Cálcio

**Lys122**: Lisina número 122

**Gly29**: Glicina número 29

**Cys30**: Cisteína número 30

**Asp49**: Asparagina número 49

**GCC**: Gnu C Compiler

**ICC**: Intel C Compiler

**d.villin**: Dinâmica de um sistema de vilina

**d.lzm**: Dinâmica de um sistema de lisosima

**PME**: Particle Mesh Ewald

**d.dppc**: Dinâmica de um sistema de membrana de lipídios

**d.polych2**: Dinâmica de um sistema de polietileno

**SPC**: Simple Point-Charge

**ps:** Picosegundos

**PRMD:** Position Restraint Molecular Dynamic

**nm:** Nanometro

**ns:** Nanosegundos

**Na+:** Íon Sódio

**Cl-:** Íon Cloro

**K:** Kelvin

**M:** Molar

**mM:** Milimolar

**R.M.S.D.:** Root Mean Square Deviation

**SAS:** Solvent Accessible Surface

**$\alpha$ T:** Alfa Tocoferol

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
ABSTRACT .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. PRINCÍPIOS DE MECÂNICA MOLECULAR .....	17
1.2. ALGORITMOS E COMPILADORES .....	19
1.3. GROMACS .....	21
1.4. FOSFOLIPASES A <sub>2</sub> E FOSFOLIPASES A <sub>2</sub> HOMÓLOGAS DE VENENOS DE SERPENTES .....	22
2. OBJETIVOS .....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.1. COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO ENTRE COMPILADORES .....	26
3.2. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR .....	28
3.3. ANÁLISE DA QUALIDADE DOS MODELOS OBTIDOS APÓS AS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR .....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1. COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO ENTRE COMPILADORES .....	31
4.2. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR DAS CONFORMAÇÕES OLIGOMÉRICAS CONVENCIONAL E ALTERNATIVA DA MJTX-II NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE LIGANTES (ÁCIDO ESTEÁRICO) .....	32
4.3. ANÁLISE DA QUALIDADE ESTEREOQUÍMICA DOS MODELOS GERADOS PELAS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR .....	41
5. DISCUSSÃO .....	46
5.1. DESEMPENHO DOS COMPILADORES .....	46
5.2. ANÁLISE DOS MODELOS DIMÉRICOS COM CONFORMAÇÃO OLIGOMÉRICA E CONVENCIONAL NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO ESTEÁRICO .....	46

6. CONCLUSÕES .....	52
7. REFERÊNCIAS* .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

Com o avanço das tecnologias de informação nos últimos anos, o uso de computadores nas mais diversas tarefas tem se tornado comum. Por sua capacidade de realizar processos de forma rápida, os computadores sempre foram empregados em diversas tarefas diversas que demandam um grande número de operações de cálculo pesados tais como quebra de criptografia e simulações das mais diversas naturezas. Devido à popularização da informática e ao aumento da capacidade do *hardware*, as possibilidades se expandiram e cálculos antes proibitivos devido à sua elevada complexidade e demanda de tempo foram se tornando possíveis. Tal evolução possibilitou também o desenvolvimento de ferramentas de informática especificamente voltadas para o estudo de problemas biológicos. A primeira simulação computacional relacionada a este campo de estudos foi executada por Metropolis et al. (1953), onde foi utilizado o método de Monte Carlo para o estudo do comportamento de sistemas de fluido. Em 1959, Alder reconheceu a possibilidade de integrar equações de movimento em um grupo relativamente pequeno de partículas e, assim, simular o comportamento de um sistema real utilizando restrições de espaço periódico. Este trabalho pioneiro foi o primeiro a realizar uma simulação de dinâmica molecular utilizando modelos de esferas sólidas (Alder & Wainwright, 1959; Leach, 2001). Mais tarde, no início da década de 1970, Rahman & Stillinger (1973) publicaram, com base nos estudos de Alder, os resultados da primeira simulação de dinâmica molecular de uma molécula polar (água) em estado líquido. No final desta década, o desenvolvimento do conceito de campos de força de baseados em princípios de mecânica molecular foi iniciado, assim como a elaboração de

algoritmos de minimização de energia que viriam a ser utilizados no refinamento de estruturas cristalográficas. Estas ferramentas permitiram a implementação de técnicas mais modernas, como o algoritmo de refinamento do tipo *simulated annealing* (ainda realizado num meio virtual preenchido por vácuo) e outros similares (Clare & Gronenborn, 1998; Korostelev et al, 2002). Entre os anos de 1970 e 1980, Berensen et al. (1981) e Jorgensen et al. (1983) estabeleceram as bases para a realização de simulações biomoleculares em solução que são realizadas atualmente. Neste contexto, foram desenvolvidos programas exclusivos para a simulação de mecânica molecular de moléculas protéicas, com base em sistemas de dinâmicas moleculares que utilizam métodos de mecânica molecular ou mesmo aproximações semi-clássicas implementadas a partir de leis da mecânica quântica. Neste trabalho, foram realizados estudos estruturais da fosfolipase homóloga MjTX-II, uma miotoxina encontrada no veneno da serpente *Bothrops moojeni*, através da realização de utilização do pacote de *softwares* GROMACS (Lindhal et al, 2001), amplamente conhecido e utilizado para a realização de simulações de dinâmica molecular e análise dos resultados obtidos. Abaixo são encontrados tópicos específicos que descervem de forma breve o programa GROMACS e alguns fundamentos necessários à compreensão básica do funcionamento deste *software*, como alguns princípios de mecânica molecular e noções relacionadas a algoritmos e compiladores. Em seguida a estes tópicos, também encontra-se uma descrição a respeito das características e importância da realização de estudos estruturais das fosfolipases homólogas encontradas nos venenos de serpentes.

## 1.1. Princípios de mecânica molecular

Os princípios básicos de mecânica molecular são baseados sobre modelos simples de interações, com contribuições de processos como alongamento de ligações, abertura e fechamento de ângulos, rotações sobre ligações simples e interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Leach, 2001) (Figura 1). Adicionalmente, parâmetros desenvolvidos com base em dados adquiridos a partir do estudo de pequenas moléculas podem ser utilizados para a análise de moléculas muito maiores, como, por exemplo, polímeros. Campos de força utilizados em modelagem molecular, apesar de poderem prever várias propriedades, são desenvolvidos primariamente para reproduzir propriedades estruturais, sendo, portanto, parametrizados (Leach, 2001). A energia potencial dos sistemas estudados pode ser calculada através da atribuição de penalidades conforme os ângulos são desviados de seus valores de equilíbrio. Assim, o seguinte termo pode ser aplicado para o cálculo de sistemas moleculares em geral:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{ligados}} + E_{\text{não ligados}}$$

aonde

$$E_{\text{ligados}} = E_{\text{ligação}} + E_{\text{ângulos}} + E_{\text{torções}}$$

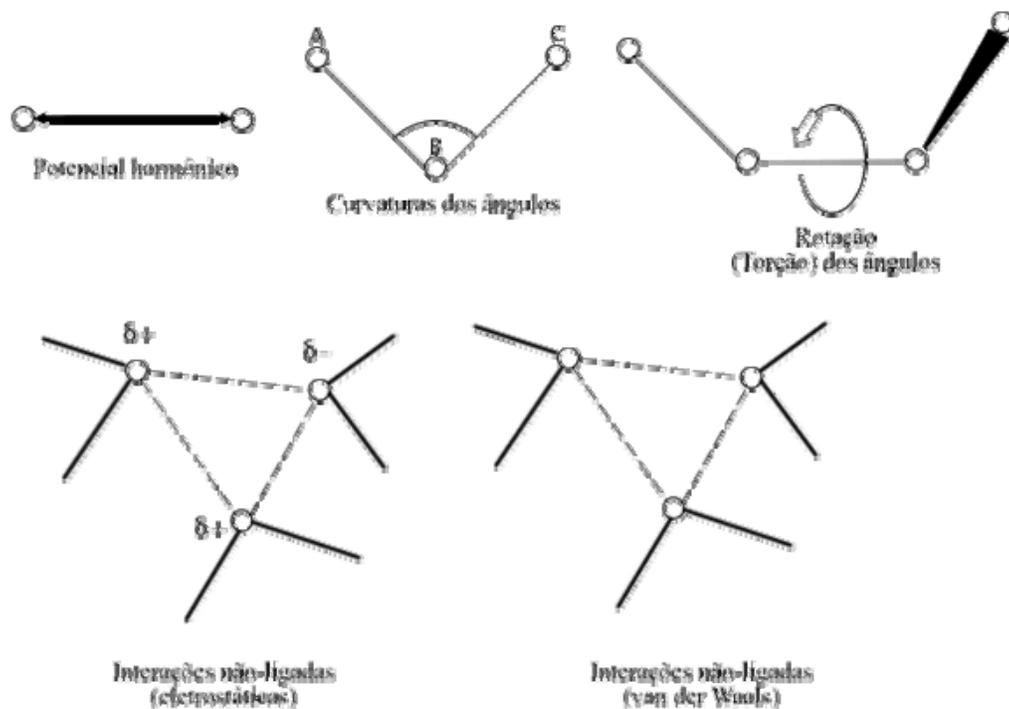
e

$$E_{\text{não ligados}} = E_{\text{Van der Waals}} + E_{\text{interações eletrostáticas}}$$

A seguinte equação demonstra, por sua vez, o cálculo de energia potencial geral dos campos de força para um determinado grupo de átomos ou moléculas:

$$\begin{aligned} \mathcal{V}(\mathbf{r}^N) = & \sum_{\text{bonds}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \end{aligned}$$

Onde o primeiro termo  $\sum_{\text{bonds}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2$  diz respeito às ligações entre pares de átomos conforme o potencial harmônico; o segundo termo  $\sum_{\text{angles}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2$  trata das curvaturas dos ângulos atômicos dentro da molécula entre 3 átomos A - B - C, onde A e C são ligados a B conforme ilustrado na Figura 1; o terceiro termo  $\sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$  indica o potencial de torção das ligações conforme a alteração desse ângulo; o quarto termo  $\sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$  determina a contribuição dos termos não ligados representados por interações de van der Waals e efeito dielétrico.



**Figura 1 - Representação das contribuições para o cálculo da energia potencial de um campo de força.**

Um ponto importante a ser ressaltado é que campos de força são empíricos e são escolhidos com base no tipo de simulação e componentes do sistema que se deseja estudar (Leach, 2001).

## 1.2. Algoritmos e compiladores

Um algoritmo, ou código fonte, trata de passos lógicos e sequenciais que deverão ser estabelecidos para a execução e conclusão de um problema, podendo esse ser interpretado ou compilado. Uma linguagem de programação interpretada, como a linguagem PEARL, é mais amplamente chamada de *script* e não é tão eficiente quanto as linguagens compiladas, pois deve ser reinterpretada a cada execução, embora sejam mais fáceis e flexíveis já que seus

comandos são avaliados de forma seqüencial, com resultados claramente visíveis. Por sua vez, linguagens compiladas como C e C++ possuem uma performance superior quando comparadas a linguagens interpretadas. Uma grande prova disso é que os interpretadores que executarão os *scripts* são, em sua maioria, senão todos, desenvolvidos com linguagens compiladas.

Compiladores são tradutores de linguagens de alto nível (mais próximas da linguagem humana) para linguagens de baixo nível (instruções equivalentes para o processador). Por ser um conjunto de instruções que definirá o correto funcionamento do *software*, a otimização do algoritmo é diretamente responsável pelo funcionamento eficiente do sistema a ser executado.

Além do código fonte, também são levados em conta o *hardware* sobre o qual o algoritmo será executado e o compilador, ou interpretador, que o transformará em um *software*, para a obtenção de um melhor desempenho. A melhoria da performance do código fonte pode ser obtida utilizando um compilador que analise e otimize o código conforme um determinado conjunto de fatores podem ser alterados sem alteração na funcionalidade do *software* final.

Ainda existe a possibilidade de haver códigos com instruções que diminuam o desempenho, como comandos de laços de repetição (*loops*) desnecessários, ou seja, instruções que não são mais utilizadas, mas foram esquecidas ou mantidas conforme o código foi atualizado, além de sub-expressões comuns redundantes, expressões temporárias excessivas e comandos que seriam mais rapidamente interpretados por meio de instruções do processador. Além desses empecilhos existem ainda outros fatores que não podem ser considerados erros, mas possuem a capacidade de alterar a performance do *software*. Alguns

compiladores modernos fazem a otimização do código durante o processo de compilação removendo, alterando e ordenando blocos de código e traduzindo o código em instruções próprias e condizentes com tecnologias disponíveis nos processadores atuais.

### 1.3. GROMACS

Uma das diversas ferramentas capazes de realizar simulações de dinâmicas moleculares é o *software* GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulations*). Este pacote de programas possui um conjunto de *softwares* e bibliotecas para realização de dinâmicas moleculares e análise de dados de trajetória e é primariamente voltado para a realização de simulações de dinâmica molecular de moléculas biológicas complexadas ou não a ligantes (Berendsen et al, 1995).

Parte da flexibilidade e da grande performance do GROMACS advém do fato do *software* ser distribuído através da licença GNU GPL (*General Public Licence*) de *software* livre. Desta forma, qualquer usuário pode estudar, alterar e distribuir livremente o código do *software*, o que contribui potencialmente para a melhora de sua performance e de seus recursos. O programa GROMACS também é escrito em ANSI-C e Fortran, o que facilita a sua compreensão para usuários versados em linguagem C e algoritmos de dinâmicas moleculares. Além destas características altamente favoráveis, o pacote GROMACS apresenta diversas ferramentas de análise e sistemas simples de visualização de dinâmicas, cujos *outputs* são legíveis em diversos outros *softwares* (Lindhal et al, 2001).

#### 1.4. Fosfolipases A<sub>2</sub> e fosfolipases A<sub>2</sub> homólogas de venenos de serpentes

O estudo dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* é especialmente relevante, uma vez que estes animais são responsáveis por mais de 70% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (Fundação Nacional de Saúde, 2001). Além disso, devido à grande variedade de efeitos farmacológicos e bioquímicos apresentados pelas proteínas que compõem os venenos destes répteis, o estudo aprofundado destas toxinas pode ser grande utilidade para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de interesse biotecnológico e na aquisição de novos e importantes dados a respeito de processos bioquímicos, fisiológicos e patológicos que ocorrem nos seres vivos. Um caminho que vem sendo utilizado para a obtenção de informações que possam permitir a concretização destes objetivos é o do estudo de complexos destas toxinas com inibidores, tanto naturais quanto sintéticos.

Um dos principais componentes dos venenos botrópicos são as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>S – E.C. 3.1.1.4). Pequenas enzimas estáveis e cálcio-dependentes, com um peso molecular de aproximadamente 14 kDa, que promovem a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Dennis, 1994). A superfamília das PLA<sub>2</sub>S é composta por um conjunto de quinze diferentes grupos que, caracterizam-se por apresentar um alto grau de homologia seqüencial. A diferenciação entre estas moléculas somente pode ser realizada com base na localização de suas pontes dissulfeto e no comprimento de seus *loops* (Six & Dennis, 2000). Cinco dessas classes (I, II, III, V e X) são fartamente encontradas em uma grande variedade de fluidos biológicos, particularmente em

secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e venenos de répteis e artrópodes (Rosenberg, 1990). As PLA<sub>2</sub>s dos grupos I e II também são os componentes principais dos venenos de serpentes, sendo as do segundo grupo os compostos predominantes dos venenos das serpentes pertencentes à família Viperidae (entre as quais também se incluem as espécies do gênero *Bothrops*) (Rosenberg, 1990). Apesar da pequena variação seqüencial e estrutural mencionada, as PLA<sub>2</sub>s destacam-se pelo seu grande escopo de atividades biológicas, entre as quais podemos citar: miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos na agregação de plaquetas, ação anticoagulante, atividade convulsiva e hipotensiva, capacidade hemolítica e de indução de edema, entre outros efeitos.

Entre as Lys49-PLA<sub>2</sub>s já isoladas e caracterizadas tanto funcionalmente quanto estruturalmente estão a BthTX-I de *Bothrops jararacussu* (da Silva-Giotto et al, 1998), a PrTX-I e a PrTX-II de *Bothrops pirajai* (Lee et al, 2001; de Azevedo et al, 1998), a MjTX-I e a MjTX-II de *Bothrops moojeni* (Soares et al, 2000; Marchi-Salvador et al, 2005; Watanabe et al, 2005) e a BnSP-7 de *Bothrops neuwiedi* (Magro et al, 2004). Um aspecto relevante a respeito destas toxinas e das Lys49-PLA<sub>2</sub>s em geral é que todas as moléculas deste tipo já identificadas são básicas. Além disso, apesar da incapacidade das Lys49-PLA<sub>2</sub>s de realizar a hidrólise de substratos lipídicos, estas moléculas apresentam um evidente efeito miotóxico tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Gutiérrez et al, 1997) e são capazes de romper membranas biológicas e sintéticas. Estas atividades aparentemente não são dependentes da ligação do íon Ca<sup>++</sup> ao sítio ativo, ao contrário do verificado no processo normal de catálise de lipídios (Rufini et al, 1992; Diaz et al, 1992). Foi proposto, como forma de explicar estes fatos, que as regiões C-terminais das Lys49-PLA<sub>2</sub>s seriam as responsáveis pelos mecanismos em questão, por apresentarem uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e básicos

(Lomonte et al, 1994; Gutiérrez et al, 1995). Aparentemente, tais regiões poderiam se insinuar através de membranas celulares ou artificiais, promovendo a desestabilização das camadas fosfolípídicas, ou atuariam como espécies de “âncoras”, possibilitando o contato de sítios protéicos reativos desconhecidos.

A disparidade existente entre a uniformidade estrutural e o leque de ações farmacológicas e bioquímicas é uma das bases do amplo interesse despertado pelas PLA<sub>2</sub>s e PLA<sub>2</sub>s homólogas na comunidade científica. As pequenas variações existentes entre estas moléculas facilitam a identificação de prováveis relações estruturais e funcionais, o que pode ser de extrema valia para o desenvolvimento de medicamentos e/ou derivados sintéticos com as mais variadas aplicações. No caso das PLA<sub>2</sub>s, esta característica é especialmente importante, já que as moléculas desta classe encontradas em mamíferos atuam de maneira bastante ativa no estabelecimento de processos inflamatórios através da síntese de eicosanóides (Needleman et al, 1986) e estão relacionadas a vários processos patológicos que ocorrem em humanos, tais como doenças inflamatórias degenerativas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esquizofrenia (Noyonem et al, 1993; Ross et al, 1997; Ross et al, 2001; Bazan et al, 2002). Desta forma, estudos comparativos entre as Asp49-PLA<sub>2</sub>s e Lys49-PLA<sub>2</sub>s provenientes de venenos de serpentes e suas moléculas homólogas presentes em mamíferos também podem fornecer informações valiosas para uma melhor compreensão e controle destas doenças.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho foi realizado o estudo estrutural da Lys49-PLA<sub>2</sub> MjTX-II do veneno de *Bothrops moojeni* através da realização de simulações de dinâmica molecular. Para tanto, foram submetidas às simulações duas conformações oligoméricas diméricas desta miotoxina complexadas ou não a moléculas de ácido esteárico: a convencional, tradicionalmente atribuída às Lys49-PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpentes, e a alternativa, proposta por Murakami et al. (2005). O objetivo destes experimentos foi o de avaliar-se a estabilidade estrutural destas conformações oligoméricas em solução, levando-se em conta, também, os efeitos da interação com o ácido esteárico, um ligante lipídico análogo aos constituintes lipídicos de membranas de células musculares (sarcolema). Adicionalmente, foram realizados testes de desempenho entre compiladores com o intuito de identificar aqueles mais indicados à realização de simulações de dinâmica molecular com o programa GROMACS.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Comparação de desempenho entre compiladores

Foram realizados testes de *benchmark* (desempenho) do programa GROMACS v.3.3.1 com compiladores GCC v.4.0.1 (*Gnu C Compiler*) e ICC v.9.1 (*Intel C Compiler*) para comparação e avaliação de ganho ou perda de desempenho durante a execução das simulações de dinâmica molecular. Os sistemas utilizados para os testes de *benchmark* são aqueles propostos no *website* do programa GROMACS (<http://www.gromacs.org/content/view/25/38/>) e estão relacionados abaixo:

- ✓ d.villin: Estrutura de uma porção de 35 resíduos da proteína vilina determinada por NMR (Nuclear Magnetic Resonance) (McKnight et al., 1997) submetida à uma simulação de *folding* de peptídeos com duração total de 1,0 microssegundo realizada por Duan & Kollman (1998), com a utilização do campo de força GROMOS96 (Oostebrink et al, 2005) e do modelo TIP3P de moléculas de água Jorgensen et al, 1983).
- ✓ d.lzm Cutoff: Lisozima (PDB 2LZM) submetida a simulação utilizando o campo de força GROMOS96 em modelos de água SPC (*Simple point charge*) (ref.). É utilizado um corte pelo método *twin-range*, onde as interações delimitadas pelo corte de curta distância são calculadas a cada passo e as interações delimitadas entre o corte de curta e de longa

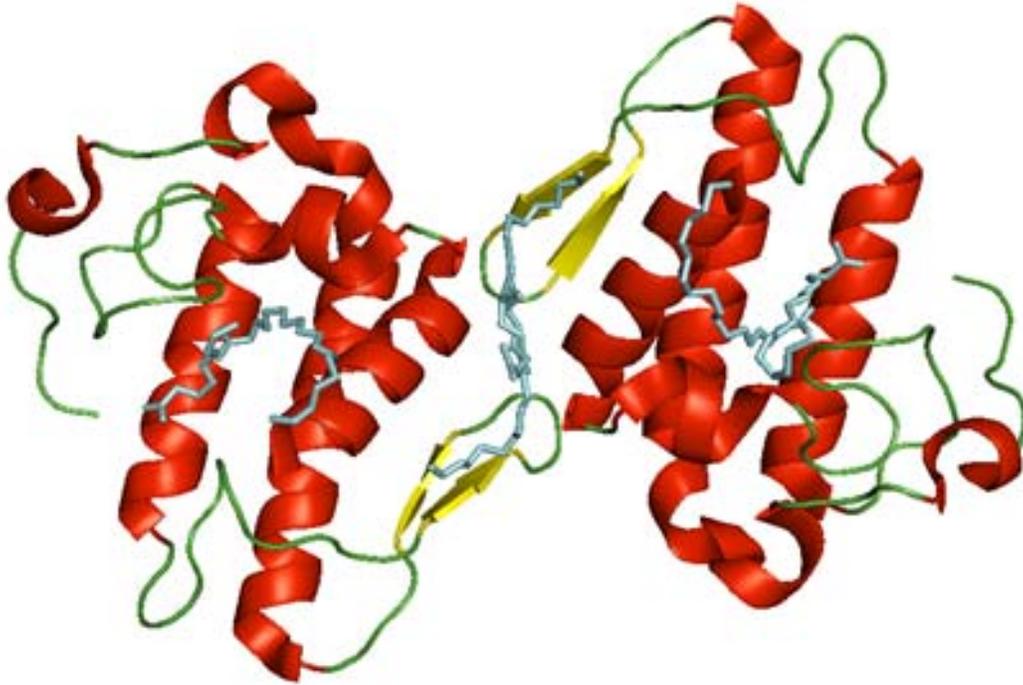
distância são calculadas a cada 5 ou 10 passos e são consideradas constantes nesse intervalo de tempo (Schlick, 2002).

- ✓ d.lzm PME: Sistema de lisozima utilizando algoritmo PME (*Particle Mesh Ewald*) para interações de Coulumb.
  
- ✓ d.dppc: Modelo de membrana fosfolipídica constituída de 1024 lipídios dipalmitol fosfatidilcolina (DPPC) em uma conformação de bicamada com 23 moléculas de água por lipídio com um total de 121.856 átomos. Nesta simulação foi utilizado um campo de força descrito por Berter et al (1997) para os lipídeos, enquanto que as moléculas de água foram simuladas através do método SPC.
  
- ✓ d.polych2: Molécula de polietileno de 6000 unidades. Nesta simulação foi utilizado um campo de força elaborado por Pant et al. (1993), com ligações flexíveis.

Executaram-se seis simulações para cada um dos sistemas citados, cujas médias de ps processados por dia de cálculo (ps/d) foram utilizadas para a comparação de desempenho entre os mesmos.

### 3.2. Simulações de dinâmica molecular

Todas as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com a utilização do modelo cristalográfico do complexo formado entre a fosfolipase A<sub>2</sub> homóloga MjTX-II do veneno de *Bothrops moojeni* e seis moléculas de ácido esteárico (PDB 1XXS) (Watanabe et al., 2005) (Figura 2). Para tanto, utilizaram-se versões do modelo com a presença ou ausência dos ligantes sob duas conformações oligoméricas distintas: aquela apresentada convencionalmente pelo modelo e uma versão alternativa, semelhante à definida para a molécula de suramina por Murakami et al. (2005). A determinação desta última foi executada com base em operações de simetria realizadas com o emprego do programa online PISA (Krissinel & Henrick, 2007), disponibilizado pelo *European Bioinformatics Institute* ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)). Os processos de dinâmica molecular foram calculados com a utilização do pacote de *softwares* GROMACS v.3.3.1 e v.3.3.2 (<http://www.gromacs.org>) e computadores de arquitetura X86 64 bits, equipados com um sistema operacional Gnu/Linux (distribuições Ubuntu, Debian, Gentoo e OpenSuse).



**Figura 2 – Representação em *cartoon* do modelo dimérico original da MjTX-II complexado a seis moléculas de ácido esteárico (*sticks* em azul) (PDB 1XXS) (Watanabe et al., 2005).**

O modelo da MjTX-II complexada com moléculas de ácido esteárico foi introduzido em uma caixa cúbica preenchida por moléculas de água explícitas (Berendsen et al, 2005). O estado de protonação dos grupos carregados de cada modelo foi ajustado para pH 7,0, através da adição de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , de forma a simular uma concentração de 100 mM de NaCl no volume da caixa de moléculas de água da simulação. Todas as simulações foram feitas em temperatura (310 K) e pressão (1,0 bar) constantes. A distância mínima entre qualquer átomo do modelo e a parede da caixa de solvente foi fixada em 1,0 nm e o campo de força escolhido foi o ff53a6 (Oostebriink et al, 2005). A topologia das moléculas de ácido esteárico foi criada a partir do *software* on-line PRODRG 2.5 Beta ([http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr\\_beta](http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrgr_beta)).

Para gerar a configuração inicial do sistema foram executados dois processos de minimização de energia utilizando um algoritmo do tipo *steepest descent*, sendo o primeiro deles realizado com todos os átomos da proteína congelados e o segundo com restrição de posicionamento dos átomos do *backbone* através do método PRMD (*position restrained molecular dynamics*). Na etapa seguinte, 200 picossegundos (ps) de dinâmica molecular foram calculados, com restrição de posicionamento dos átomos da cadeia principal da proteína, também com o emprego do método PRMD. Em seguida, outros cinco mil picossegundos (ps) de cálculo foram executados para possibilitar a estabilização estrutural dos modelos. Todos os passos deste protocolo foram executados com o intuito de promover o relaxamento gradual do sistema. O tempo de cálculo médio de cada simulação foi, aproximadamente, de 168 horas. As análises dos resultados obtidos a partir da execução deste protocolo foram realizadas com o emprego do pacote de *softwares* GROMACS v.3.3.1.

### **3.3. Análise da qualidade dos modelos obtidos após as simulações de dinâmica molecular**

Os modelos finais obtidos após o cálculo dos processos de dinâmica molecular foram analisados com o programa e PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1995).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Comparação de desempenho entre compiladores

Os resultados referentes às seis simulações executadas para cada um dos *benchmarks* testados estão apresentados na Tabela 1. De acordo com os dados obtidos nestas simulações, o programa GROMACS v.3.3.1 apresenta um desempenho 5,11% mais eficiente quando é utilizado o compilador ICC v.9.1.

**Tabela 1 – Desempenho do *software* GROMACS v.3.3.1 por compilador (picossegundos processados por dia de cálculo (ps/d)).**

#### Compilador ICC

Sistema	(1) ps/d	(2) ps/d	(3) ps/d	(4) ps/d	(5) ps/d	(6) ps/d	Média ps/d
d.dppc	205	202	203	202	200	201	202,17
d.lzm PME	2003	2020	2003	2013	2007	2014	2010,00
d.lzm Cutoff	2954	2968	2913	2982	2984	3012	2968,83
d.polych2	4419	4402	4405	4417	4419	4400	4410,33
d.villin	10097	9452	10144	10095	10102	10150	10006,67

#### Compilador GCC

Sistema	(1) ps/d	(2) ps/d	(3) ps/d	(4) ps/d	(5) ps/d	(6) ps/d	Média ps/d
d.dppc	191	188	193	189	191	189	190,17
d.lzm PME	1886	1886	1883	1886	1901	1879	1886,83
d.lzm Cutoff	2860	2839	2842	2699	2856	2850	2824,33
d.polych2	4296	4293	4305	4314	4311	4314	4305,50
d.villin	9726	9137	9784	9071	9666	9708	9515,33

#### Ganho de performance do compilador Intel sobre GCC em % de ps por dia

Dppc	lzm PME	lzm Cutoff	Poly-Ch2	villin
6,31	6,53	5,12	2,43	5,16

#### **4.2. Simulações de dinâmica molecular das conformações oligoméricas convencional e alternativa da MjTX-II na ausência ou presença de ligantes (ácido esteárico)**

Como demonstrado na Figuras 3 e 4, os modelos finais com conformação oligomérica convencional da fosfolipase A<sub>2</sub> homóloga MjTX-II com e sem a presença de ligantes (moléculas de ácido esteárico) obtidos a partir das simulações de dinâmica molecular não foram estabilizados dentro do intervalo de tempo de 5000 picossegundos (ps) calculado para cada processo. A análise da Figura 3 mostra de modo claro que, ao longo do tempo de simulação, não ocorreu e nem foi observada uma tendência de estabilização dos valores de r.m.s.d. (*root mean square deviation* – desvio quadrático médio) dos átomos dos dois modelos. O mesmo ocorreu quanto à variação de distância entre os centros de massa dos monômeros que compõem cada um dos modelos diméricos convencionais (Figura 4), tomando-se como base o mesmo período de tempo calculado.

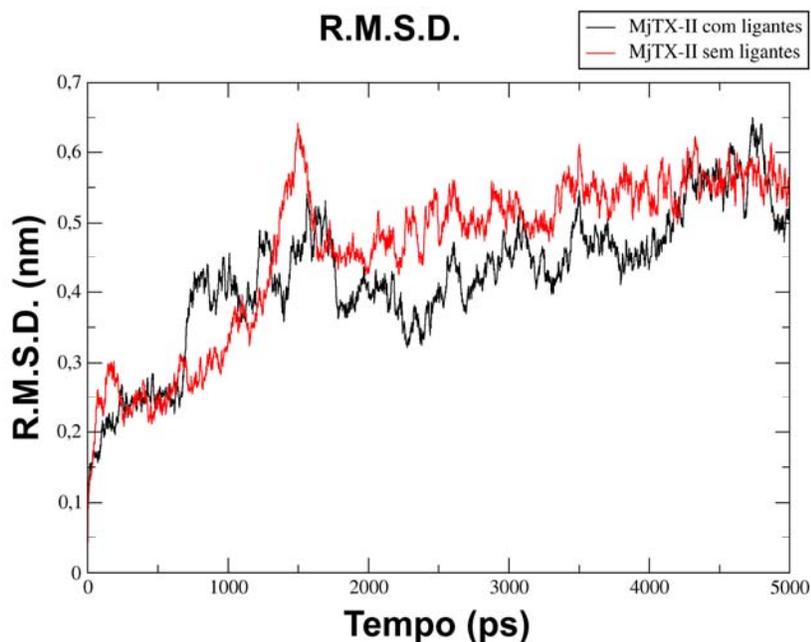


Figura 3 – Gráfico da variação dos valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica convencional da MjTX-II com presença e ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).

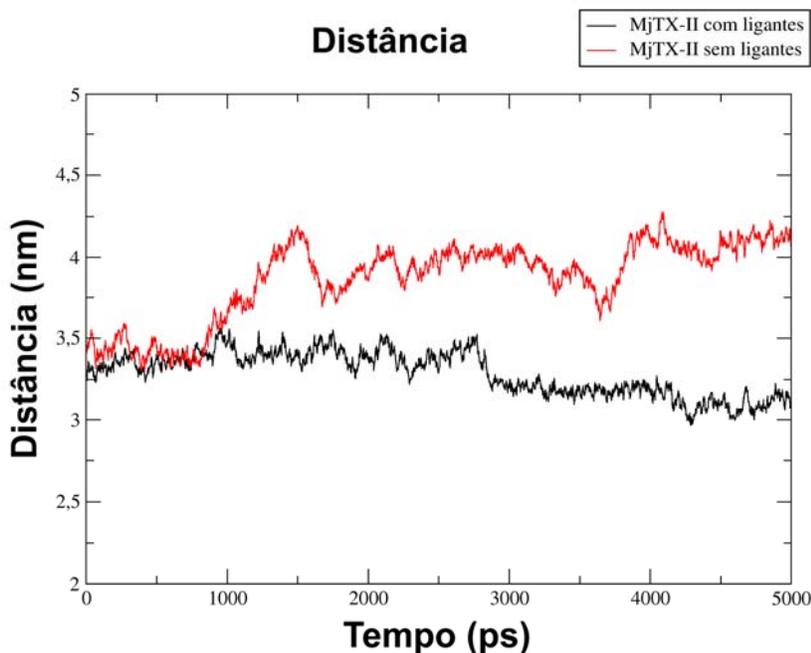
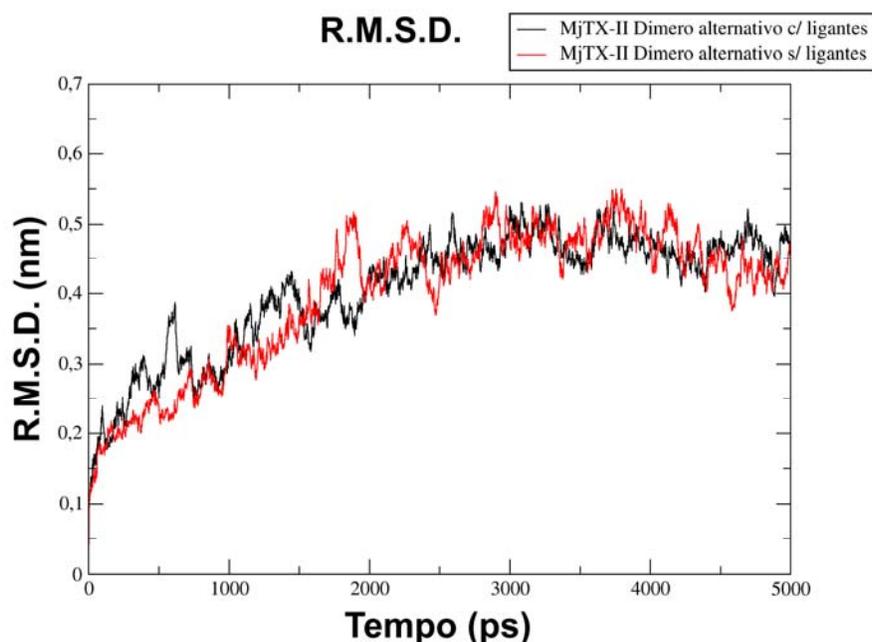
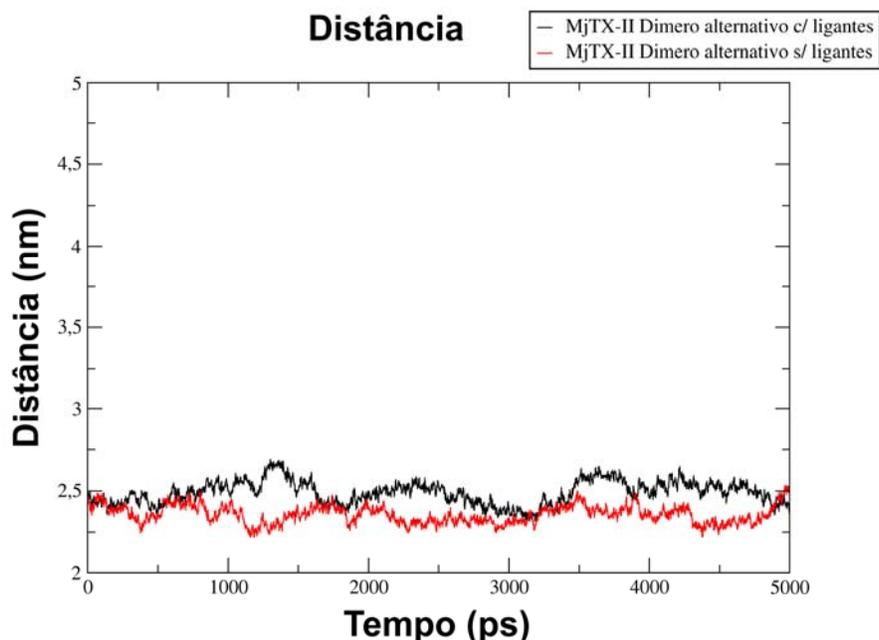


Figura 4 – Gráfico da variação da distância entre os centros de massa dos monômeros que compõem os modelos finais com conformação oligomérica convencional da MjTX-II com presença e ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).

Já os modelos da MjTX-II com conformação oligomérica alternativa tanto na ausência quanto na presença dos ligantes mostraram uma tendência de estabilização a partir de aproximadamente 2500 picossegundos de simulação de dinâmica molecular (Figura 5). É possível concluir-se esta afirmação com base no fato de que os valores de r.m.s.d. dos átomos destes modelos apresentaram uma variação aproximada de apenas 0,1 Å deste ponto do cálculo até o final dos processos (Figura 5). Por sua vez, a distância entre os centros de massa de cada monômero dos modelos diméricos alternativos com ou sem ligantes também se estabilizaram ao longo das simulações de dinâmica molecular (Figura 6). Também é possível observar-se na Figura 6 que a separação inicial de aproximadamente 25 Å entre os centros de massa dos modelos com conformação alternativa é mantida durante toda a simulação. Tal fato não é verificado nos modelos com conformação convencional, onde a distância inicial entre os centros de massa de seus monômeros (cerca de 32,5 Å) sofre fortes alterações ao longo dos processos de cálculo (Figura 4).



**Figura 5 – Gráfico da variação dos valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica alternativa da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).**



**Figura 6 – Gráfico da variação da distância entre os centros de massa dos monômeros que compõem os modelos finais com conformação oligomérica alternativa da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) ao longo do tempo calculado pelos processos de simulação de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMGrace (Turner, 2004).**

O cálculo das áreas de superfície com acesso ao solvente (SAS – *solvent accessible surface*) dos modelos da MjTX-II sob as conformações oligomérica convencional e alternativa e na ausência ou presença de ligantes também apresentaram alterações. Pela análise da Figura 7, nota-se que a área de superfície com acesso ao solvente dos modelos convencionais da MjTX-II tanto na presença como na ausência de moléculas de ácido esteárico foi mantida ao redor de  $100 \text{ nm}^2$  durante as simulações. Este padrão não foi verificado na configuração alternativa da MjTX-II, uma vez que o modelo final com a presença dos ligantes apresentou uma pequena diminuição em sua área de superfície com acesso ao solvente em comparação ao modelo complexado (Figura 8).

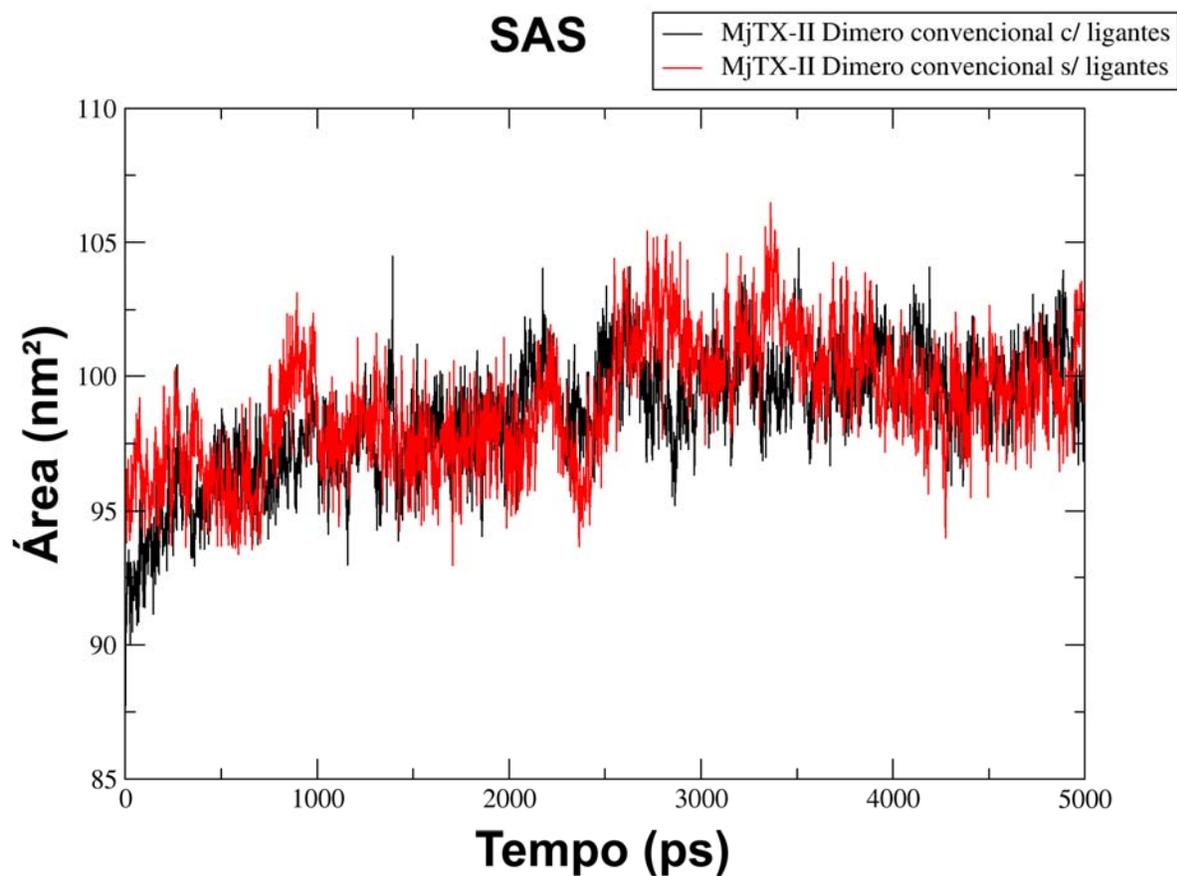
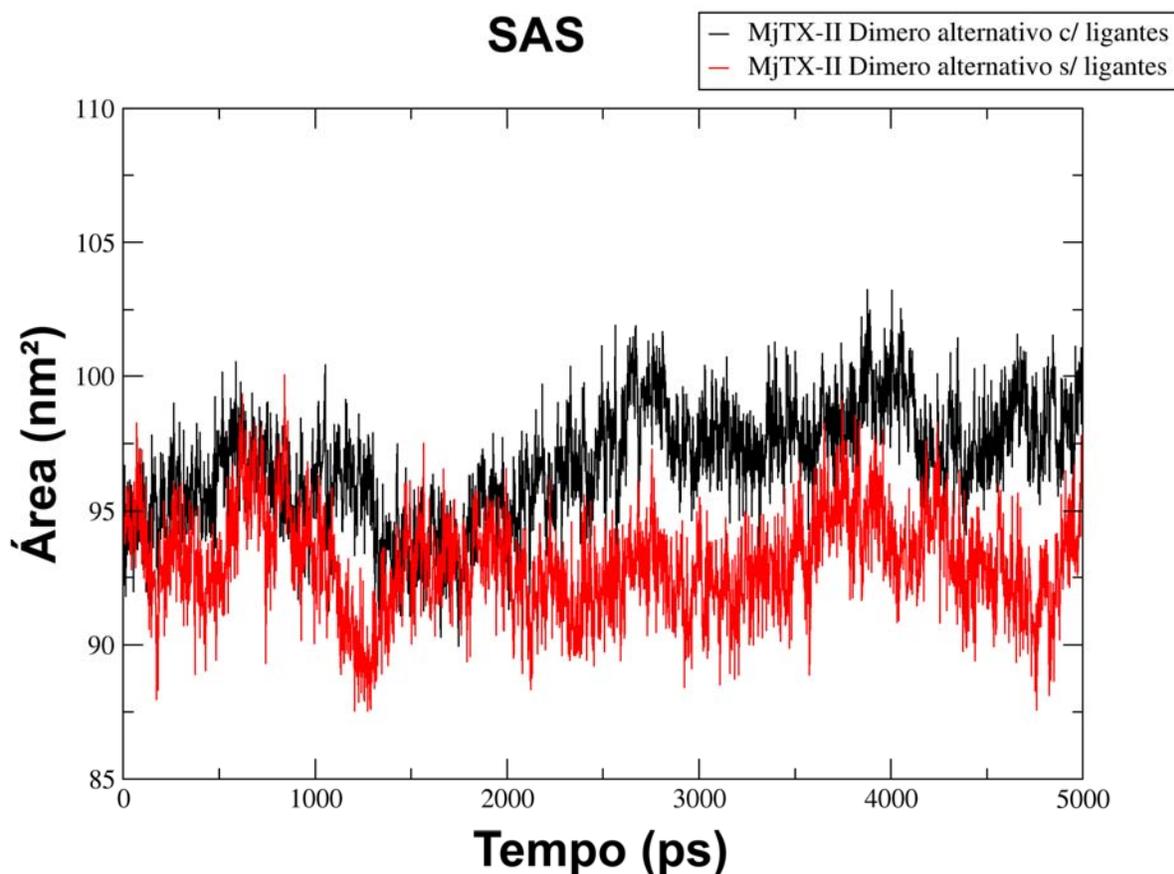


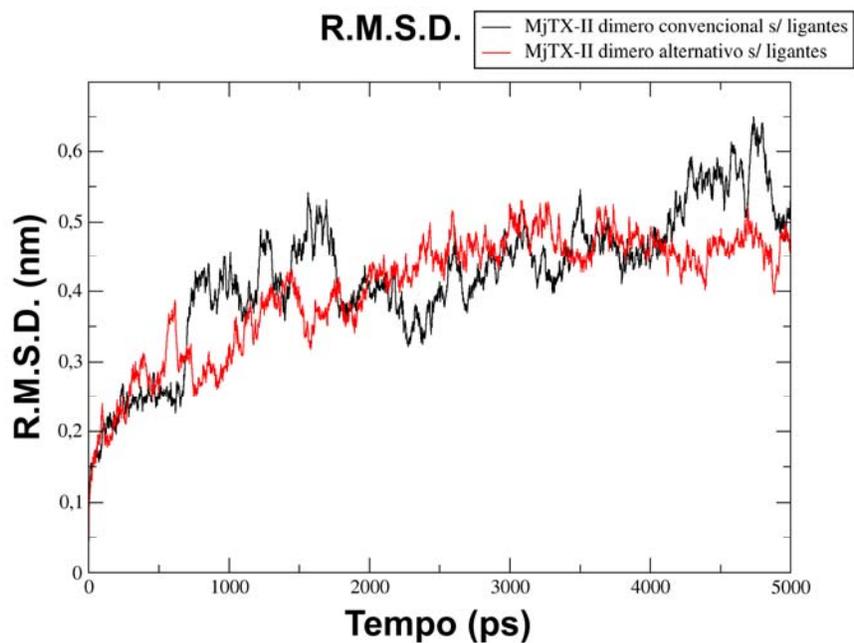
Figura 7 – Variação das áreas de superfície com acesso ao solvente (SAS) dos modelos com conformação oligomérica convencional da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) durante as simulações de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).



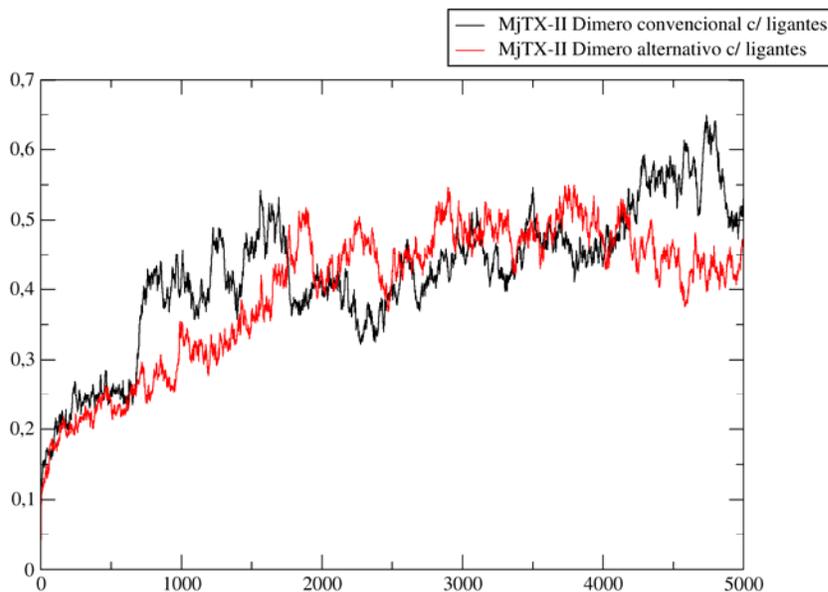
**Figura 8** – Variação das áreas de superfície com acesso ao solvente (SAS) dos modelos com conformação oligomérica alternativa da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) durante as simulações de dinâmica molecular. Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).

As comparações entre os modelos com conformação convencional e alternativa na presença e ausência de ligantes também confirmaram os dados apresentados acima. Nas Figuras 9 e 10, pode-se observar claramente que os modelos alternativos com e sem ligantes apresentaram uma tendência maior de estabilização do que os modelos convencionais. Por sua vez, os dados referentes às áreas com acesso ao solvente (SAS) exibidos nas Figuras 7 e 8 mostraram que o modelo alternativo da MjTX-II desprovido de moléculas de ácido

esteárico é mais compacto em relação às demais estruturas, o que reforça a maior tendência à estabilização da forma oligomérica alternativa.

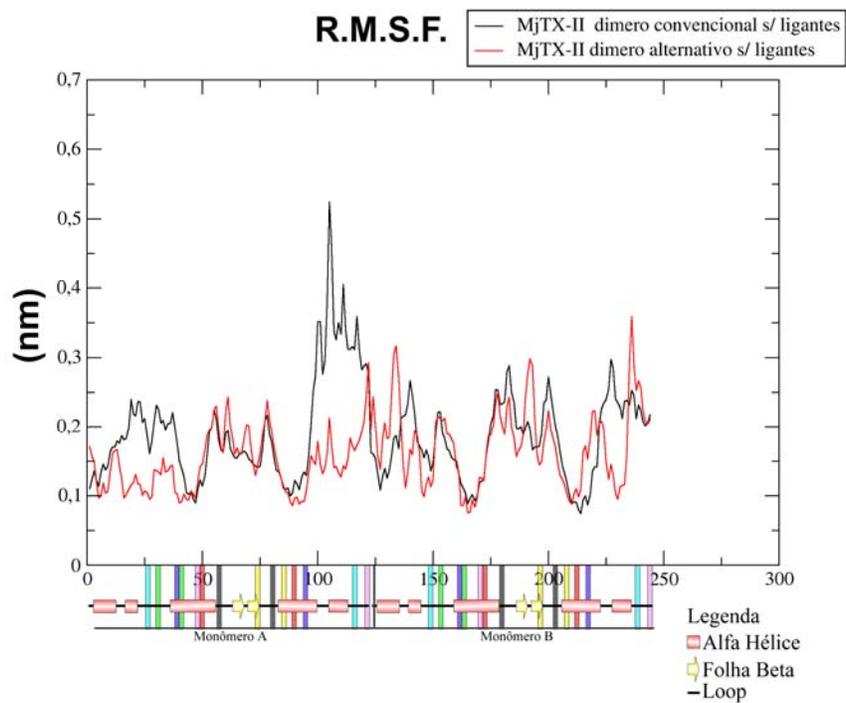


**Figura 9 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na ausência de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).**

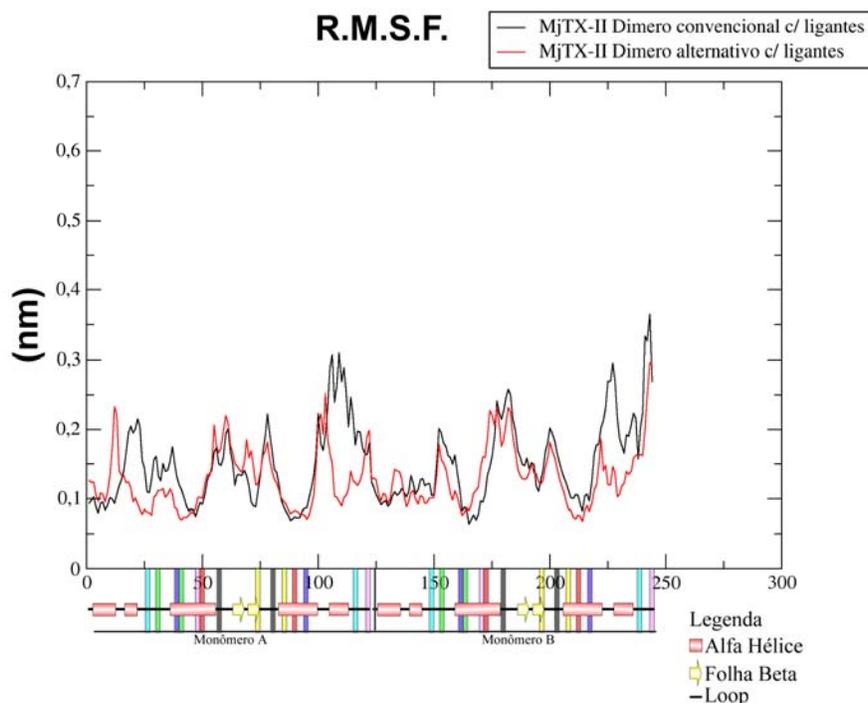


**Figura 10** – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.d. dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na presença de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)

Os gráficos de r.m.s.f. (*root mean square fluctuation* – flutuação quadrática média) dos resíduos dos modelos convencionais e alternativos da MjTX-II na ausência e presença de ligantes apresentaram resultados distintos. Como é visível nos gráficos das Figuras 11 e 12, a região dos resíduos 100 a 120 do monômero A do modelo convencional com e sem ligantes apresentou uma flutuação mais alta em relação aos seus correspondentes alternativos. Estes dados indicam que as porções C-terminais dos dímeros convencionais desprovidos de ligantes possuem um grau de flexibilidade superior à média geral dos resíduos dos modelos alternativos.



**Figura 11 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.f. dos resíduos dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na ausência de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004)**



**Figura 12 – Gráfico de comparação entre os valores de r.m.s.f. dos resíduos dos modelos finais com conformação oligomérica convencional e alternativa da MjTX-II na presença de ligantes (ácido esteárico). Gráfico gerado pelo programa XMgrace (Turner, 2004).**

### **4.3. Análise da qualidade estereoquímica dos modelos gerados pelas simulações de dinâmica molecular**

A análise da qualidade estereoquímica dos modelos diméricos alternativos e convencionais da MjTX-II na presença e ausência de ligantes mostrou que a porcentagem mínima de resíduos com angulações phi/psi energeticamente aceitáveis foi de 97,6% (Figuras 13 a 16). Tais valores indicam que os modelos gerados pelas simulações de dinâmica molecular possuem uma boa qualidade estereoquímica, o que valida as observações e análises realizadas neste trabalho.

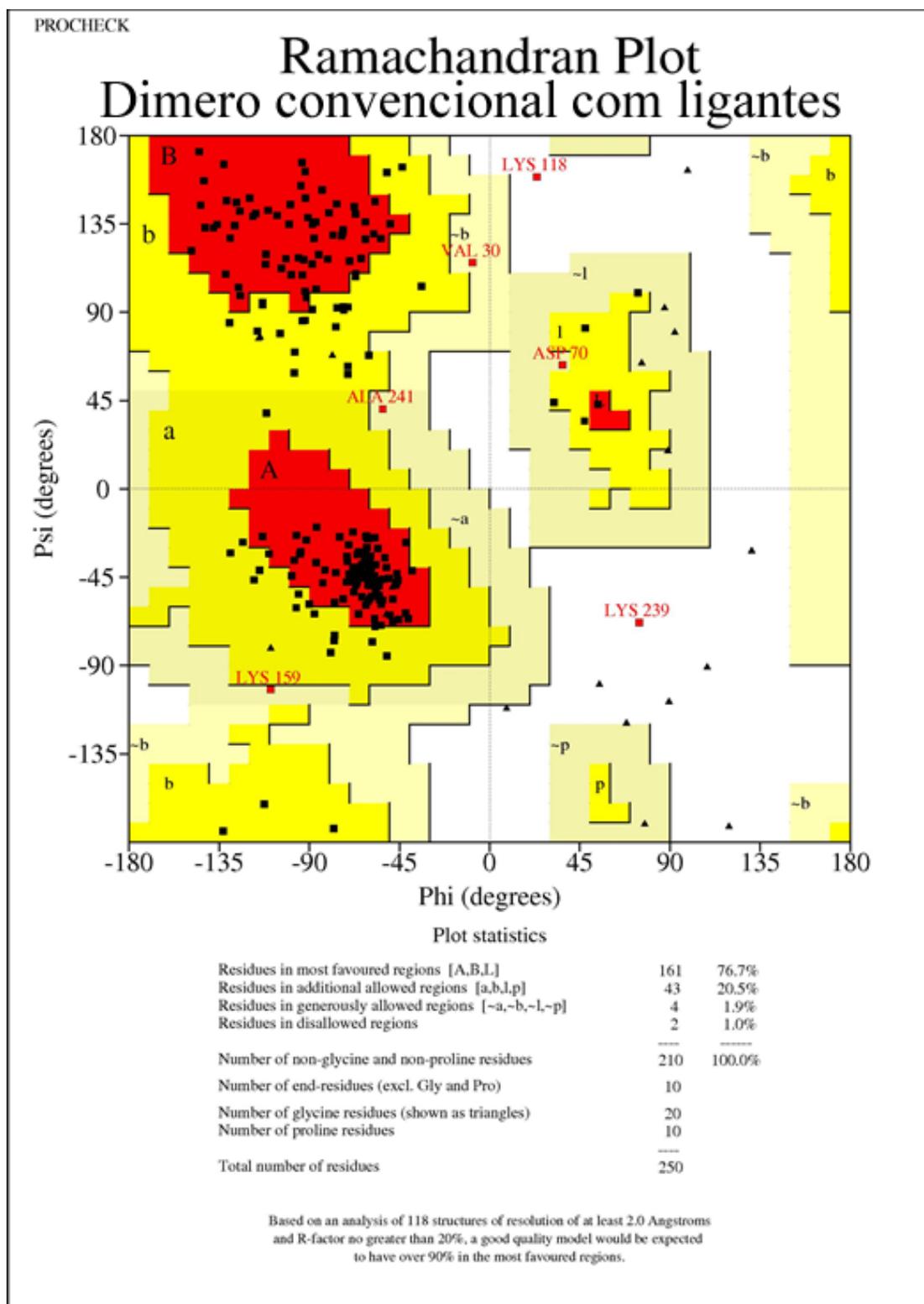


Figura 13 – Gráfico de Ramachandran do modelo convencional da MjTX-II complexo com moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

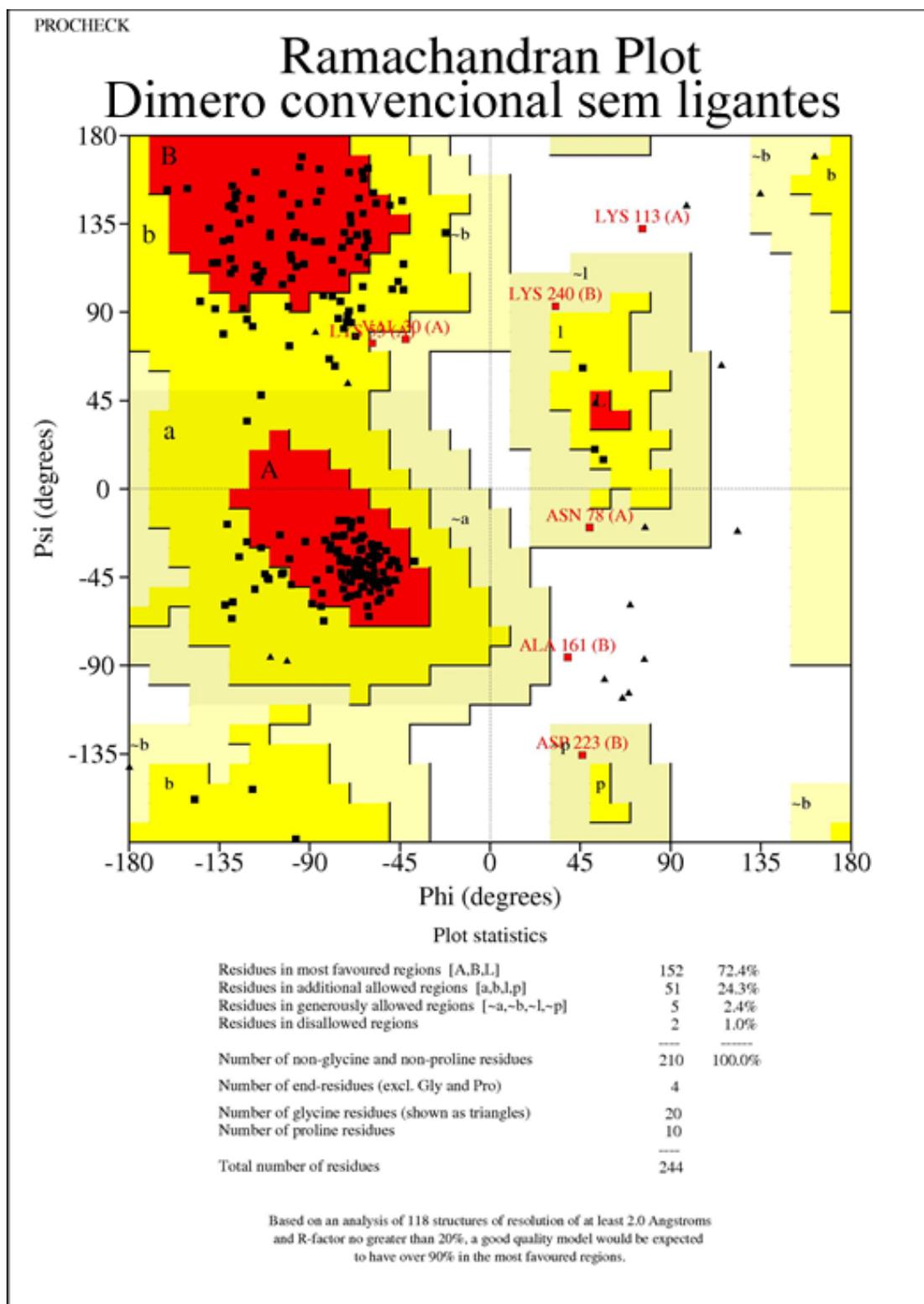


Figura 14 – Gráfico de Ramachandran do modelo convencional da MjTX-II desprovido de moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

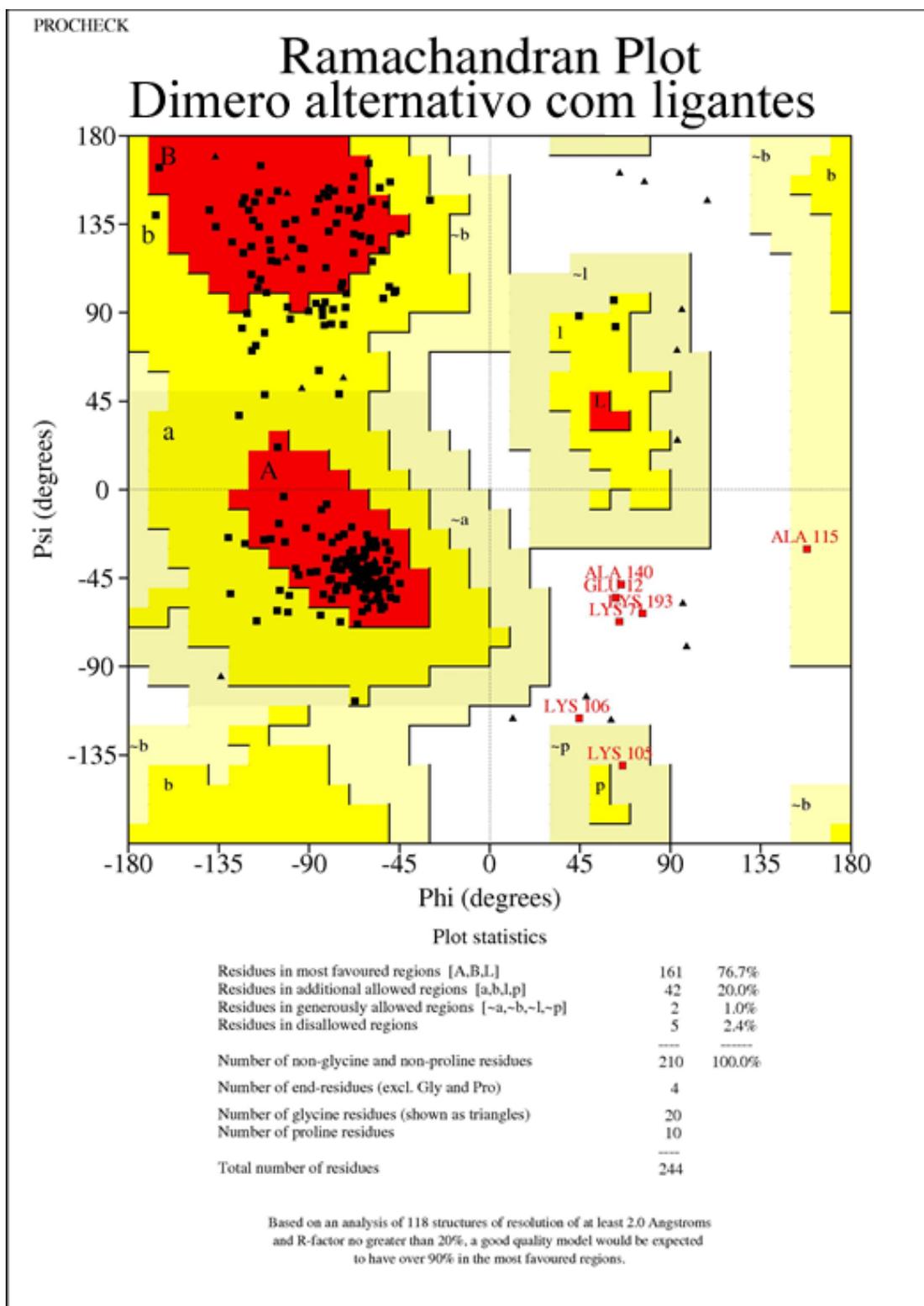


Figura 15 – Gráfico de Ramachandran do modelo alternativo da MjTX-II complexado com moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

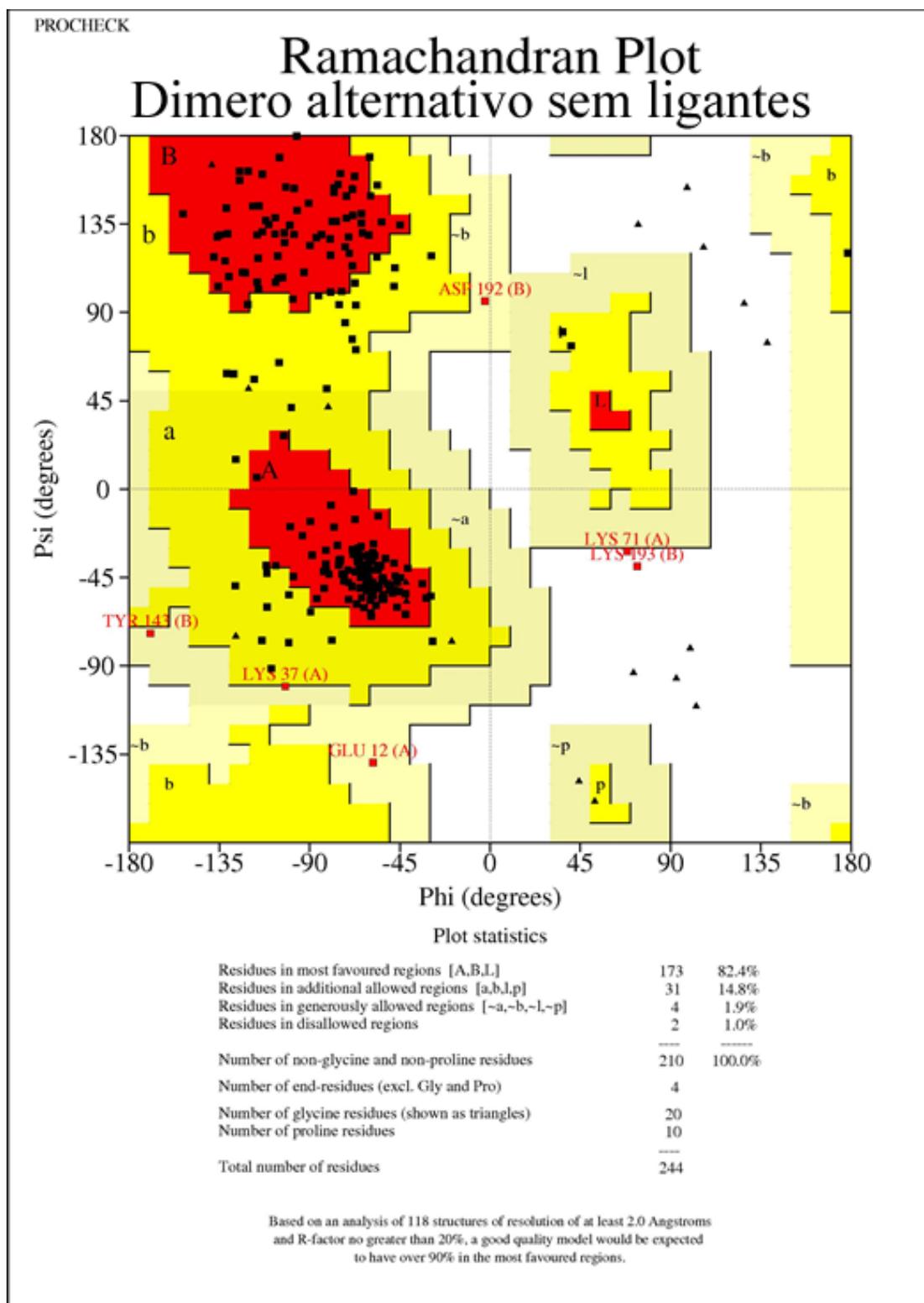


Figura 16 – Gráfico de Ramachandran do modelo alternativo da MjTX-II desprovido de moléculas de ácido esteárico após cinco nanossegundos de simulação de dinâmica molecular. Gerado pelo programa PROCHECK v.3.5.4 (Laskowski et al., 1993).

## 5. DISCUSSÃO

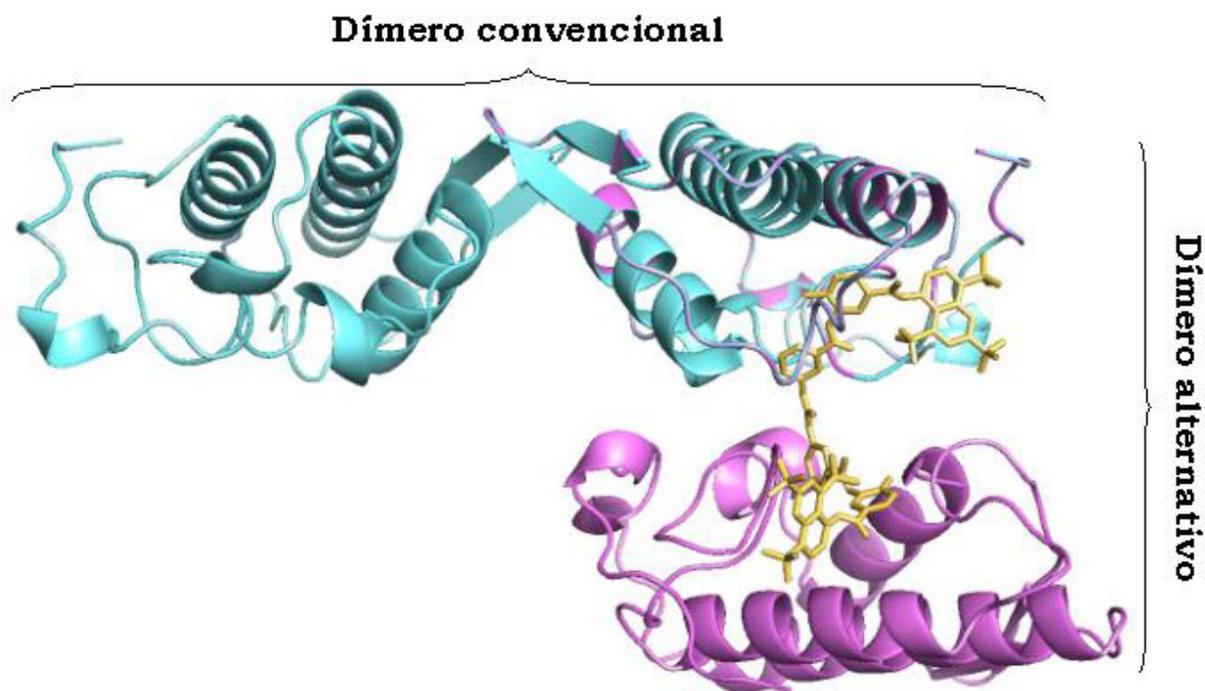
### 5.1. Desempenho dos compiladores

O *software* Intel mostrou-se mais vantajoso em comparação ao *software* GCC para a compilação do programa GROMACS, levando-se em consideração o fato de que ambos são de distribuição acadêmica gratuita. A possível razão deste resultado foi o melhor uso de instruções geradas durante a compilação, as quais possibilitaram um melhor uso das tecnologias presentes nos processadores e, conseqüentemente, otimizaram os processos de cálculo.

### 5.2. Análise dos modelos diméricos com conformação oligomérica e convencional na ausência e presença de moléculas de ácido esteárico

Como já demonstrado anteriormente, a conformação oligomérica de muitas estruturas já elucidadas de PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpentes em geral é um importante dado a ser levado em consideração para a compreensão das atividades e funções destas proteínas (Snijder et al., 1999; Dekker, 2000; Oliveira et al., 2001; Pan et al., 2001; Sanchez et al., 2001; Magro et al., 2003). Assim, é bastante provável que a conformação quaternária das Lys49-PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpentes também exerça um papel fundamental em suas propriedades miotóxicas. Por mais de dez anos tem se acreditado que as Lys49-PLA<sub>2</sub>s miotóxicas assumem uma conformação quaternária dimérica convencional onde o contato entre os

monômeros se dá através de resíduos localizados predominantemente nas regiões de  $\beta$ -wing (Figura 17). Entretanto, Murakami et al. (2005) propuseram uma conformação alternativa para o modelo cristalográfico dimérico de uma Lys49-PLA<sub>2</sub> isolada do veneno da serpente *Bothrops asper*, a BaspTX-II complexada com uma molécula de suramina (um composto simétrico polissulfonado). Nesta nova conformação oligomérica, o ligante (um inibidor) encontra-se inserido dentro dos canais hidrofóbicos dos monômeros, de modo que grande parte da molécula não estabelece contatos com as camadas de solvatação (Figura 17). Tal arranjo, de acordo com os autores, é mais entropicamente adequado do que a conformação oligomérica convencional, visto que o ligante interage com uma porção maior da estrutura protéica e evita contatos energéticos desfavoráveis com as moléculas de solvente.



**Figura 17 –** Conformação oligomérica convencional (em azul ciano) das Lys49-PLA<sub>2</sub>s a forma alternativa (em roxo) proposta por Murakami et al. (2005). A molécula de suramina (em amarelo) demonstra que o dímero alternativo é a mais apropriada para a complexação com este inibidor.

Com base nestas informações, as simulações de dinâmica molecular dos modelos com conformação oligomérica convencional ou alternativa da MjTX-II foram executadas para fornecer possíveis pistas acerca da estrutura biologicamente ativa desta proteína, já que os dados experimentais até agora obtidos não permitiram nenhuma conclusão definitiva a respeito desta questão. Para tanto, ambas as formas oligoméricas foram também submetidas a simulações de dinâmica molecular na presença ou ausência dos ligantes (moléculas de ácido esteárico) presentes no modelo cristalográfico original (PDB 1XXS). Estas últimas simulações foram realizadas com o intuito de se analisar as possíveis influências das moléculas de ácido esteárico e outros ligantes análogos na estabilidade energética das conformações oligoméricas testadas. Como demonstrado na Tabela 2, os valores de energia livre e as áreas de interface dos modelos obtidos após as simulações de dinâmica molecular já indicaram de antemão uma maior coerência estrutural dos dímeros alternativos em relação aos convencionais (Krissinel & Henrick, 2007). A variação de energia livre foi bem menor nos dímeros alternativos complexados ou não aos ligantes em comparação com os mesmos dímeros convencionais (-8,1 e -14,2 Kcal/M nos alternativos com e sem ligantes e 0,1 e -1,3 Kcal/M nos convencionais correspondentes). Do mesmo modo, os valores das áreas totais de interface dos modelos finais são outros fortes indícios da maior probabilidade de ocorrência da forma quaternária alternativa em solução (485,6 Å<sup>2</sup> e 708,3 Å<sup>2</sup> nos alternativos com e sem ligantes e 331,1 Å<sup>2</sup> e 375,2 Å<sup>2</sup> nos respectivos modelos convencionais).

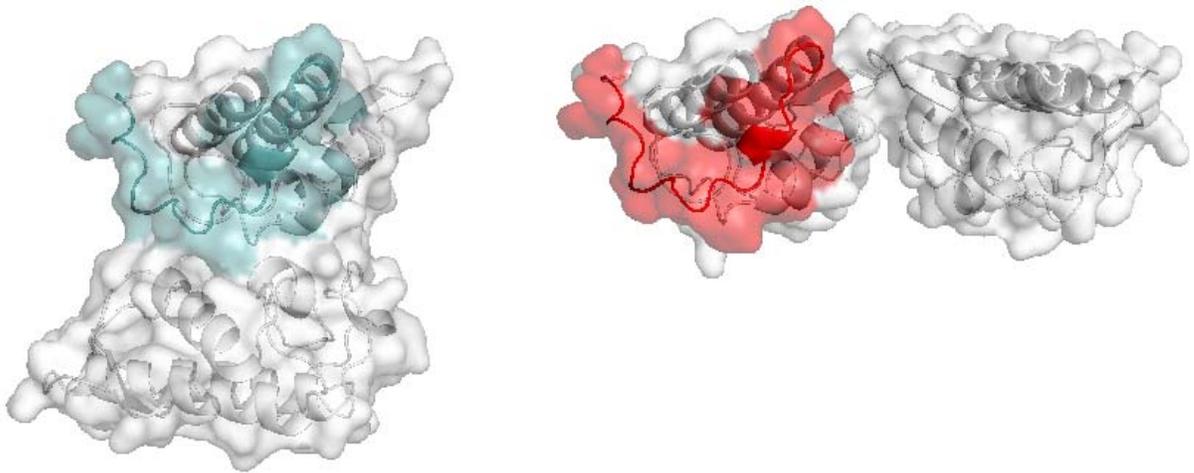
**Tabela 2 - Análise da área de interface e variação de energia livre ( $\Delta^iG$ ) dos modelos diméricos alternativos e convencionais da MjTX-II na presença ou ausência de ligantes (ácido esteárico) após um período calculado de cinco mil picossegundos nas simulações de dinâmica molecular. Os dados de  $\Delta^iG$  (em Kcal/M) indicam o ganho de energia livre de solvatação após a formação da interface dimérica (valores negativos correspondem a interfaces hidrofóbicas ou afinidade protéica positiva). Cálculos realizados com o programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007)**

	Dímeros Convencionais		Dímeros Alternativos	
	Interface ( $\text{Å}^2$ )	$\Delta^iG$ (Kcal/M)	Interface ( $\text{Å}^2$ )	$\Delta^iG$ (Kcal/M)
<b>MjTX-II c/ moléculas de ác. esteárico</b>	331,1	0,1	485,6	-8,1
<b>MjTX-II s/ moléculas de ác. esteárico</b>	375,2	-1,3	708,3	-14,2

Da mesma forma, a análise dos gráficos de variação de r.m.s.d (*root mean square deviation* – desvio quadrático médio) referentes aos resultados obtidos após as simulações de dinâmica molecular indicaram que os modelos alternativos com ou sem ligantes mostraram uma tendência maior de estabilização em comparação aos seus modelos convencionais correspondentes (Figuras 3, 4, 9 e 10). Estes dados foram também corroborados pelas distâncias observadas entre os centros de massa dos monômeros dos modelos obtidos. Nos dímeros alternativos o distanciamento entre os monômeros mostrou-se menor e mais uniforme (em torno de 25 Å), ao passo que nos dímeros convencionais este parâmetro apresentou um valor inicial superior (aproximadamente 32,5 Å) e sofreu oscilações de maior amplitude durante as simulações (Figuras 4 e 6).

Os gráficos de r.m.s.f. (*root mean square fluctuation* – flutuação quadrática média) dos resíduos dos modelos forneceram outra informação interessante a respeito da estabilidade das estruturas oligoméricas. De acordo com esta análise, as regiões C-terminais

dos monômeros A (resíduos 100 a 133) dos dímeros convencionais mostram uma instabilidade maior em relação aos mesmos monômeros em seus modelos alternativos correspondentes (Figuras 11 e 12). Este desvio é especialmente interessante no caso dos modelos desprovidos de ligantes, nos quais nota-se um desvio extremamente pronunciado cujo pico chega a ultrapassar 0,5 nm (5,0 Å). Uma possível explicação para este fato pode estar relacionada à localização das regiões C-terminais dos monômeros A nos modelos convencionais e alternativos. Nos primeiros esta porção da estrutura encontra-se mais exposta ao solvente do que nos modelos alternativos, onde a região C-terminal dos monômeros A correspondentes está mais próxima da interface dimérica (Figura 18). A análise da composição dos aminoácidos terminais da MjTX-II mostra uma relativa predominância de resíduos hidrofóbicos, o que explica em parte a alta instabilidade desta região quando exposta diretamente ao solvente e reforça a baixa coerência estrutural dos modelos convencionais em relação aos alternativos. Curiosamente, as moléculas de ácido esteárico parecem diminuir a instabilidade das regiões C-terminais dos monômeros A nos modelos convencionais, porém, como já demonstrado pelos demais dados, não são capazes por si só de manter a estabilidade destas estruturas. Por outro lado, não foi possível estabelecer-se o motivo pelo qual as regiões C-terminais dos monômeros B dos modelos estudados não apresentam o mesmo padrão de flutuação de suas porções correspondentes localizadas nos monômeros A. Provavelmente, interações não identificadas afetem a estrutura terciária dos monômeros de maneira desigual, explicando assim não só a flutuação desigual das regiões terminais como também a assimetria geral verificada entre os monômeros de todos os modelos.



**Figura 18 – Disposição relativa das regiões C-terminais dos monômeros A dos modelos oligoméricos alternativos (em azul) e convencionais (em vermelho) obtidos após as simulações de dinâmica molecular. Nos modelos alternativos estas regiões estão mais voltadas para a interface dimérica em comparação com os modelos convencionais, onde se encontram mais expostas ao solvente. Ilustração gerada pelo programa PyMol (Delano, 2002)**

Por fim, todos os dados de dinâmica molecular obtidos neste trabalho indicaram que os modelos diméricos alternativos da MjTX-II complexados ou não a moléculas de ácido são mais estáveis que seus correspondentes alternativos e, portanto, possuem uma probabilidade maior de corresponderem à forma biologicamente ativa desta toxina. Contudo, novos estudos cristalográficos e espectroscópicos devem ser realizados para comprovação das hipóteses teóricas aqui levantadas.

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados das simulações de dinâmica molecular permitiram concluir que os modelos teóricos da forma dimérica alternativa da miotoxina MjTX-II de *Bothrops moojeni* complexada ou não a moléculas de ácido são mais estáveis em solução quando comparados a seus correspondentes convencionais. Conseqüentemente, é possível afirmar que a forma dimérica alternativa da MjTX-II possui uma maior probabilidade de corresponder à forma biologicamente ativa desta miotoxina. Contudo, novos estudos cristalográficos e espectroscópicos devem ser realizados para comprovação das hipóteses teóricas aqui levantadas.

Também concluímos que o *software* Intel mostrou-se mais vantajoso em comparação ao GCC para a compilação do programa GROMACS, provavelmente em função do melhor uso de instruções geradas durante a compilação, que possibilitaram a otimização dos processos de cálculo.

## 7. REFERÊNCIAS\*

Alder, B.J., Wainwright, T.E., Studies In Molecular Dynamics. I. General Method. J. Chem. Phys. V31. 459, 1959

Allen, M. P., Tildesley, D. J. Computer Simulation Of Liquids 1989

Bazan, N. G.; Colangelo, V; Lukiw, W. J. Prostaglandins Other Lipid Mediat., V.68-69, P.197-210, 2002.

Berendsen, H.J.C., Van Der Spoel, D., Van Drunen, R. Gromacs: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. Comp. Phys. Comm., V.91, P.43-56, 1995.

Berendsen, J.P.M. Et Al. Interaction Models For Water In Relation To Protein Hydration. In: Pullman, B. (Ed.). Intermolecular Forces. D. Reidel Publishing Company: Dordrecht, P.331-342, 1981.

Berger, O., O. Edholm, and F. Jahnig. Molecular dynamics simulations of a fully hydrated bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. Biophys. J. 72:2002-2013, 1997

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação -

Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

Boente, A. Construindo Algoritmos Computacionais. P31, 2003.

C. James McKnight<sup>1</sup>, Paul T. Matsudaira & Peter S. Kim, NMR structure of the 35-residue villin headpiece subdomain, *Nature Structural Biology* 4, 180 - 184 , doi:10.1038/nsb0397-180, 1997.

Clore, G. M., Gronenborn, A. M., New Methods Of Structure Refinement For Macromolecular Structure Determination By Nmr. *Proc. Natl Acad. Sci Usa*, 95:5891-5898, 1998.

Da Silva-Giotto, M. T.; Garrat, R. C.; Oliva, G. Et Al. *Prot. Struc. Func. Gen.*, V.30, P.442-454, 1998.

De Azevedo Jr., W. F.; Ward, R. J.; Canduri, F. Et Al. *Toxicon*, V.36, P.1395-1406, 1998.

DEKKER, N. Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol. Microbiol.*, v.35, p.711–717, 2000.

Delano, W.L. The Pymol Molecular Graphics System . Website [Http://Www.Pymol.Org](http://www.Pymol.Org),

Díaz, C.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. *Arch. Biochem. Biophys.*, V.298, P.135-142, 1992.

Francis, B.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Et Al. Arch. Biochem. Biophys., V.284, P.352-359, 1991.

Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. In: Kini, R. M. (Ed), Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function And Mechanism. Chichester: Wiley, 1997. P.321-352.

Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Toxicon, V.33, P.1405-1424, 1995.

Hassan, S A. Amino Acid Side Chain Interactions In The Presence Of Salts. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys. 109(46). P.21989–21996.2005

Hockney, R. W.; Eastwood, J. W. Computer Simulation Using Particles McGraw-Hill International Book Co., 1981.

Jorgensen, W. L. , Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., Klein, M. L., Comparison Of Simple Potential Functions For Simulating Liquid Water, The Journal Of Chemical Physics, Vol. 79, No. 2. , Pp. 926-935, 1983.

Korostelev, A., Bertram, R. And Chapman, M. S. "Simulated Annealing Real-Space Refinement As A Tool In Model Building". Acta Cryst. D58, 761-767, 2002.

Krissinel E. and Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. 372, 774--797. 2007

Laskowski, R.A., M.W. MacArthur, D.S. Moss, and J.M. Thornton. . PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*26:283–291, 1995.

Leach, A., *Molecular Modelling: Principles And Applications (2nd Edition)*, Prentice Hall, 2001.

Lee, W. H.; Da Silva-Giotto, M. T.; Marangoni, S. Et Al. *Biochemistry*, V.40, P.28-36, 2001.

Lindahl, E., Hess, B., Van Der Spoel, R. *Gromacs 3.0: A Package For Molecular Simulation And Trajectory Analysis. J. Mol. Mod.*, V.7, P.306-317, 2001.

Liu, S. Y.; Yoshizumi, K.; Oda, N. Et Al. *J. Biochem.*, V.107, P.400-408, 1990.

Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A. Et Al. *J. Biol. Chem.*, V.269, P.29867-29873, 1994.

Magro, A. J.; Murakami, M. T.; Marcussi, S. Et Al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, V.323, P.24-31, 2004.

Magro, A.J., Soares, A.M., Giglio, J.R., Fontes, M.R.M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.311, p.713-720, 2003.

Marangone, J. M.; Merutka, G; Cho, W. Et Al. J. Biol. Chem., V.259, P.13839-13843, 1984.

Marchi-Salvador, D. P.; Silveira, L. B.; Soares, A. M. Et Al. Acta Crystallogr., V.F61,  
P.882-884, 2005

Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth , M.N., Teller, A.H. And Teller, E.. J. Chem.  
Phys. 21,, P. 1087, 1953.

Needleman, P.; Turk, J.; Jakschik, B. A. Et Al. Annu. Rev. Biochem., V.55, P.69-102, 1986.

Noponen, M.; Sanfilipo, N.; Saminich, K. Et Al. Biol. Psychiatry., V.34, P.641-649, 1993.

OLIVEIRA, A.H. et al. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-  
phospholipase A2 abolishes Ca<sup>2+</sup>-independent membrane damaging activity. Biochemistry,  
v.40, p.6912-6920, 2001.

Oostenbrink, C. Et Al. Validation Of The 53a6 Gromos Force Field. Eur. Biophys. J., V.34,  
P.273-284, 2005.

P. V. Krishna Pant and Richard H. Boyd, Molecular-dynamics simulation of diffusion of  
small penetrants in polymers, Macromolecules, 26(4) pp 679 - 686, DOI:  
10.1021/ma00056a019, 1993

PAN, Y.H. et al. Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A2: relationship to interface binding. *Biochemistry*, v.40, p.609-617, 2001.

Petsko,G. And Ringe,D. *Protein Structure And Function: From Sequence To Consequence*. New Science Press, London, 2002.

Rahman, A., Stillinger, F. H. "Improved Simulation Of Liquid Water By Molecular Dynamics,"*Journal Of The American Chemical Society*95, 7943, 1973.

Ross, B. M.; Hudson, C.; Erlich, J. Et Al. *Arch. Gen. Psychiatry*, V.54, P.487-494, 1997.

Ross, B. M.; Mamalias, N.; Moszczynska, A. Et Al. *Neuroscience*, V.102, P.899-904, 2001.

Rufini, S.; Cesaroni, P.; Desideri, R. F. Et Al. *Biochemistry*, V.31, P.12424-12430, 1992.

SANCHEZ, S.A. et al. Solution and interface aggregation states of *Crotalus atrox* venom phospholipase A2 by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry*, v.40, p.6903-6911, 2001.

Schlick, T. *Molecular Modeling And Simulation: An Interdisciplinary Guide*. Springer-Verlag New York, Inc, 2002.

Schuettelkopf A. W., Van Aalten D. M. F. ProdrG - A Tool For High-Throughput Crystallography Of Protein-Ligand Complexes. *Acta Crystallographica D60*, P.1355--1363 2004

Scott, D. L.; Achari, A.; Vidal, J. C. Et Al. *J. Biol. Chem.*, V.267, P.22645-22657, 1992.

Six, D.A., Dennis, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1488, p.1-9, 2000.

SNIJDER, H.J. et al. Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature*, v.401, p.717-721, 1999.

Soares, A. M.; Guerra-Sá, R.; Borja-Oliveira, C. R. Et Al. *Arch. Bioch. Biophys.*, V.378, P.201-209, 2000.

Turner, P. J.; Grace Development Team [<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>],  
Copyright (c) 1996-2008 acessado em fevereiro de 2008

Van Gunsteren Wf, Berendsen Hjc. Computer Simulation Of Molecular Dynamics: Methodology, Applications And Perspectives In Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 1990;29:992-1023.

Watanabe, L.; Soares, A. M.; Ward. R. J. Et Al. *Biochemie*, V.87, P.161-167, 2005.

Yong Duan, Lu Wang, Peter A. Kollman The Early Stage Of Folding Of Villin Headpiece  
Subdomain Observed In A 200-Nanosecond Fully Solvated Molecular Dynamics  
Simulation Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, Pp. 9897–9902, 1998

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)