

**Pedro Henrique Monteiro Torres**

**Estudo do Fragmento N-Terminal da Endostatina por  
Modelagem e Dinâmica Molecular**



**Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biofísica Carlos Chagas Filho,  
como pré-requisito para a obtenção  
do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas (Biofísica).**

**INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Trabalho realizado no Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação do Professor Dr. Pedro Geraldo Pascutti e co-orientação do Dr. Gabriel Limaverde Soares Costa Sousa.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Torres, Pedro Henrique Monteiro

Estudo do Fragmento N-Terminal da Endostatina por Modelagem e Dinâmica Molecular / Pedro Henrique Monteiro Torres - Rio de Janeiro, 2010.

viii; 118p.

Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientador: Pedro Geraldo Pascutti

Referências bibliográficas: 69-74.

1. Câncer 2. Dinâmica Molecular 3. Endostatina 4. Angiogênese  
5. Peptídeos Endógenos

I.Pascutti, Pedro Geraldo (Orientador). II. UFRJ. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado em Ciências Biológicas: Biofísica. III. Estudo do Fragmento N-Terminal da Endostatina por Modelagem e dinâmica Molecular

## Agradecimentos

A todos aqueles que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, muito obrigado.

Muito obrigado a meus colegas do laboratório, que jamais se negaram a ajudar, mesmo que a ajuda às vezes fosse: *google it*. Muito obrigado aos meus orientadores, Pedro Pascutti e Gabriel Limaverde, à eles eu devo muito respeito e muita gratidão. Muito obrigado a todos os meus professores, do ensino fundamental ao superior.

Muito obrigado também aos meus amigos, que me lembram constantemente que a vida não se resume às responsabilidades tornando suportáveis as longas horas que dediquei a este manuscrito.

Muito obrigado aos meus familiares, a confiança em minhas capacidades muitas vezes capacitou a minha confiança. Um obrigado especial ao meu primo Matheus que é como um irmão mais novo para mim, à minha tia Martha, que é uma grande amiga com muito senso de humor e ao meu avô Antônio Carlos, que é o exemplo em que me espelho e que, apesar de um pouco retrógrado, é a pessoa mais íntegra que conheço.

Muito obrigado a minha avó Marly, que me criou com muita paciência, muito carinho e de quem herdei grande parte da minha personalidade, saudades.

Muito obrigado a minha mãe, Claudia, cujo altruísmo me inspira, sempre me inspirou, e que, às vezes um tanto rispidamente, me ensina que viver exclusivamente para si próprio é um viver vazio.

Por fim, muito obrigado àquela pessoa que me impulsiona à frente dia após dia, que me irrita, que me tranqüiliza, que me ama, e que há mais de um ano é quem dá sentido a tudo que faço. Obrigado Raysa.

## RESUMO

Torres, Pedro Henrique Monteiro. Estudo do Fragmento N-Terminal da endostatina por Modelagem e Dinâmica Molecular. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A endostatina é uma potente proteína antiangiogênica derivada do colágeno XVIII, cujo mecanismo de ação ainda não é completamente compreendido. Anteriormente, foi provado que o fragmento N-terminal da endostatina, contendo 27 resíduos, possui atividade antitumoral, antimigratória e antipermeabilidade comparáveis à da proteína solúvel íntegra. Para compreender como este peptídeo pode exercer funções tão elaboradas, neste estudo foram realizadas análises estruturais utilizando simulações de dinâmica molecular para avaliar o seu comportamento em ambiente aquoso. Mostrou-se que o peptídeo N-terminal da endostatina murina com 27 resíduos é capaz de assumir uma estrutura bem definida, enovelando-se em uma conformação de grampo-beta dependente de zinco, o que não ocorre com o peptídeo humano de mesma extensão. Observamos que a presença de cargas positivas conferidas por argininas em ambas as extremidades do peptídeo humano exerce repulsão eletrostática, gerando instabilidade. De fato, ao simularmos um peptídeo mutante sem arginina em uma das extremidades (R4Q) e um peptídeo menor (N25), eliminando uma das três argininas, a tendência de formar folhas-beta foi restaurada. Para os peptídeos murino e humano, a coordenação do íon zinco por três histidinas é mantida ao longo das simulações de dinâmica molecular, já no caso dos peptídeos humanos N25 e mutado (R4Q) a coordenação é perdida durante a simulação de dinâmica molecular. Mostramos que um mínimo de 20 resíduos é a menor porção capaz de manter a conformação em folha-beta observada no do peptídeo murino. Finalmente, esse estudo mostrou que a conformação de grampo-beta assumida pelo peptídeo da endostatina murina na presença de zinco apresenta uma grande similaridade estrutural com o domínio de ligação à integrina da cadeia alfa do colágeno IV, presente em moléculas antiangiogênicas como arresteno, canstatina e tumstatina.

## ABSTRACT

Torres, Pedro Henrique Monteiro. Estudo do Fragmento N-Terminal da Endostatina por Modelagem e Dinâmica Molecular. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Endostatin is a potent antiangiogenic protein derived from collagen XVIII which mechanism of action is still not completely understood. It has been previously shown that the 27 amino acid N-terminal fragment of murine endostatin has antitumor, antimigration and antipermeability activities comparable to the full soluble protein. In order to understand how this peptide can exert such elaborate function, in this work we performed structural analysis using molecular dynamics simulation to evaluate the behavior of this fragment in aqueous environment. Here we show that the N-terminal peptide of murine endostatin with 27 residues is able to assume a well-defined structure, folding into a zinc-dependent beta-hairpin conformation, in contrast to the N-terminal peptide of human endostatin with the same length, which failed to acquire a stable conformation. We found that the presence of positive charges conferred by arginine residues at both ends of the human peptide produces electrostatic repulsion, thus generating instability. In fact, the simulation of a mutant peptide without an arginine at one end (R4Q) and of a smaller peptide (N25) without one out of three arginines, showed that both systems tended to form beta-sheet conformations. In the case of the murine and human peptides, the coordination of the zinc ion by three histidines is maintained during the entire molecular dynamics simulation, but for the smaller human peptide N25 and the mutant (R4Q) the coordination is lost. A minimum of 20 residues is required maintain the beta-sheet conformation observed for the murine peptide. Finally, we show that the beta-hairpin conformation assumed by the peptide of murine endostatin with zinc has a high structural similarity with the integrin-binding domain of the alpha chain of collagen IV, present in antiangiogenic molecules like arresten, canstatin and tumstatin.

## Abreviações

Å	Angstrom
Ang2	Angiopietina 2
CG	Gradientes Conjugados
ECM	Matriz Extracelular
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ES	Endostatina
F.D.A.	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
IGF	Fator de Crescimento Similar à Insulina
IP-10	Proteína Humana Induzida por Interferon 10
kDa	Quilodalton
I-BFGS	Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno de Baixa Memória
MDR	Múltipla Resistência a Drogas
MMP	Metaloprotease de Matriz
MRB	Moduladores da Resposta Biológica
NC1	Região Não-colágena 1
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
ns	Nanossegundo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD-ECGF	Fator de Crescimento de Células Endotélias Derivado de Plaquetas
PDGF-B	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PF-4	Fator Plaquetário 4
PGF/PLGF	Fator de Crescimento Placentário
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
ps	Picossegundo
RCSB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
RF	Campo de Reação
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Médio
SD	Máximo Declive
SPC	Carga de Ponto Simple
TGFb	Fator de Crescimento Transformante beta 1
Tie2	Receptor de Angiopietinas
TNF-a	Fator Alfa de Necrose Tumoral
VEGF	Fator de Crescimento de Endotélio Vascular



# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. PANORAMA MUNDIAL DO CÂNCER E CONCEITOS BÁSICOS .....	1
1.2. TRATAMENTO CONVENCIONAL DO CÂNCER E SUAS CONSEQUÊNCIAS .....	4
1.3. ANTI-ANGIOGÊNESE .....	5
1.4. ENDOSTATINA.....	8
1.5. FRAGMENTOS DA ENDOSTATINA APRESENTAM ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	13
1.6. PEPTÍDEO N-TERMINAL DA ENDOSTATINA E A MOTIVAÇÃO DO ESTUDO.....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>17</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	17
3.2. MODELAGEM DO FRAGMENTO N-TERMINAL.....	21
3.3. ANÁLISE DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS.....	26
3.4. DISTRIBUIÇÃO RADIAL DE MOLÉCULAS DE ÁGUA AO REDOR DO ÍON ZINCO - G(R) E CÁLCULO DA DISTÂNCIA DO ÍON ÀS HISTIDINAS. ....	27
3.5. ANÁLISE DE RAIZ QUADRADA DO DESVIO MÉDIO (RMSD) .....	28
3.6. ANÁLISE DA RAIZ QUADRADA DA FLUTUAÇÃO MÉDIA (RMSF).....	28
3.7. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS CONFORMAÇÕES EM GRUPOS ESTRUTURAIS ( <i>CLUSTERS</i> ) .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. OS PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PORÇÃO N-TERMINAL DA ENDOSTATINA HUMANA E MURINA POSSUEM COMPORTAMENTOS DISTINTOS AO LONGO DA DINÂMICA. ....	30
4.2. AS ARGININAS DAS POSIÇÕES 4 E 27 EXERCEM REPULSÃO ELETROSTÁTICA NO PEPTÍDEO HUMANO (N27hES). 33	
4.3. COORDENAÇÃO DO ÍON ZINCO NO PEPTÍDEO MURINO (N27mES+) E NOS DIFERENTES PEPTÍDEOS HUMANOS (N27hES+, N25hES+ E N27hES+/R4Q).....	37
4.4. O PEPTÍDEO MURINO NA AUSÊNCIA DE ZINCO (N27mES-) CONVERGE RAPIDAMENTE PARA UMA CONFORMAÇÃO SABIDAMENTE INATIVA. ....	42
4.5. O PEPTÍDEO MURINO NA PRESENÇA DE ZINCO (N27mES+) ATINGE UMA CONFORMAÇÃO ESTÁVEL EM GRAMPO-BETA SIMILAR AO ARRESTENO. ....	43
4.6. UMA VEZ ESTABELECIDO, A FOLHA BETA PODE SER MANTIDA POR UM MÍNIMO DE 20 AMINOÁCIDOS. ....	45
4.7. ANÁLISE GERAL DAS TRAJETÓRIAS DE SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR PELA PROGRESSÃO DE CLUSTERS .....	47
4.7.1. N27mES+ .....	47
4.7.2. N27mES- .....	50
4.7.3. N27hES+ .....	52
4.7.4. N27hES- .....	54
4.7.5. N25hES+ .....	56
4.7.6. N27hES+/R4Q.....	58
4.7.7. N20mES- .....	60
4.7.8. N18mES- .....	62
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>
<b>8. ANEXO: ARQUIVOS DE PARÂMETROS</b> .....	<b>75</b>
8.1. MÁXIMO DECLIVE COM RESTRIÇÃO DE POSIÇÕES.....	75
8.2. MÁXIMO DECLIVE COM RESTRIÇÃO DE POSIÇÕES.....	80
8.3. GRADIENTES CONJUGADOS.....	85
8.4. DINÂMICA MOLECULAR COM RESTRIÇÃO DE POSIÇÕES.....	90
8.5. DINÂMICA MOLECULAR SEM RESTRIÇÃO DE POSIÇÕES.....	95
<b>9. ANEXO: MANUSCRITO EM DESENVOLVIMENTO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>101</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Panorama mundial do câncer e conceitos básicos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), câncer é um termo genérico para um grupo de mais de cem doenças que podem afetar qualquer parte do corpo e que possuem como característica o rápido crescimento de células anormais dotadas de potencial invasivo e metastático. Dados estatísticos mostram que: das 58 milhões de mortes ocorridas mundialmente no ano de 2005, aproximadamente 7,6 milhões (ou 13%) foram decorrentes de cânceres. Ao levar em consideração apenas as estatísticas relacionadas à Europa, a porcentagem da mortalidade causada por cânceres aumenta para 19% e no caso da América do Norte, aumenta para 23% (FERLAY, *et al.*, 2004). O controle e a minimização da incidência dos casos de câncer são, portanto, reais desafios para os órgãos de saúde pública.

Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos em que se originam. Os carcinomas são cânceres de origem epitelial e os sarcomas têm origem em células musculares ou tecido conjuntivo. Outros tumores como os de tecido nervoso, as leucemias e os linfomas não são caracterizados como sarcomas ou carcinomas (ALBERTS, *et al.*, 2008). Quando a neoplasia afeta células do sistema nervoso central ou periférico surgem os chamados tumores neuroectodermiais. Neoplasias das linhagens linfóides (linfócitos B e T) são classificadas como linfomas e geralmente se agregam para formar massas tumorais sólidas enquanto as leucemias geram células transformadas dispersas na circulação (WEINBERG, 2007).

Os sarcomas não ocorrem frequentemente e consistem em apenas 1% dos tumores encontrados em clínicas oncológicas. Os carcinomas, por sua vez são responsáveis por mais de 80% dos óbitos relacionados ao câncer no mundo ocidental. Existem ainda outros tumores como o melanoma que não se encaixam em nenhum dos quatro grandes grupos mencionados (WEINBERG, 2007).

Os dados apresentados em um documento da OMS (*Fact sheet* Nº 297) mostram que a mortalidade por câncer deve-se principalmente a câncer de pulmão (1,3 milhões de mortes ao ano), câncer de estômago (aproximadamente um milhão de mortes ao ano), câncer hepático (662.000 mortes ao ano), câncer de cólon (655.000 mortes ao ano) e câncer de mama (502.000 mortes ao ano). Esses dados evidenciam a predominância de tumores sólidos, dependentes de neovascularização, em detrimento dos dispersos nos fluidos corporais.

Uma característica da formação dos cânceres é que eles se desenvolvem a partir do acúmulo de mutações genéticas, o que pode ser interpretado como um processo microevolutivo no qual as células sofrem sucessivas mutações e adquirem fenótipos que lhes conferem vantagens replicativas sobre as células adjacentes como: déficit na taxa apoptótica, insensibilidade a estímulos anti-proliferativos

externos, aumento na taxa mitótica, estabilização dos telômeros, indução de angiogênese e desenvolvimento de potencial metastático (ALBERTS, *et al.*, 2008) (Figura 1.1).

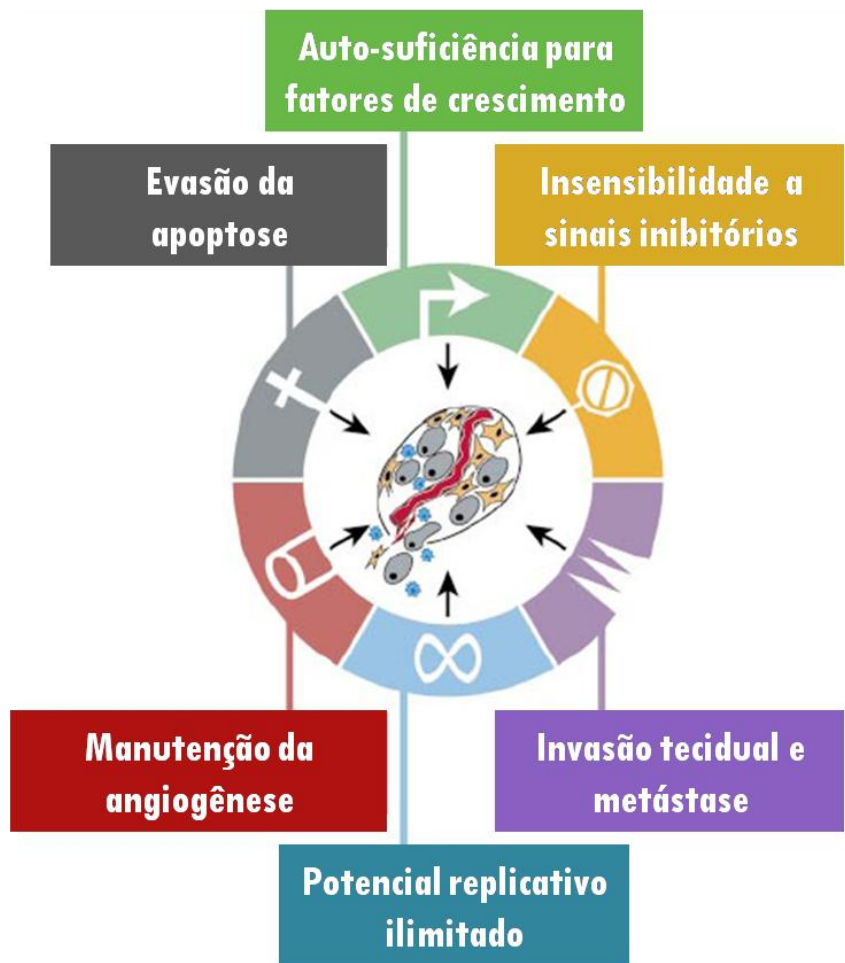


Figura 1.1 – Características Adquiridas do Câncer. Muitos, se não todos os cânceres adquiriram o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante seu desenvolvimento através de variadas estratégias. Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2000.

O acúmulo de mutações adquiridas por uma célula até ser considerada uma célula transformada não obedece a um roteiro fixo (Figura 1.2); os oncogenes e genes supressores de tumor podem ser alterados sem uma ordem obrigatória e de modos distintos; entretanto, as características descritas anteriormente devem se manifestar para que ocorra o desenvolvimento da neoplasia (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

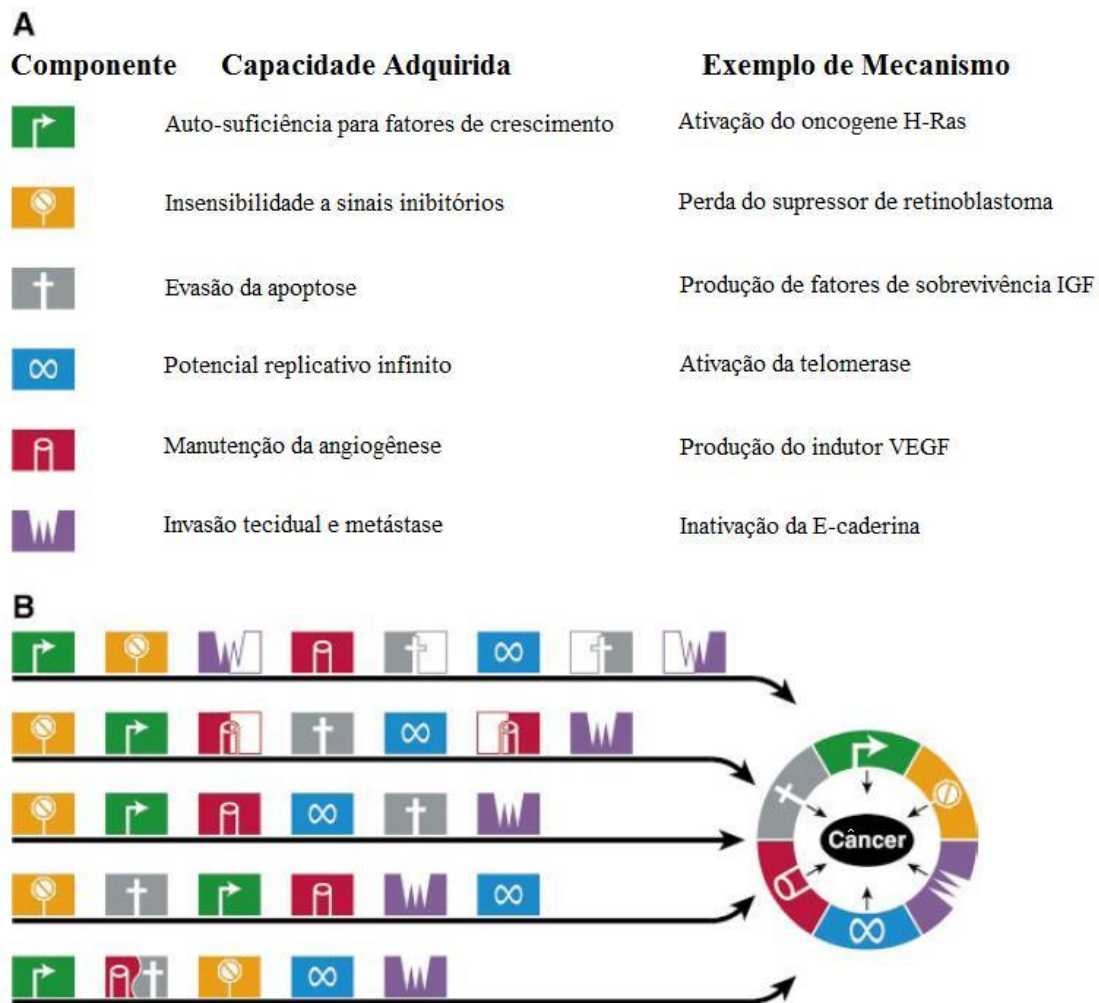


Figura 1.2 - Praticamente todos os cânceres devem adquirir as mesmas seis características principais (A), mas seus meios de fazê-lo podem variar significativamente, tanto quanto aos mecanismos, quanto cronologicamente (B). Portanto, a ordem em que essas características são adquiridas está sujeita a variações entre os diversos tipos e subtipos de câncer. Além disso, em alguns tumores, uma alteração genética específica pode conferir muitas características simultaneamente, diminuindo o número de passos mutacionais necessários pra completar a tumorigênese. Assim, a perda da função do gene supressor de tumor p53 pode facilitar tanto a angiogênese quanto a resistência à apoptose (como mostrado no progresso de cinco etapas), assim como conferir a característica de instabilidade genômica. Em outros tumores uma característica pode ser adquirida através da conjunção de duas ou mais alterações genéticas aumentando dessa forma o número de passos necessários para o desenvolvimento do tumor. Portanto, na progressão de oito passos apresentada, invasão/metástase e resistência à apoptose são adquiridas em duas etapas cada. Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2000.

A metástase é um fenômeno no qual células transformadas se desacoplam do tumor primário e, através dos vasos condutores do organismo, deslocam-se até um local remoto e ali continuam a sofrer mitoses desreguladas gerando tumores secundários. 80% das mortes causadas por cânceres são devido à ocorrência de metástases que comprometem o desempenho das funções fisiológicas (WEINBERG, 2007). As células metastáticas atingem outros locais do organismo através dos vasos sanguíneos ou linfáticos, conseqüentemente, os linfonodos são pontos que comumente abrigam células metastáticas por serem órgãos coletores de linfa.

A eficiência do processo metastático depende do cumprimento de algumas etapas: destacamento da célula do tumor primário e sua entrada na corrente sanguínea; sobrevivência dessas células na

circulação; aprisionamento em um novo órgão; extravasamento para os tecidos adjacentes; início e manutenção do crescimento e vascularização do tumor metastático (CHAMBERS, GROOM & MACDONALD, 2002).

## 1.2. Tratamento convencional do câncer e suas consequências

O tratamento que convencionalmente é aplicado a tumores resume-se a três modalidades principais: radioterapia, quimioterapia e cirurgia. Essas terapias apresentam, em sua maioria, efeitos colaterais debilitantes ou danosos para o paciente. Ademais, no caso da quimioterapia, há extenso número de relatos mencionando resistência às drogas utilizadas, fato que dificulta ou até mesmo inviabiliza a progressão eficaz do tratamento. Isso se dá devido à alta taxa mutacional das células tumorais gerada pela instabilidade genética discutida no item anterior.

A cirurgia permanece até hoje como a forma de tratamento mais utilizada. É um método invasivo e por vezes requer múltiplas intervenções. Além do tratamento primário, a cirurgia pode ser empregada no diagnóstico, como método profilático, paliativo e na reconstrução dos tecidos ou órgãos danificados. As cirurgias podem ser classificadas, quanto à extensão do tecido removido, como locais ou amplas. As excisões locais são escolhidas quando a massa tumoral é reduzida e envolve a retirada da massa e uma margem de tecido normal. As excisões amplas ou radicais envolvem a retirada do tumor e de estruturas circunvizinhas, incluindo linfonodos com elevada probabilidade de comprometimento. Esse procedimento é particularmente agressivo e pode resultar na alteração das funções intrínsecas do órgão ou na desfiguração (SMELTZER & BARE, 2002).

A radioterapia também é comumente utilizada no tratamento dos pacientes com câncer. Desses, mais de 50% recebem uma sessão de radioterapia em algum ponto do tratamento. Nessa modalidade, utiliza-se radiação ionizante (eletromagnética ou particular) para provocar a destruição das células tumorais. A radiação danifica a integridade do material genético levando à morte celular instantânea ou apoptótica. A radiação pode ser aplicada externamente ou internamente. Na aplicação externa a radiação é aplicada por aparelhos de forma direcionada ao tumor, enquanto na interna, implanta-se um dispositivo que emite radiação próxima ao tumor. Nessa última aplicação o paciente emite radioatividade residual e o contato com outrem deve ser controlado (SMELTZER & BARE, 2002).

A utilização de radioatividade gera efeitos colaterais que desaparecem com o fim do tratamento como: alopecia (queda de cabelos), eritema, esfoliação da pele, xerostomia (ressecamento da boca), alteração e perda do paladar, anorexia e náuseas (quando o sistema digestivo é afetado pela radiação). Além disso, se o sistema hematopoiético for acometido pelo tratamento, outros distúrbios podem

surgir: anemia, leucopenia e trombocitopenia causando imunodepressão e susceptibilidade a hemorragias. Danos irreversíveis também podem decorrer da radioterapia, envolvendo diminuição do aporte vascular e consequente lesão fibrótica (SMELTZER & BARE, 2002).

A quimioterapia, por sua vez, tem por objetivo controlar a proliferação das células tumorais e, para isso, são empregadas substâncias anti-neoplásicas como: agentes alquilantes, nitrosuréias, anti-metabólitos, antibióticos antitumorais e alcalóides, entre outras. Essa modalidade também gera efeitos colaterais, uma vez que afeta principalmente as células em proliferação, neoplásicas ou não. Os efeitos colaterais da quimioterapia são muitos, e podem incluir sintomas gastrointestinais, hematopoiéticos, cardiopulmonares, neurológicos e do sistema reprodutor (SMELTZER & BARE, 2002).

Outro aspecto importante é a múltipla resistência a drogas (MDR), um fator que, quando presente nas células-alvo de um tratamento pode agravar o quadro da doença, já que a resposta aos quimioterápicos será prejudicada. Esse fenômeno é, provavelmente, derivado do processo microevolutivo onde as células transformadas que mais habilmente reduzem a concentração plasmática dos agentes quimioterápicos predominam por possuir vantagem evolutiva (STAVROVSKAYA & STROMSKAYA, 2008).

Tendo em vista a baixa eficiência, surgimento de resistência e acentuados efeitos colaterais, outras terapias vêm sendo empregadas no tratamento do câncer. Alguns exemplos são as que empregam os modificadores da resposta biológica (MRBs; anticorpos, citocinas, interferons...), a fototerapia, a terapia genética e a terapia anti-angiogênica.

### 1.3. Anti-angiogênese

O suprimento de oxigênio e nutrientes atinge as células de um organismo através da difusão tecidual. Entretanto, esse processo só é eficiente para um pequeno número de células que distam no máximo 100µm de um capilar (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Na medida em que o número de células aumenta, o processo de difusão deixa de ser satisfatório, já que as células mais distantes da origem dos solutos sofrem déficit nesse suprimento. Dessa forma faz-se necessário o recrutamento de novos vasos sanguíneos, que compensam esse déficit e distribuem os solutos essenciais por todo o tecido.

O processo de extensão e aumento do número de capilares sanguíneos denomina-se angiogênese ou neovascularização e é regulado por fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. As células endoteliais de um indivíduo adulto mantêm uma taxa de proliferação baixa, suficiente apenas para promover a manutenção dos vasos sanguíneos. Fisiologicamente, apenas uma em cada dez mil (0,01%)

células endoteliais estão em processo de divisão celular (ENGERMAN *et al.*, 1967, HOBSON & DENEKAMP, 1984). Entretanto, em situações de injúria tecidual e na formação do endométrio uterino durante o ciclo menstrual, a atividade angiogênica é resgatada (HANAHAN & FOLKMAN, 1996).

A angiogênese é fruto de um complexo sistema regulatório que depende da coordenação precisa de diversas etapas reguladas por um balanço de variados fatores agonistas e antagonistas. A formação de novos vasos ocorre em quatro etapas principais (Figura 1.3). Na fase inicial há um aumento na vasopermeabilidade com influência do óxido nítrico (NO) e o extravasamento de proteínas plasmáticas como o fibrinogênio e o plasminogênio, que atuam como um suporte para as células endoteliais migratórias. Na segunda fase ocorre a desestabilização dos vasos e degradação da matriz extracelular (ECM) por metaloproteases de matriz (MMPs). A angiopoietina-2 e proteases ativadoras de plasminogênio também auxiliam na remodelação do estroma perivascular. A terceira etapa engloba a proliferação e migração celular induzida por agentes mitogênicos específicos (Fator de Crescimento de Células Endoteliais - VEGF, angiopoietinas) e inespecíficos (Fatores de Crescimento de Fibroblastos - FGF, angiogenina, Fator de Crescimento Epidérmico - EGF) para as células endoteliais. A quarta e última etapa consiste na estruturação do lúmen e estabilização vascular; quando as células atingem uma área com baixa densidade capilar, elas se organizam formando tubos. Por fim, a vasculatura é estabilizada através do recrutamento de células mesenquimais que se diferenciam em pericitos ou em células de musculatura vascular lisa (DISTLER *et al.*, 2003) (Figura 1.3). O recrutamento dessas células mesenquimais é realizado a partir da secreção do fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B) pelas células endoteliais (LINDAHL *et al.*, 1997).

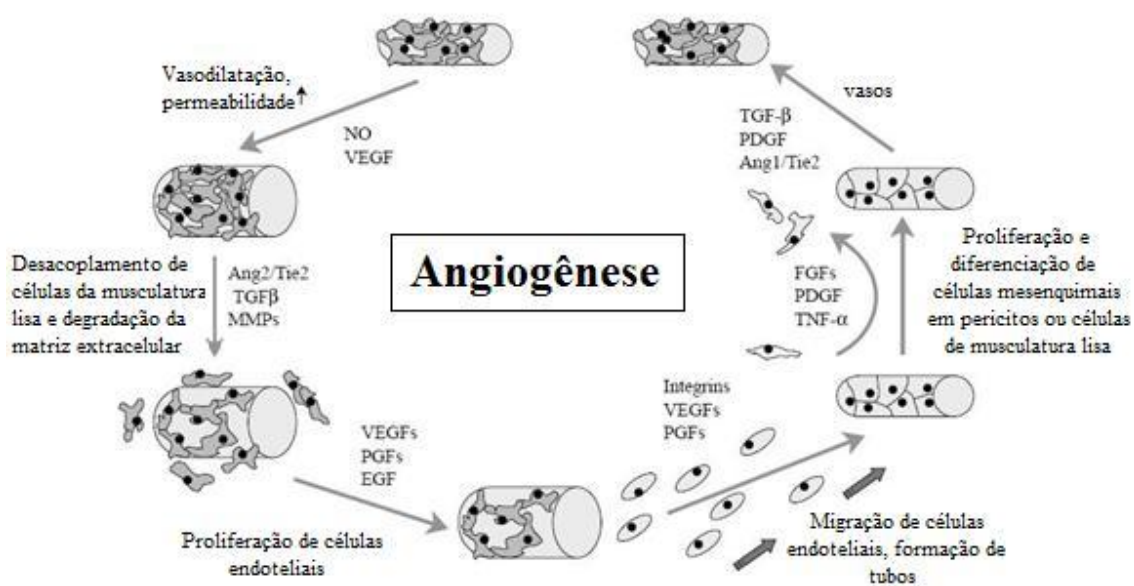


Figura 1.3 – Passos do processo de angiogênese. Adaptado de DISTLER *et al.*, 2003.

Certos processos patológicos causam um aumento anormal da atividade angiogênica. Os cânceres sólidos são um exemplo de patologia dependente de proliferação vascular exacerbada. Além do câncer, outras doenças como artrite reumatóide, psoríase e retinopatia diabética também dependem de neovascularização (FOLKMAN & SHING, 1992).

A vascularização dos tumores, além de permitir o aumento do número de células, também abre caminho para a disseminação de metástases, uma vez que os vasos sanguíneos constituem a rota mais comum de escape das células cancerosas do sítio primário do tumor. Diversos estudos postulam que a angiogênese é um fator crucial na transição de um tumor microscópico inofensivo para um tumor agressivo com potencial metastático (FOLKMAN, 1989; HANAHAN & FOLKMAN, 1996; HORI *et al.*, 1991; MILLAUER *et al.*, 1994). Além disso, há relatos de que um tumor dormente há meses ou mesmo anos, pode ativar a neovascularização e adquirir características metastáticas (FOLKMAN, 1996).

Também no processo de angiogênese tumoral, a formação dos novos vasos depende da relação entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos (RASTINEJAD *et al.*, 1989; GOOD *et al.*, 1990; O'REILLY *et al.*, 1994 (a); PARANGI *et al.*, 1996). Células tumorais são capazes de secretar diversas substâncias pró-angiogênicas como o VEGF e os FGFs ácido e básico (KANDEL *et al.*, 1991). No câncer de mama, por exemplo, além dos fatores citados, as células tumorais podem expressar também o Fator de Crescimento Tumoral  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), o Fator de Crescimento de Células Endoteliais Derivados de Plaquetas (PD-ECGF), o Fator de Crescimento Placentário (PLGF) e a Pleiotrofina (REL $\beta$ ) (REL $\beta$  *et al.*, 1997).

Além de produzir os fatores listados, as células tumorais podem, alternativamente, mobilizar fatores presentes na matriz extracelular ou ainda induzir células próximas, como macrófagos ou células do estroma tecidual, a produzi-los (FOLKMAN, 1996).

Fisiologicamente, esses agentes promotores da neovascularização têm sua atividade antagonizada por inibidores endógenos como o Fator Plaquetário 4 (PF-4) (MAIONE *et al.*, 1990; GUPTA *et al.*, 1995), a Proteína Humana Induzida por Interferon 10 (IP-10) (ANGIOLLO *et al.*, 1995; STRIETER *et al.*, 1995), a Citocina Gro- $\beta$  (CAO *et al.*, 1995), o Fragmento N-Terminal da Prolactina (CLAPP *et al.*, 1993), entre outros.

A utilização de inibidores de angiogênese é uma estratégia que vem sendo muito explorada nos últimos anos e moléculas que possuem essa característica têm sido extensamente exploradas. O tratamento realizado com esses inibidores é promissor, já que seus alvos primários não são as células tumorais, mas as células endoteliais, que são geneticamente estáveis. A protamina (FOLKMAN &



TAYLOR, 1982), a trombospondina (GOOD *et al.*, 1990), a angiostatina (O'REILLY *et al.*, 1994 - a e b) e a endostatina (O'REILLY *et al.*, 1997), são exemplos de compostos anti-angiogênicos pesquisados nas últimas décadas.

Dos compostos citados, com exceção da protamina, que é uma proteína de 4,3kDa encontrada no esperma de certas espécies de peixe, os demais são compostos endógenos, encontrados naturalmente em humanos. O potencial uso de compostos anti-angiogênicos endógenos é uma estratégia baseada nas observações de que a presença de uma massa tumoral libera na corrente sanguínea substâncias que são capazes de inibir a angiogênese de maneira endócrina (CHEN *et al.*, 1995) e que a extirpação de um tumor primário frequentemente ocasiona o surgimento de metástases (PEETERS *et al.*, 2005).

Drogas como a talidomida e o Avastin (bevacizumab) foram aprovados pelo *Food and Drugs Administration* (F.D.A.) nos Estados Unidos e em 28 outros países. A endostatina foi, em setembro de 2005, aprovada na China com o nome comercial "Endostar" para o tratamento de carcinoma pulmonar de células não-pequenas. Além disso, comprovou-se a presença de atividade anti-angiogênica em drogas como a doxiciclina, celecoxib e interferon-alfa em baixas doses. Em 2005, encontravam-se em testes clínicos ou pré-clínicos, pelo menos 30 agentes anti-angiogênicos (FOLKMAN, 2005).

#### 1.4. Endostatina

A endostatina foi descrita em 1997 por O'Reilly como uma proteína de 20kDa resultante da clivagem proteolítica do colágeno XVIII (O'REILLY *et al.*, 1997). Ela representa a porção globular da região C-terminal das fibras de colágeno. Como descrito no item 1.3, as células endoteliais e tumorais secretam metaloproteases que degradam a matriz extracelular promovendo a vascularização tumoral. Nesse processo essas enzimas mobilizam a endostatina, como consequência da degradação do colágeno XVIII, ativando sua função anti-angiogênica.

O colágeno XVIII é um proteoglicano encontrado na composição de membranas basais, principalmente na do tecido endotelial. É composto de 10 regiões colagenosas intercaladas por junções não colagenosas, um domínio de trimerização e porções globulares cujos 20kDa finais são equivalentes a moléculas de endostatina (Figura 1.4). O colágeno XVIII possui grande identidade com o colágeno XV e propôs-se um termo para classificar essas moléculas com estruturas similares: as multiplexinas (*multiple triple-helix domains and interruptions*) (REHN & PIHLAJAMIENI, 1994; OH *et al.*, 1994). As moléculas de endostatina fazem parte do primeiro domínio não colagenoso da molécula: NC1. Na matriz extracelular, o colágeno XVIII, como todos os colágenos, é organizado em tripla-hélice e, portanto, quando clivado, dá origem a três moléculas de endostatina (KUO *et al.*, 2001).

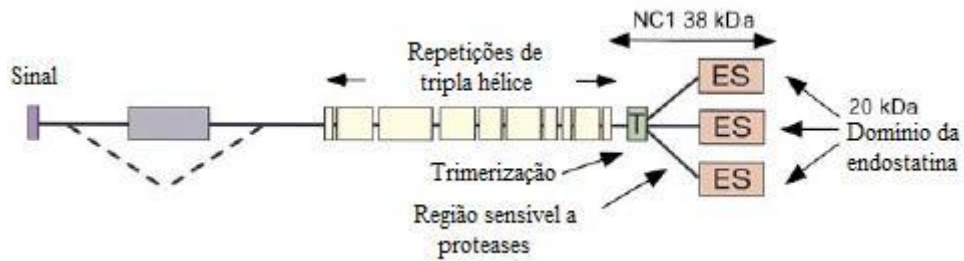


Figura 1.4 – Representação da molécula de colágeno XVIII em organizações de tripla hélice. Adaptado de KUO *et al.*, 2001.

Experimentos iniciais, que utilizaram como modelo camundongos portadores de Carcinoma Pulmonar de Lewis, culminaram em resultados que surpreenderam a comunidade científica. Nesses experimentos relatava-se que a administração subcutânea da endostatina causava a inibição de crescimento e regressão do volume tumoral (O'REILLY *et al.*, 1997) (Figura 1.5).

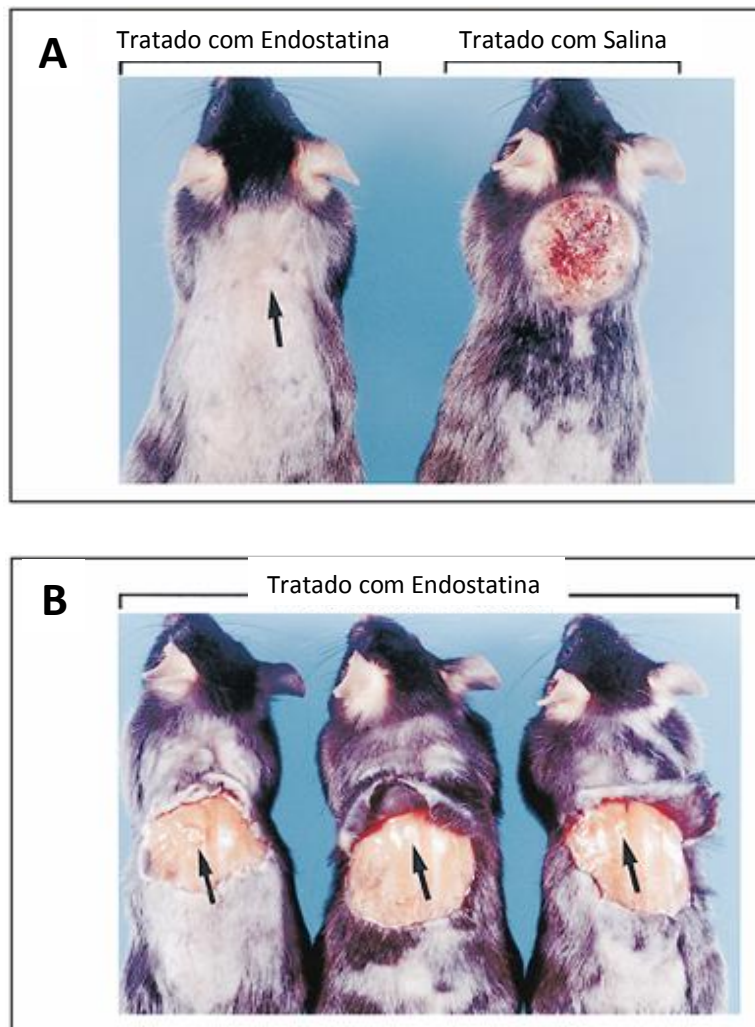


Figura 1.5 – Camundongos portadores de Carcinoma Pulmonar de Lewis submetidos à administração subcutânea da endostatina. Em A um camundongo tratado com endostatina (à esquerda) e um tratado com salina (à direita) e em B três camundongos tratados com a endostatina. Adaptado de O'REILLY *et al.*, 1997.

Além disso, um estudo posterior demonstrou que as células tumorais não adquiriram resistência, uma vez que a ação da endostatina concentra-se sobre as células endoteliais e não sobre as células transformadas, que possuem acentuada instabilidade genética. Ainda mais surpreendente foi a descoberta de que, após alguns ciclos de tratamento com endostatina, o tumor atingia um estado de dormência e não voltava a crescer quando cessado o tratamento. Esse experimento foi realizado com células de Fibrossarcoma T241, Melanoma B16F10 e Carcinoma Pulmonar de Lewis (BOEHM *et al.*, 1997) (Figura 1.6).

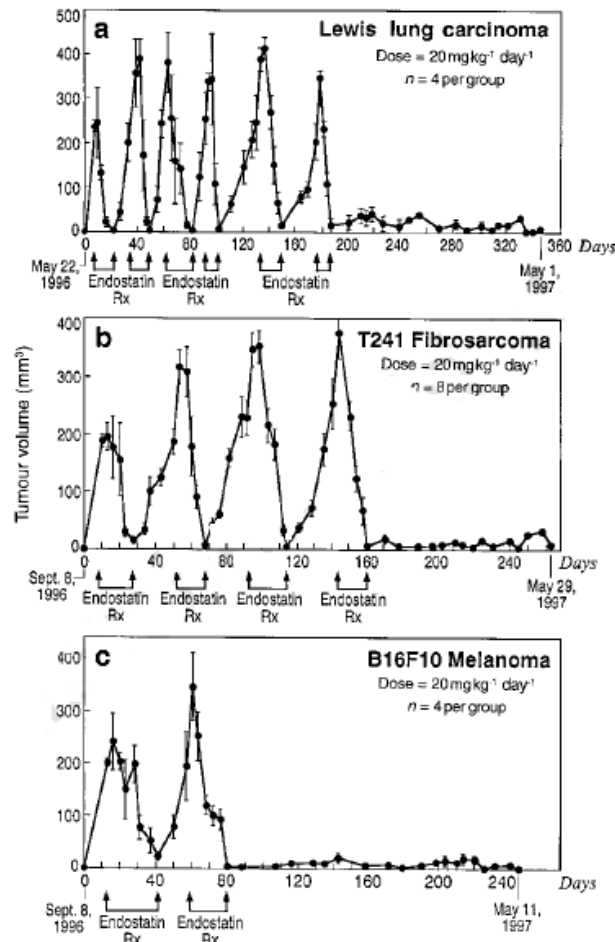


Figura 1.6 – Os gráficos representam ciclos de tratamento de diferentes tipos de tumor com endostatina. Percebe-se que além de não haver resistência do tumor, este entra em estado de dormência após alguns ciclos. Adaptado de BOEHM *et al.*, 1997.

Logo se seguiu a produção recombinante dessa proteína em *E. coli*. As técnicas de solubilização aplicadas, entretanto, não renderam grande quantidade de proteína ativa. Para resolver essa questão, os pesquisadores aplicaram o agregado insolúvel em camundongos subcutaneamente. Os animais apresentaram edemas esbranquiçados com cerca de 3 mm que desapareceram dentro de um período de 2 ou 3 dias. Utilizando esta metodologia as taxas de regressão tumoral e inibição do aumento do volume tumoral foram animadoras (O'REILLY *et al.* 1997, BOEHM *et al.*, 1997).

Apesar dos resultados iniciais apresentarem tamanho êxito, estudos subsequentes não foram tão bem sucedidos e houve dificuldades na reprodução desses resultados em outros laboratórios mesmo quando a endostatina era cedida pelo laboratório Folkman (MARSHALL, 2002, FOLKMAN, 2006). Os testes clínicos, por sua vez, também não foram animadores e apenas um indício de eficiência terapêutica foi detectado (EDER *et al.*, 2002; HERBST *et al.*, 2002). Outros laboratórios, no entanto, utilizaram outros métodos de purificação da endostatina e foram bem sucedidos em reproduzir a atividade dos primeiros experimentos (HUANG *et al.*, 2001). Foi também proposto o implante de uma bomba micro-osmótica intraperitoneal que, em contraste com a administração descontínua, efetivamente promovia a regressão tumoral (KISKER *et al.*, 2001).

A endostatina humana possui 183 aminoácidos e a murina 184. As proteínas dessas duas espécies apresentam 87% de identidade (OH *et al.*, 1994). Estudos que empregavam a endostatina humana em ratos foram realizados com êxito, ou seja, foi observada regressão tumoral. Este fato sugere uma conservação estrutural interespecífica com manutenção de função (LIU *et al.*, 2001; XIA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002) (Figura 1.7).

<b>Endostatina</b>							
<b>Humana</b>	HSHRDFQPVL	HLVALN <b>A</b> PLS	GGMRGIRGAD	FQCFQQARAV	GL <b>A</b> GTFFRAFL	SSRLQDLYSI	60
<b>Murina</b>	HTH <b>Q</b> DFQPVL	HLVALN <b>T</b> PLS	GGMRGIRGAD	FQCFQQARAV	GL <b>S</b> GTFFRAFL	SSRLQDLYSI	60
<b>Humana</b>	VRRADRA <b>A</b> VP	IVNLKDE <b>L</b> LF	PSWE <b>A</b> LFSGS	EG <b>P</b> LKPGARI	FSFDG <b>K</b> DVLR	HPTWPQKSVW	120
<b>Murina</b>	VRRADR <b>G</b> SVP	IVNLKDE <b>V</b> LS	PSW <b>D</b> S <b>L</b> FSGS	Q <b>Q</b> Q <b>L</b> QPGARI	FSFDG <b>R</b> DVLR	HP <b>A</b> WPQKSVW	120
<b>Humana</b>	HGSDP <b>N</b> GRRRL	TESYCETWRT	E <b>A</b> PSATGQAS	SLLG <b>G</b> RLL <b>G</b> Q	SAASCH <b>H</b> AYI	VLCIENSFMT	180
<b>Murina</b>	HGSDP <b>S</b> GRRRL	MESYCETWRT	E <b>T</b> TGATGQAS	SLL <b>S</b> GRLLE <b>Q</b>	KAASCH <b>N</b> SYI	VLCIENSFMT	180
<b>Humana</b>	ASK-						183
<b>Murina</b>	SFSK						184

Figura 1.7 – Sequência de aminoácidos da endostatina humana e murina. Os aminoácidos díspares estão destacados em vermelho.

LIMAVERDE, *et al.*, 2005

Tanto a estrutura da endostatina humana quanto da murina foram resolvidas em 1998 por Ding e Hohenester, respectivamente. Encontrou-se, no entanto, dificuldades para resolver as porções terminais, dotadas de grande flexibilidade. No caso da endostatina murina, tanto o N-terminal quanto o C-terminal não puderam ser resolvidos (HTHQDF e MTSFSK respectivamente), já no caso da endostatina humana, apenas o C-terminal (MTASK) não foi resolvido (HOHENESTER *et al.*, 2000, DING *et al.*, 1998).

A proteína possui uma estrutura que apresenta 16 folhas beta e 2 alfa-hélices conectadas por loops e é organizada em um único domínio globular (Figura 1.8). Além disso estão presentes duas

pontes dissulfeto conectando os pares de cisteínas Cys33/Cys173 e Cys135/Cys165 (HOHENESTER *et al.*, 1998) que são essenciais para a estabilidade da proteína (ZHOU, WANG & LUO, 2005).

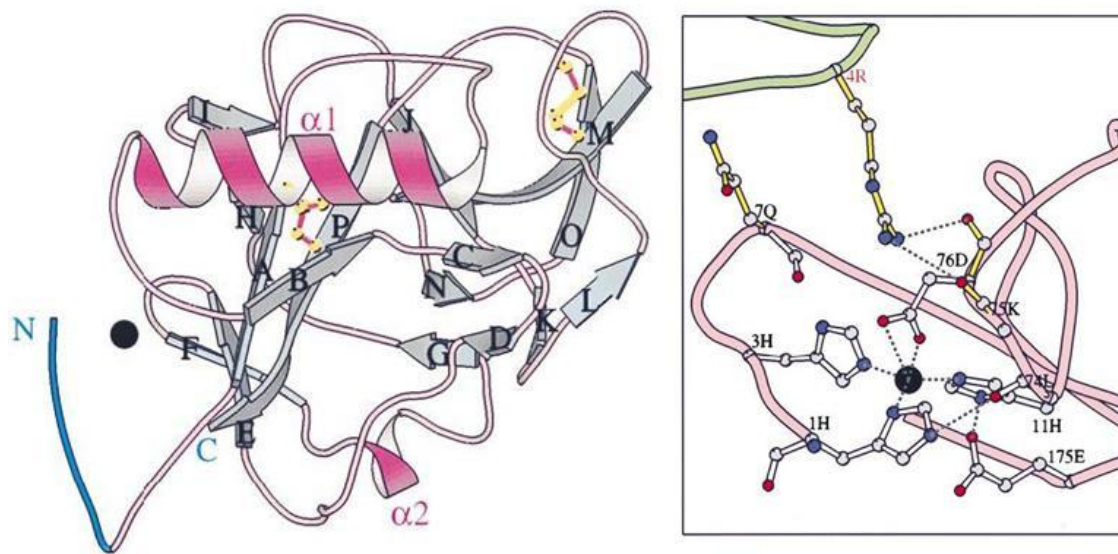


Figura 1.8 – Estrutura terciária da endostatina (à esquerda) e ampliação do sítio de ligação do íon zinco, detalhe para a coordenação realizada pelas histidinas 1, 3 e 11 e pelo ácido aspártico 76 (à direita). Adaptado de DING, *et al.*, 1998.

Outra característica da endostatina é a coordenação de um íon  $Zn^{+2}$  na porção N-terminal em pH neutro ou básico. Participam dessa coordenação 3 histidinas (resíduos 1, 3 e 11) e um ácido aspártico (resíduo 76), há relatos de que essa coordenação pode ocorrer também de formas distintas (HOHENESTER *et al.*, 2000). Foi determinado que, em pH 7.4, a constante de dissociação desse complexo (endostatina- $Zn^{+2}$ ) é de 6,7 nM (HAN *et al.*, 2007). A importância desse íon, no entanto, é motivo de controvérsia no meio científico, em diferentes artigos os pesquisadores propõem diferentes papéis para o íon  $Zn^{+2}$ . Segundo Boehm, a ligação do íon zinco é essencial para a atividade antiangiogênica da endostatina (BOEHM *et al.*, 1998); outra publicação mostra que a endostatina é capaz de promover inibição tumoral desprovida das histidinas 1 e 3 (SIM *et al.*, 1999, YAMAGUCHI *et al.*, 1999).

Estudos recentes sugerem que o íon  $Zn^{+2}$  tenha importância apenas na estabilização da proteína frente a agentes desnaturantes e aumento de temperatura (HAN *et al.*, 2007). É também improvável que esse íon possua papel catalítico, uma vez que a sua coordenação com 4 resíduos da proteína exclui a possibilidade de coordenação de uma molécula de água, comumente observada nos sítios catalíticos de metaloproteases (HOHENESTER *et al.*, 2000). Há também estudos que sugerem que a endostatina pode formar dímeros de maneira zinco-dependente (DING *et al.*, 1998, LIMAVERDE *et al.*, 2005)

Diversos mecanismos de ação foram propostos para a endostatina, além da atividade anti-proliferativa inicial (O'REILLY *et al.*, 1997), outras características que influenciam na migração

(YAMAGUCHI *et al.*, 1999) e sobrevivência celular (DIXELIUS *et al.*, 2000), atividade de proteases (KIM, *et al.*, 2000) e estabilização de vasos sanguíneos (DIXELIUS *et al.*, 2000; ERGUN *et al.*, 2001) já foram descritas. Análises empregando a metodologia de micro-arranjos de DNA detectaram uma alteração de 12% na expressão do genoma das células endoteliais tratadas com endostatina, aumentando a expressão de genes relacionados à anti-angiogênese e inibindo cascatas de sinalização pró-angiogênicas (ABDOLLAHI *et al.*, 2004).

#### 1.5. Fragmentos da endostatina apresentam atividade biológica

Baseando-se no fato de que, inicialmente, a regressão de tumores *in vivo* foi observada com administração de um agregado de endostatina recombinante expressa em *E. coli*, foi sugerido que não haveria necessidade de um enovelamento protéico específico para o desencadeamento da atividade biológica da endostatina, mas que a atividade seria carregada por pequenos peptídeos gradativamente liberados do agregado (SJIN *et al.*, 2005). Dessa forma, diversos grupos optaram por investigar a atividade antiangiogênica de peptídeos derivados da endostatina.

Assim, muitas publicações tratam de fragmentos da endostatina e suas atividades biológicas (CATTANEO *et al.*, 2003; FRANCESCATO *et al.*, 2003; MORBIDELLI *et al.*, 2003; WICKSTRÖM, ALITALO & KESKI-OJA, 2004) e sabe-se que algumas proteinases endógenas possuem a capacidade de degradar a endostatina (FERRERAS *et al.*, 2000). Essa abordagem para elucidação da atividade da endostatina mostrou-se válida, uma vez que diversos peptídeos sintetizados exibiram atividade antiangiogênica. Foram sintetizados fragmentos distintos e que apresentaram diferentes atividades antitumorigênicas e até mesmo pró-angiogênicas (MORBIDELLI *et al.*, 2003). Alguns estudos encontraram atividade antiangiogênica na porção C-terminal da proteína (MORBIDELLI *et al.*, 2003).

Outros peptídeos endógenos também exercem funções fisiológicas. Exemplo disso são as anafilotoxinas resultantes da degradação dos componentes do sistema complemento, responsáveis por promover estímulos à inflamação. É possível que a endostatina exerça diferentes papéis em sua conformação íntegra e na forma de peptídeos derivados da estrutura completa. É importante lembrar que essas atividades não são mutuamente exclusivas e que essas configurações podem agir de maneira sinérgica.

#### 1.6. Peptídeo N-terminal da endostatina e a motivação do estudo

Em 2005, Sjin e colaboradores realizaram um estudo em que foram sintetizados 8 peptídeos derivados da endostatina humana e 8 peptídeos derivados da sua homóloga murina e suas atividades antitumoral, antimigratória e antipermeabilizante foram testadas. Nesse estudo verificou-se que os

peptídeos correspondentes ao N-terminal de ambas as proteínas, contendo 25 (humana) e 27 (murina) aminoácidos, apresentavam atividades biológicas equivalentes as da proteína íntegra (SJIN *et al.*, 2005).

Neste estudo foram utilizados dois modelos. O primeiro consistiu no implante de células BxPC-3 de adenocarcinoma pancreático humano em camundongos SCID, utilizado para testar os peptídeos humanos. O segundo modelo consistiu no implante de células murinas de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) em camundongos C57BI/6J, utilizado para testar a atividade dos peptídeos murinos (SJIN *et al.*, 2005).

Os gráficos abaixo apresentam a atividade antitumoral dos peptídeos comparada a da endostatina íntegra. É importante ressaltar que esses resultados foram todos obtidos na presença de zinco. Ao serem removidos os resíduos de histidina 1, 3 e 11, responsáveis pela coordenação do íon, a atividade dos peptídeos era abolida. A escolha de diferentes números de resíduos (25 aminoácidos para o peptídeo humano e 27 para o murino) não foi explicada nesse estudo.

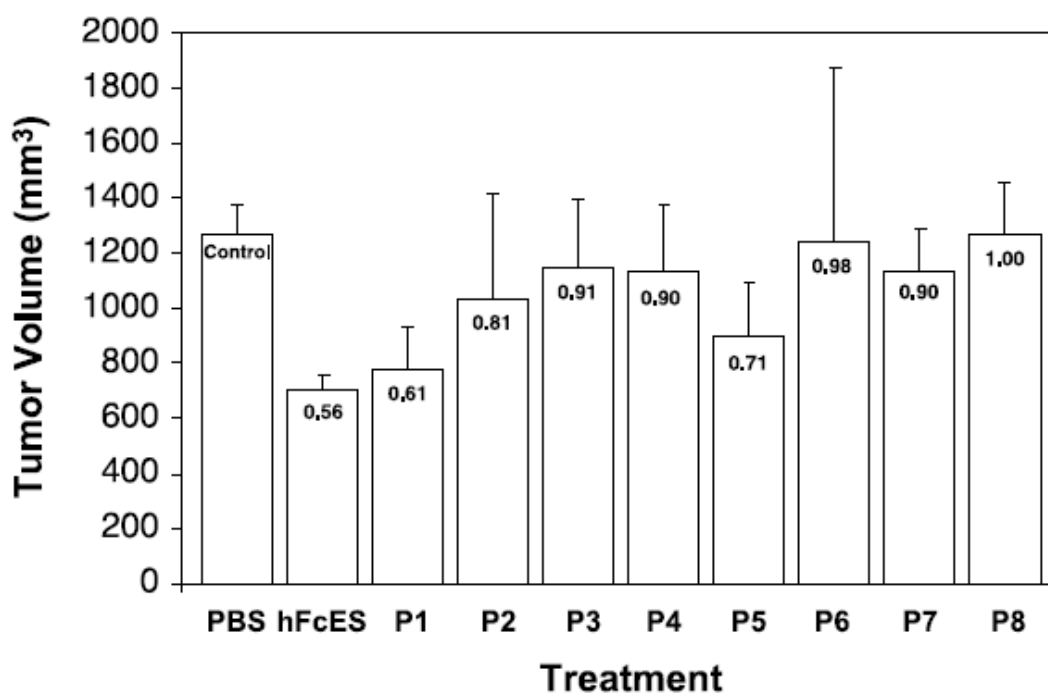


Figura 1.9 – Células BxPC-3 de adenocarcinoma pancreático humano implantadas em camundongos SCID foram tratadas com peptídeos derivados da endostatina humana. Gráfico representando a razão T/C, ou seja a razão entre o volume dos tumores nos animais tratados em relação ao volume dos tumores nos animais controle. Note que a razão T/C do peptídeo P1 é similar a da proteína íntegra (hFcES).

(Adaptado de SJIN *et al.*, 2005).

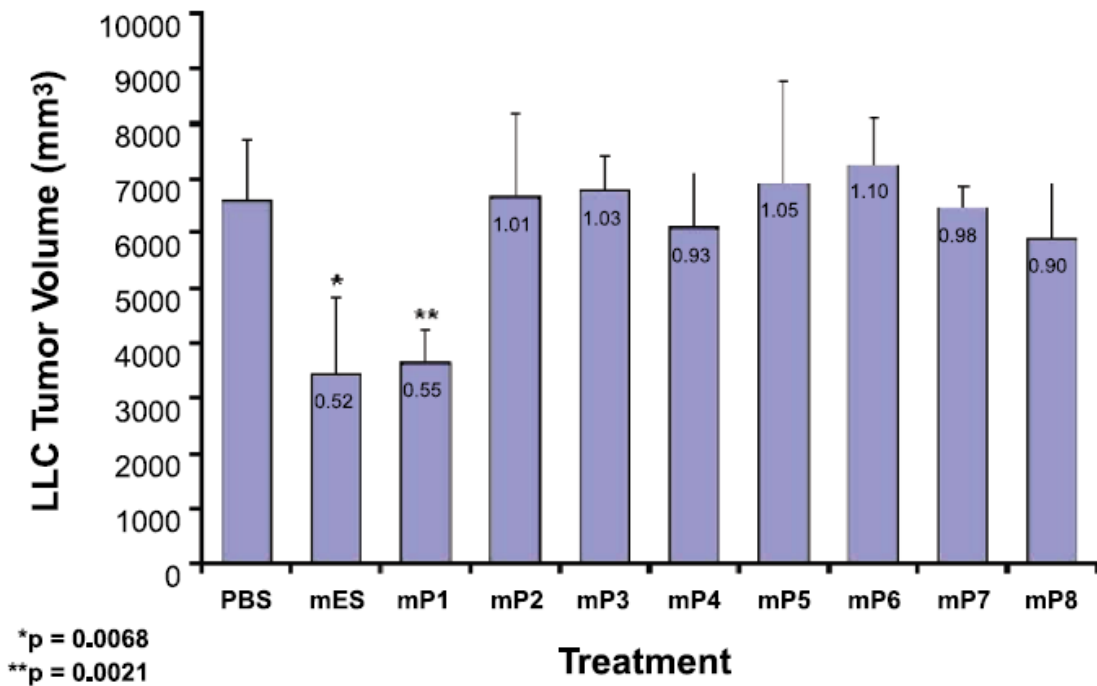


Figura 1.10 – Células de carcinoma pulmonar de Lewis implantadas em camundongos C57BI/6J foram tratadas com peptídeos derivados da endostatina murina. Gráfico representando a razão T/C, ou seja a razão entre o volume dos tumores nos animais tratados em relação ao volume dos tumores nos animais controle em. Note que a razão T/C do peptídeo mP1 é similar a da proteína íntegra (mES). Adaptado de SJIN *et al.*, 2005.

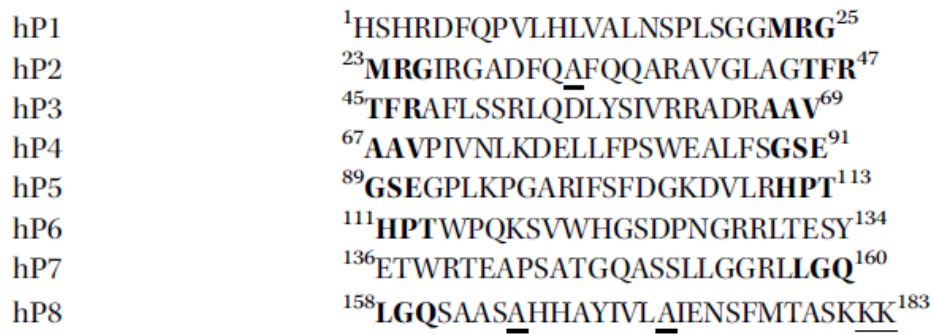


Figura 1.11 – Sequência primária dos peptídeos baseados na endostatina humana. Os caracteres em negrito representam resíduos sintetizados com sobreposição na sequência. Os caracteres com sublinhado simples representam resíduos de cisteína que foram alterados para resíduos de alanina. Os caracteres com sublinhado duplo representam resíduos de lisina adicionados ao hP8 com o propósito de aumentar sua solubilidade. Adaptado de SJIN *et al.*, 2005.

A motivação do presente estudo está na busca por motivos moleculares que apresentem atividade antiangiogênica, explorando especificamente peptídeos da região N-terminal da endostatina, com o intuito de lançar luz sobre o seu mecanismo de ação, utilizando técnicas de modelagem e dinâmica molecular. Os resultados podem, futuramente, auxiliar no planejamento de compostos antiangiogênicos mais eficazes.



## 2. Objetivos

Esse estudo teve como objetivo estudar a estrutura do fragmento N-terminal das endostatinas humana e murina e verificar a estabilidade desses peptídeos em meio aquoso. Pretende-se identificar elementos importantes para a manutenção da estrutura e, conseqüentemente, da função biológica.

Para tal, visamos realizar os seguintes ensaios *in silico*:

- ◆ Modelagem das estruturas obtidas dos bancos de dados para obtenção de peptídeos derivados da endostatina humana e da endostatina murina.
- ◆ Dinâmica Molecular dos peptídeos correspondentes à porção N-terminal da endostatina na presença e na ausência do íon zinco, a fim de determinar a influência deste íon no comportamento do peptídeo.
- ◆ Simulação de Dinâmica Molecular de fragmentos com diferentes números de argininas para determinar a contribuição desses resíduos na estabilidade dos peptídeos.
- ◆ Comparação dos peptídeos simulados com outras proteínas antiangiogênicas disponíveis em bancos de dados com relação às estruturas primária, secundária e terciária, visando detectar motivos semelhantes possivelmente relacionados com suas funções
- ◆ Análise estrutural dos peptídeos segundo a estrutura secundária, RMSD, RMSF, distribuição de *clusters* de estruturas e distribuição radial de moléculas de água a fim de gerar um perfil de comportamento para cada estrutura.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Introdução

A utilização de modelos computacionais para representação de situações reais é uma prática que vem sendo progressivamente utilizada; tanto no campo das interações moleculares quanto em outros campos, como o da aviação, engenharia civil e meteorologia. Essa metodologia ganha cada vez mais credibilidade conforme são desenvolvidos novos softwares e os antigos sofrem atualizações. A praticidade das técnicas computacionais também aumenta graças ao ganho na capacidade de processamento decorrente de novas tecnologias (PASCUTTI, 2002).

A representação mais fiel de um sistema molecular é aquela que o descreve quanticamente. Essa é também, no entanto, aquela que possui maior custo computacional, ou seja, é uma representação pouco factível para sistemas moleculares compostos por muitos átomos. Tendo o exposto em vista, desenvolveu-se um extenso conjunto de parâmetros baseados na mecânica clássica para simular as interações inter-atômicas de modo a conjugar representação e custo computacional satisfatórios.

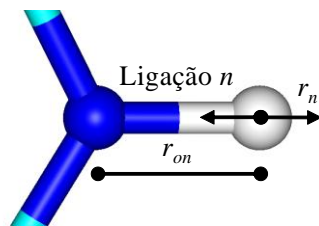
Os parâmetros utilizados para caracterizar as ligações moleculares e interações intermoleculares são calibrados por dados experimentais e cada conjunto de parâmetros desse tipo é denominado Campo de Forças.

A representação clássica das ligações químicas baseia-se na aplicação de algoritmos matemáticos simples que as tomam por partículas unidas por uma mola e que, portanto, obedecem a um potencial harmônico. Nesses modelos há então o emprego da lei de Hooke, que define um potencial harmônico para essas ligações sujeito a variações quando elas são submetidas a perturbações que as removem do estado de equilíbrio.

Os Campos de Forças definem, portanto, características das ligações entre 2, 3 e 4 átomos conectados, representando dessa forma, o comprimento da ligação entre 2 átomos, o ângulo formado por 3 átomos, o ângulo formado pelos planos que contém os átomos de um tetraedro (diedro impróprio) e a torção de um par de átomos em relação a outro par de átomos ligados entre si (diedro próprio).

É também função dos campos de força descrever as interações entre átomos não ligados quimicamente através de potenciais que simulam as forças de van der Waals (Potencial de Lennard-Jones) e interações eletrostáticas (Potencial de Coulomb).

Dessa forma, para um par de átomos ligados covalentemente, o comprimento dessa ligação varia conforme a equação apresentada na figura 3.1, que consiste basicamente em uma função potencial aproximada a de Hooke.

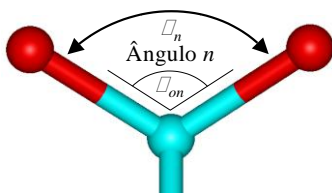


$$\vec{V}_r = \frac{1}{2} K_r (r - r_0)^2$$

Figura 3.1 – Deslocamento em uma ligação química entre um par de átomos. O comprimento da ligação oscila com o tempo segundo um potencial harmônico em torno de uma posição de equilíbrio. Adaptado de SILVA, 2003.

Onde  $\vec{V}_r$  é o potencial gerado pela perturbação da posição de equilíbrio,  $K_r$  é a constante de Hooke associada à ligação química específica,  $r$  é o comprimento da ligação em um instante qualquer e  $r_0$  o parâmetro que define o comprimento de equilíbrio da ligação.

De maneira similar, outro potencial harmônico derivado dessa mesma função é utilizado para descrever a oscilação da angulação entre dois átomos unidos por um terceiro (figura 3.2).

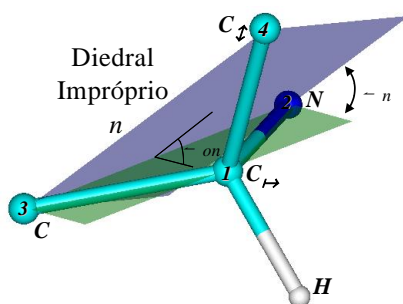


$$\vec{V}_\theta = \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

Figura 3.2 –Deslocamento angular para um par de átomos ligados. O ângulo entre eles varia harmonicamente em torno do ângulo de equilíbrio. Adaptado de SILVA, 2003.

Analogamente,  $\vec{V}_\theta$  é o potencial adquirido quando o ângulo  $\theta_0$  é perturbado,  $K_\theta$  é a constante de Hooke para a restituição do ângulo  $\theta_0$  de equilíbrio, e  $\theta$  é o ângulo da ligação em um dado instante qualquer.

A determinação do potencial harmônico de um diedro segue uma lógica similar (figura 3.3).

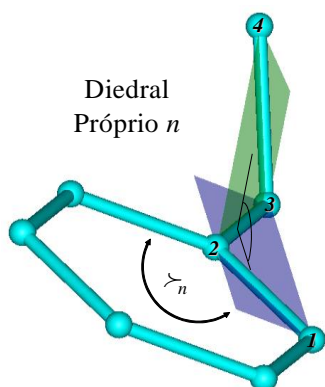


$$\vec{V}_\omega = \frac{1}{2} K_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

Figura 3.3 – Diedro impróprio. Um carbono “ $\alpha$ ” quiral está representado aqui. Como na maioria dos campos de força (tais como o GROMOS96) o átomo de hidrogênio (representado para efeitos didáticos) fica integrado no  $C_\alpha$ , um potencial harmônico trata de manter a estabilidade tetraédrica deste grupo de átomos. Adaptado de SILVA, 2003.

Onde  $\vec{V}_\omega$  é o potencial formado pela perturbação do ângulo  $\omega_0$  de equilíbrio entre os planos apresentados na figura,  $K_\omega$  a constante de Hooke para a restituição desse ângulo e  $\omega$  o ângulo entre esses planos em um dado instante qualquer.

O Potencial Diedral Próprio é um termo torcional cujo potencial obedece à seguinte equação (figura 3.4).

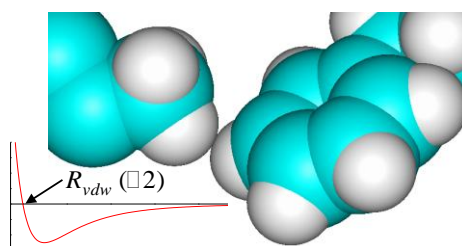


$$\vec{V}_\varphi = K_{\varphi n} [1 + \cos(n_n\varphi_n - \delta_n)]$$

Figura 3.4 – Diedro Torcional Próprio. Nesta representação, o anel benzênico (no plano 1\_2\_3 do diedro) pode assumir seis ângulos de torção (mínimos) em relação ao plano 2\_3\_4 do diedro.

Onde  $K_\varphi$  é uma constante que define a barreira de rotação,  $n$  é o número de conformações em que ocorrem os mínimos de energia para a torção da ligação química estudada,  $\varphi$  é o ângulo diedral para a ligação central em uma sequência de quatro átomos e  $\delta$  é o valor angular que tornaria  $\varphi$  um ângulo diedral de potencial mínimo.

As interações de van der Waals obedecem ao potencial de Lennard-Jones, que conjuga as dispersões de London e a repulsão devido à interferência das nuvens eletrônicas. Essas interações são descritas pela fórmula a seguir e o gráfico da figura mostra o formato dessa função no plano cartesiano (figura 3.5).

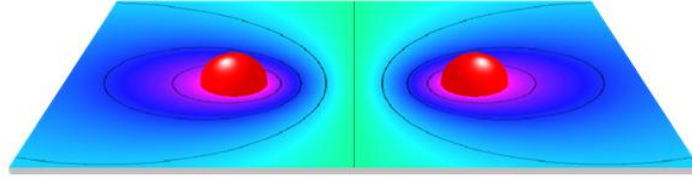


$$\vec{V}_{II} = 4\epsilon [(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6]$$

Figura 3.5 – Representação atômica usando-se os raios de van der Waals ( $R_{vdw}$ ), os quais são definidos para cada átomo pela metade da distância em que seu potencial de Lennard-Jones vale zero (o gráfico não está na mesma escala que o desenho). Adaptado de SILVA, 2003.

Onde  $\epsilon$  é a profundidade do poço entre a barreira atrativa e a repulsiva e  $\sigma$  é o diâmetro de Lenard-Jones. Esses parâmetros foram ajustados por cálculos teóricos e dados experimentais.

Por fim, outro termo levado em conta no cálculo da energia potencial total é o potencial eletrostático. Nesse potencial, são computadas as diferenças de eletronegatividade entre dois átomos unidos covalentemente e a interferência dessa polarização em outros elementos também polarizados. Esse potencial também é utilizado para descrever elementos ionizáveis (figura 3.6).



$$\vec{V}_{\text{Col.}} = q_i q_j / 4\pi\epsilon_0\epsilon r$$

Figura 3.6 – Plano transversal seccionado ilustrando a energia potencial de Coulomb entre dois átomos de cargas unitárias e opostas, em que estão enfatizadas as linhas equipotenciais, sendo o tom de cor o indicador da intensidade do potencial, com o vermelho indicando valores positivos (átomos azul) e violeta para valores negativos (átomo vermelho). Adaptado de SILVA, 2003.

Onde  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas residuais sobre os átomos  $i$  e  $j$  respectivamente.  $\epsilon_0$  é a constante de permissividade do espaço livre e  $\epsilon$  representa a constante dielétrica que considera a polarizabilidade do meio. Meios polarizáveis reduzem o campo gerado por uma carga  $q$  de maneira inversamente proporcional à constante dielétrica, devido à gênese de um campo que se opõe ao gerado pela carga  $q$  (REITZ, MILFORD & CHRISTY, 1982; JACKSON, 1983).

A partir da união dos termos descritos acima, calcula-se a energia potencial para cada átomo do sistema, a cada unidade de tempo determinada nos parâmetros da Dinâmica Molecular, para gerar um valor de potencial que será aplicado nas equações newtonianas clássicas, determinando dessa forma o comportamento do sistema ao longo do tempo de simulação. A equação que define o potencial total num dado instante é, portanto, o somatório desses potenciais para cada átomo nesse mesmo instante e está representada abaixo (figura 3.7)

$$\begin{aligned} \vec{V}(\{r_i\}) = & \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{2} K b_n (b_n - b_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} K \theta_n (\theta - \theta_{0n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\omega} \frac{1}{2} K \omega_n (\omega - \omega_{0n})^2 \\ & + \sum_{n=1}^{N_\phi} K \phi_n [1 + \cos(n_n \phi_n - \delta_n)] + \sum_{i < j}^{N_{at}} [C_{12}(i, j) / r_{ij}^{12} - C_6(i, j) / r_{ij}^6 + q_i q_j / 4\pi\epsilon_0\epsilon r_{ij}] \end{aligned}$$

Figura 3.7 – Equação de potencial total.

### 3.2. Modelagem do fragmento N-terminal

Para obter o fragmento equivalente à porção N-terminal da endostatina, foi acessado o banco de dados *on-line* de estrutura de proteínas *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB).

Desse banco de dados foram retiradas as estruturas 1DY1 (HOHENESTER *et al.*, 2000) e 1BNL (DING *et al.*, 1998), equivalentes à estrutura da endostatina murina monomérica e à estrutura da endostatina humana tetramérica, respectivamente. A partir dessas estruturas foram gerados os peptídeos utilizados na Dinâmica Molecular (Tabela 3.1).

A clivagem *in silico* da estrutura em formato “.pdb” (arquivo com as coordenadas atômicas de uma estrutura) foi realizada com o auxílio do programa PyMol (DELANO, 2002), que auxilia o processo devido à representação tridimensional dos resíduos e às diversas ferramentas de visualização que este *software* disponibiliza.

### 3.3. Dinâmicas Moleculares

As Dinâmicas Moleculares realizadas nesse estudo possuem como objetivo final uma ampla coleta de dados físico-químicos sobre a estrutura assumida pelo fragmento N-terminal da endostatina. Para tal, foram realizadas diversas simulações com parâmetros distintos que foram enfim submetidas à uma série de análises *in silico*, descritas posteriormente. O planejamento das dinâmicas é representado pelo esquema a seguir (Figura 3.8) e os peptídeos analisados estão descritos na tabela 3.1.

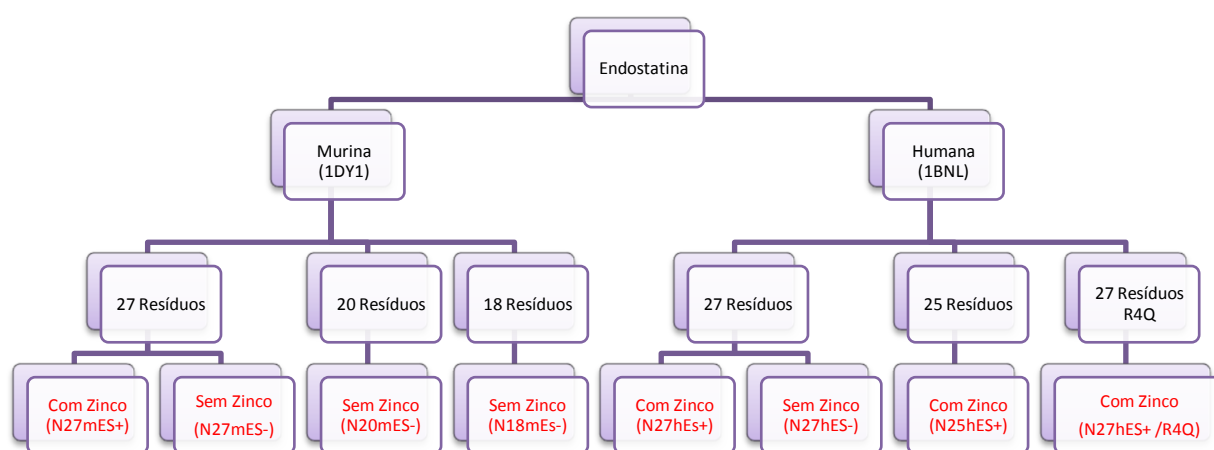


Figura 3.8 – Esquema representativo das simulações de Dinâmica Molecular que foram realizadas. Os termos destacados em vermelho representam uma dinâmica cada. A descrição dos peptídeos encontra-se na Tabela 3.1.

Foram, ao todo, realizadas 8 simulações de Dinâmica Molecular (em vermelho), com as características demonstradas no esquema acima. As dinâmicas de 120 ns para coleta de dados foram precedidas de dinâmicas de ajuste das camadas de solvatação de 0,5 ns, nas quais os átomos do peptídeo tinham suas posições fixas, e uma dinâmica de termalização de 5 ns.

Após a obtenção dos peptídeos a partir das estruturas cristalográficas, eles foram inseridos em uma caixa dodecaédrica contendo água SPC explícita. Em seguida, os sistemas foram submetidos à minimização de energia com a aplicação de 10000 passos do algoritmo de máximo declive com restrição de posições, seguido de outros 10000 passos do mesmo algoritmo na ausência de restrições e, finalmente, 5000 passos do algoritmo de gradientes conjugados. Os sistemas foram simulados sob um *ensemble* NPT, utilizando o campo de forças GROMOS96 43a1 e um passo de tempo de 2 fs. O algoritmo *berendsen* foi empregado para manter a temperatura e a pressão dos sistemas em 310 K (37 °C) e 1 bar, respectivamente. O tratamento das interações eletrostáticas de longa distância foi realizado pelo algoritmo PME e os *cut-offs* das interações de Coulomb e de Van der Waals foram ajustados em 1 nm.

	Peptídeo	
N27hES+	HSHRDFQPVLHLVALNAPLSGGMRGIR	ZN
N27hES-	HSHRDFQPVLHLVALNAPLSGGMRGIR	
N27mES+	HTHQDFQPVLHLVALNTPLSGGMRGIR	ZN
N27mES-	HTHQDFQPVLHLVALNTPLSGGMRGIR	
N25hES+	HSHRDFQPVLHLVALNAPLSGGMRG	ZN
N27hES+/R4Q	HSHQDFQPVLHLVALNAPLSGGMRGIR	ZN
N20mES-	QPVLHLVALNTPLSGGMRGI	
N18mES-	PVLHLVALNTPLSGGMRG	

Tabela 3.1 – Nomenclatura utilizada para cada peptídeo, suas respectivas sequências e presença ou ausência de íon.

A realização das Dinâmicas Moleculares se deu com o auxílio do pacote de programas *Groningen Machine for Chemical Simulations* (GROMACS) (VAN GUNSTEREN & BERENDSEN, 1987; VAN DER SPOEL *et al.*, 2001; VAN DER SPOEL *et al.*, 2004, VAN DER SPOEL *et al.*, 2005) em sua versão 4.0.3.

Para desenvolver as simulações de Dinâmica Molecular, primeiramente seguiu-se uma sequência de etapas de gênese e otimização do sistema.

### 3.3.1. pdb2gmx

Esse programa transforma a representação das coordenadas dos átomos de um sistema para o formato “.gro” que é utilizado pelo GROMACS durante as simulações. Nesse passo foram determinados o padrão de protonação das histidinas, a inserção dos átomos de hidrogênio e o campo de forças utilizado (GROMOS96).

### 3.3.2. editconf

Este passo é responsável pela criação do poliedro representativo da caixa em que o sistema será simulado. As simulações são realizadas sob condições periódicas de contorno, ou seja, cada face do poliedro que limita o sistema é uma cópia deste. Desse modo, o sistema torna-se virtualmente infinito e minimizam-se os efeitos de borda. O tipo de caixa é selecionado nesta etapa. Neste estudo, as caixas são representadas por um dodecaedro rômboico cujo volume é aproximadamente 30% menor que o de um cubo de mesma distância de imagem, fato que economiza em média 29% do tempo computacional necessário à simulação do sistema, quando comparado a uma simulação realizada em uma caixa cúbica, devido à exclusão de moléculas de solvente.

### 3.3.3. genbox

Este programa gera o solvente selecionado pelo operador para preencher a caixa criada no passo anterior. O solvente utilizado nesse estudo é água *Simple Point Charge* (SPC).

### 3.3.4. genion

Nas simulações de Dinâmica Molecular é importante que o sistema esteja livre de cargas eletrônicas líquidas. Para isso é necessário neutralizar eventuais cargas presentes no objeto de estudo. Foram, dessa forma, adicionados íons cloro (Cl<sup>-</sup>) de modo a equivaler o total de cargas positivas ao de cargas negativas. Os sistemas dotados de zinco recebem dois íons cloro a mais do que os sistemas depletados de zinco, uma vez que esse cátion possui carga líquida de +2.

### 3.3.5. Otimização da Geometria Molecular

As técnicas de otimização da geometria molecular são imprescindíveis às Dinâmicas Moleculares uma vez que evitam a existência de incoerências estruturais que prejudicariam o desenvolvimento da dinâmica. Essas técnicas aliviam as tensões preexistentes nas moléculas decorrentes, por exemplo, da compactação gerada pela cristalografia. Existem diversos algoritmos responsáveis pelo mapeamento dos níveis energéticos. Nesse estudo foram utilizados três algoritmos distintos: Máximo Declive (*Steepest Descent*, SD), Gradientes Conjugados (*Conjugate Gradients*, CG) e Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno de Baixa Memória (*Low Memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*, L-BFGS). Cada um desses algoritmos tem uma contribuição para a otimização dos mínimos de energia.

O algoritmo do Máximo Declive possui maior eficácia em determinar os primeiros passos da otimização de energia, mas não é tão eficaz na determinação das configurações ideais próximo ao



mínimo de energia. Nesse caso utiliza-se o algoritmo de Gradientes Conjugados (figura 3.10) em sequência ao Máximo Declive (figura 3.9), aumentando a otimização da geometria molecular. A utilização do L-BFGS é dada para aumentar ainda mais a qualidade da conformação final.

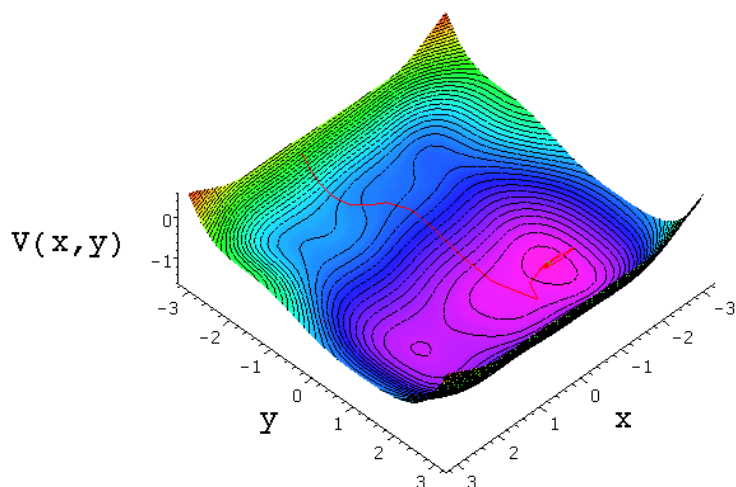


Figura 3.9 – Ilustração do método de máximo declive para um dado campo de forças, cuja função (de duas variáveis apenas, para efeito didático) descreve a superfície, que convergiu após 35 iterações. O caminho percorrido é uma geodésica, curva que cruza as linhas equipotenciais perpendicularmente ao longo dos gradientes máximos (SILVA, 2003).

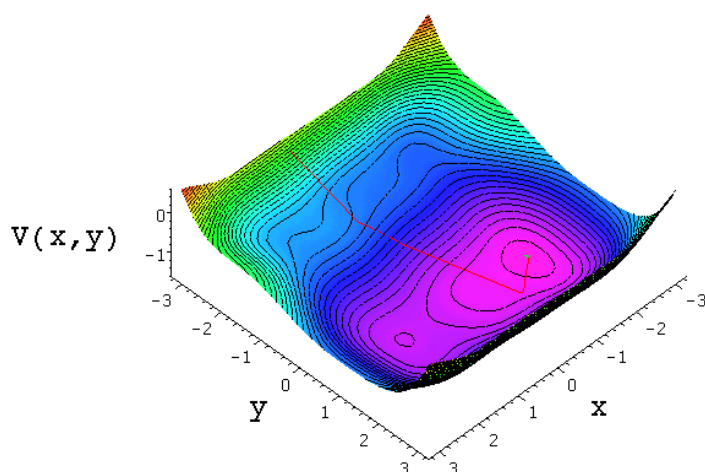


Figura 3.10 – Ilustração do método de gradientes conjugados para um campo de forças igual ao do exemplo para o método de máximo declive, cuja função descreve a mesma superfície, que convergiu após 15 iterações. As condições iniciais para ambas simulações são exatamente iguais e o erro relativo para o ponto de convergência é inferior a  $10^{-6}$  u.a. (unidades arbitrárias) (SILVA, 2003).

### 3.3.6. Aquisição das Trajetórias

Na dinâmica molecular calcula-se a força  $\vec{F}_i$  exercida sobre cada partícula existente no sistema dividindo a taxa de variação da energia potencial total de cada átomo do sistema pela taxa de variação de sua posição no espaço.

$$\vec{F}_i = -\partial\vec{V}\{\mathbf{r}_i\}/\partial\mathbf{r}_i$$

Onde  $\vec{F}_i$  é a força exercida sobre uma partícula  $i$  pertencente ao sistema,  $\partial\vec{V}(\{r_i\})$  é a derivada da energia potencial total dessa partícula e  $\partial r_i$  é a derivada da sua posição no espaço.

Aplica-se a segunda lei de Newton para determinar a aceleração  $a_i$  sobre essa partícula dividindo-se a força  $\vec{F}_i$  à qual essa partícula está submetida por sua massa  $m_i$ .

$$\vec{a}_i = \vec{F}_i/m_i$$

A aceleração é utilizada no algoritmo de Verlet (VERLET, 1967) para determinar a trajetória das partículas determinando a propagação das posições em incrementos de tempo. A fórmula é representada a seguir.

$$r_i(t + \delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \delta t) + \vec{a}_i(t) \delta t^2$$

As velocidades das partículas não desempenham papel algum na determinação das trajetórias, uma vez que não são explicitadas na fórmula acima. As velocidades são, no entanto, componentes da energia cinética que, somada à energia potencial, representa a energia total do sistema, além de traduzir ainda a temperatura do sistema, que é definida em termos de energia cinética média. Elas podem ser calculadas utilizando-se o algoritmo de Verlet para propagação das velocidades.

$$\vec{v}_i = [r_i(t + \delta t) - r_i(t - \delta t)]/2\delta t$$

O algoritmo *Summed Verlet* ou *Leapfrog* é também utilizado nas dinâmicas a fim de minimizar as imprecisões numéricas decorrentes da disparidade entre os valores pequenos das variações das posições e os valores grandes representados pelas posições em si. Esse algoritmo é derivado de uma modificação do algoritmo de Verlet (BERENDSEN *et al.*, 1984; ALLEN & TILDESLEY, 1987; VAN GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990) em que são levadas em conta as velocidades nos meios-passos  $t + \delta t/2$  e  $t - \delta t/2$ . A propagação das posições é então determinada pela equação a seguir.

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \vec{v}_i(t + \delta t/2) \delta t$$

Onde  $r_i(t + \delta t)$  é a posição no instante seguinte,  $r_i(t)$  é a posição no instante atual,  $\delta t$  é a variação de tempo (tamanho do passo) e  $\vec{v}_i(t + \delta t/2)$  é a velocidade da partícula, que pode ser calculada segundo a equação abaixo.

$$\vec{v}_i(t + \delta t/2) = \vec{v}_i(t - \delta t/2) + \vec{a}_i(t)\delta t$$

Para cada simulação de Dinâmica Molecular de coleta de dados foram realizadas outras duas simulações preliminares. A primeira é uma simulação de 0,5 ns de ajuste das camadas de solvatação na

qual as partículas do peptídeo são fixadas e somente o solvente possui liberdade de movimento para ajustar-se à superfície molecular. A segunda consiste numa dinâmica de termalização de 5 ns, na qual ocorre um ajuste da energia térmica do sistema à temperatura estipulada nos parâmetros. Seguiu-se então a simulação para coleta de dados, que foi de 115 ns.

Diversos tratamentos eletrostáticos podem ser aplicados na Dinâmica Molecular como, por exemplo, o raio de corte simples (*Cut-off*), o raio de corte com campo de reação (*Reaction Field, RF*) e o *Particle-Mesh Ewald* (PME). Como mencionado no item 3.3, este último tratamento foi escolhido para representar as interações eletrostáticas dos sistemas estudados. O método PME é otimizado para simulações de estruturas retiradas de cristais e muitas publicações apontam para uma melhor representação dos sistemas quando esse tratamento é utilizado. Esse método é, por outro lado, computacionalmente mais custoso.

### 3.4. Análise de Estruturas Secundárias

A análise de estruturas secundárias foi realizada pelo programa do\_dssp cujo algoritmo interpreta as coordenadas ao decorrer de uma simulação de Dinâmica Molecular e, a partir da análise conformacional dos frames da simulação é capaz de discriminar sete diferentes padrões de estrutura secundária: 3-hélice,  $\alpha$ -hélice, 5-hélice, ponte beta, folha beta, dobras (*bends*) e voltas (*turns*). Ao analisar as estruturas secundárias procura-se verificar a estabilidade do peptídeo e sua viabilidade ou inviabilidade como molécula efetora. A seguir apresenta-se um gráfico recuperado de uma dinâmica preliminar para representar o modo com que o programa indica as estruturas secundárias (figura 3.11).

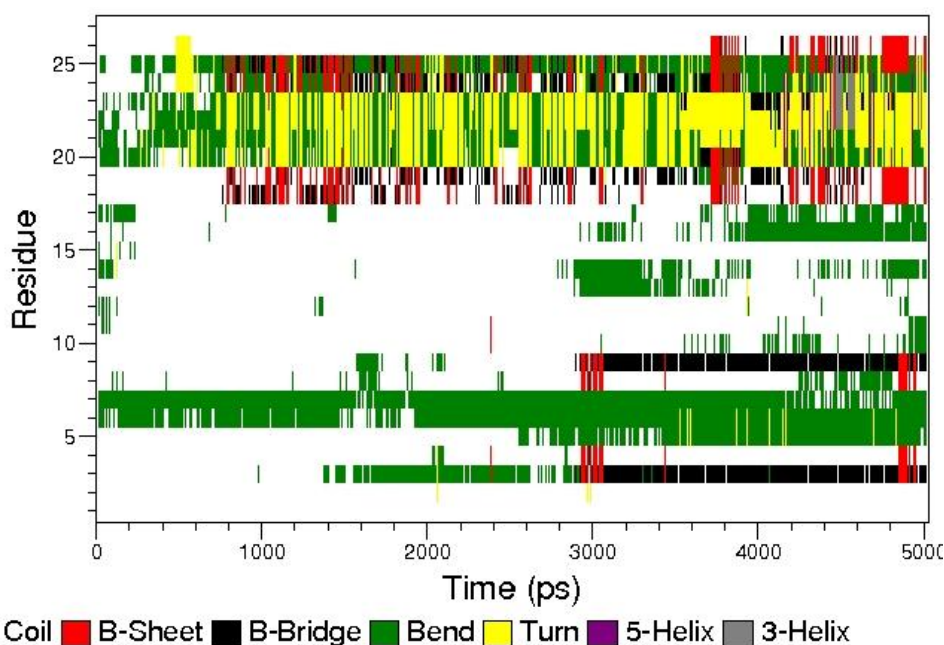


Figura 3.11 – Gráfico referente à uma simulação preliminar, representando as 6 das 7 estruturas secundárias detectadas pelo programa do\_dssp. A única estrutura não representada é a  $\alpha$ -hélice. Quando o programa não detecta nenhuma estrutura secundária padrão, refere-se a estes aminoácidos em arranjo *coil* (quadrado em branco).

### 3.5. Distribuição Radial de Moléculas de Água ao Redor do Íon Zinco - $g(R)$ e cálculo da distância do íon às histidinas.

A análise da distribuição radial de moléculas de água (figura 3.12) com o programa `g_rdf` nos permitiu analisar a interação do íon com o solvente, a fim de melhor caracterizar a disposição das moléculas de água em relação ao íon zinco.

O cálculo da distribuição radial é realizado conforme a equação a seguir.

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2}$$

Onde  $[\rho_B(r)]$  é a densidade de partículas do tipo B em uma distância  $r$  ao redor de partículas A e  $[\rho_B]_{local}$  é a densidade média de partículas B em uma distância  $r_{max}$ , que geralmente vale metade do comprimento da caixa. O cálculo é realizado ao longo do tempo de simulação e, dessa forma, permite avaliar a distribuição radial global da dinâmica.

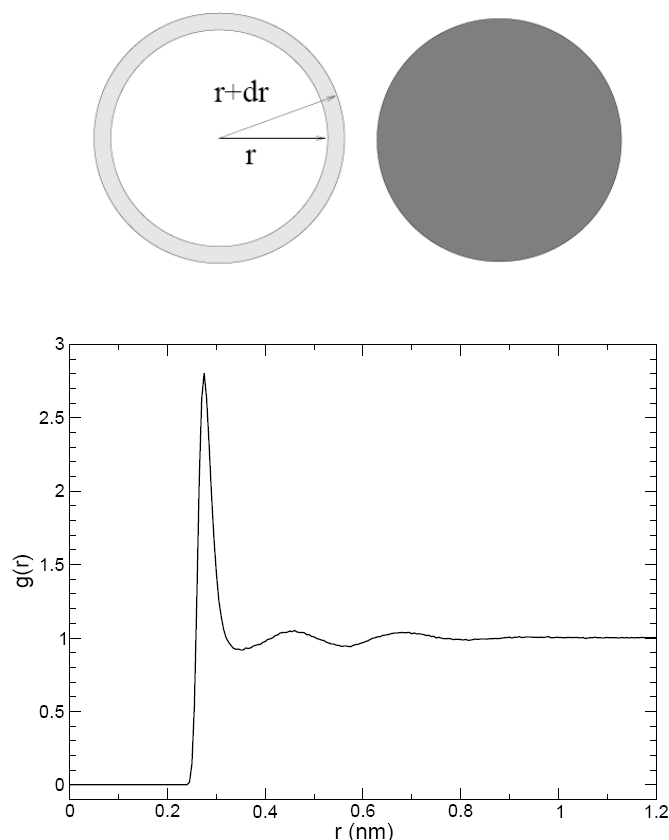


Figura 3.12 – Gráficos retirados do manual do programa GROMACS representando a distribuição radial de átomos a uma distância  $r$  do centro de um átomo (em cinza, topo, à esquerda), a média da distribuição de átomos relativos à distância  $r_{max}$  (em cinza, topo, à direita), e função representando a equação apresentada anteriormente para átomos de oxigênio da água SPC (abaixo). No gráfico da função percebe-se um pico que representa a primeira camada de solvatação e dois menores representando outras camadas. Conforme a distância aumenta, a densidade tende a normalizar.

A distância do íon zinco às histidinas que participam de sua coordenação também foi calculada. Esse cálculo foi realizado medindo-se a distância do centro da esfera que representa o íon zinco ao centro da esfera que representa o átomo de nitrogênio participante da coordenação. A coordenação do íon pelas histidinas poderia ser realizada pelo nitrogênio delta ou pelo nitrogênio épsilon desses aminoácidos. Escolhemos utilizar a coordenação exatamente como estavam dispostas no cristal.

### 3.6. Análise de Raiz Quadrada do Desvio Médio (RMSD)

O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) calcula o desvio médio das partículas em relação a uma estrutura de referência. Essa análise é um bom padrão para verificar a estabilidade de uma estrutura, uma vez que calcula a variação de conformações assumidas pelo peptídeo. A fórmula para o cálculo do RMSD está representada a seguir.

$$RMSD(t_1, t_2) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (r_1 - r_2)^2}$$

Onde  $RMSD(t_1, t_2)$  é o desvio padrão das conformações estruturais no tempo  $t_1$  em relação às conformações em um tempo  $t_2$ ,  $n$  é o total de quadros,  $r_1$  representa as posições das partículas no tempo  $t_1$  e  $r_2$  representa as posições das partículas em um tempo  $t_2$ . As coordenadas representadas por  $r_2$  são as coordenadas de referência, e podem ser fixas (por exemplo, considerando-se apenas a posição inicial) ou variáveis (considerando  $t_2 = t_1 + \delta t$ ).

### 3.7. Análise da Raiz Quadrada da Flutuação Média (RMSF)

O RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) calcula a flutuação das coordenadas em relação a uma coordenada média. Assim como o RMSD, é um algoritmo também utilizado para medir a estabilidade de estruturas.

### 3.8. Análise da distribuição das conformações em grupos estruturais (*clusters*)

A partir dos dados do RMSD e com a utilização do programa *g\_cluster* foi possível dividir as conformações assumidas pelo peptídeo ao longo da simulação em grupos de estruturas semelhantes caracterizadas por um raio de corte (0,3 nm).

Essa classificação foi realizada pelo algoritmo *gromos*, integrado no pacote GROMACS. Esse algoritmo classifica os grupos conformacionais da seguinte forma: primeiramente calcula-se o número de estruturas que apresentam valores de RMSD entre si menores que o raio de corte, ou seja, os *vizinhos*. Em seguida, a estrutura com maior número de vizinhos é removida juntamente com estes do

montante de estruturas, formando assim um *cluster*. O processo é repetido até que todas as estruturas estejam classificadas em um grupo.

## 4. Resultados

4.1. Os peptídeos derivados da porção N-terminal da endostatina humana e murina possuem comportamentos distintos ao longo da dinâmica.

Ao comparar os peptídeos N-terminais de endostatina humana (N27hES) e murina (N27mES), de 27 aminoácidos, na presença de  $Zn^{++}$ , segundo os gráficos de RMSD (Figura 4.1), de análise de clusters (Figuras 4.2 e 4.3) e de estrutura secundária (Figuras 4.4 e 4.5) pode-se concluir que eles apresentam comportamento distinto. A diferença mais notável é a elevada tendência do peptídeo murino (N27mES) de formar folhas-beta, ao contrário do peptídeo humano (N27hES) (Figuras 4.4 e 4.5).

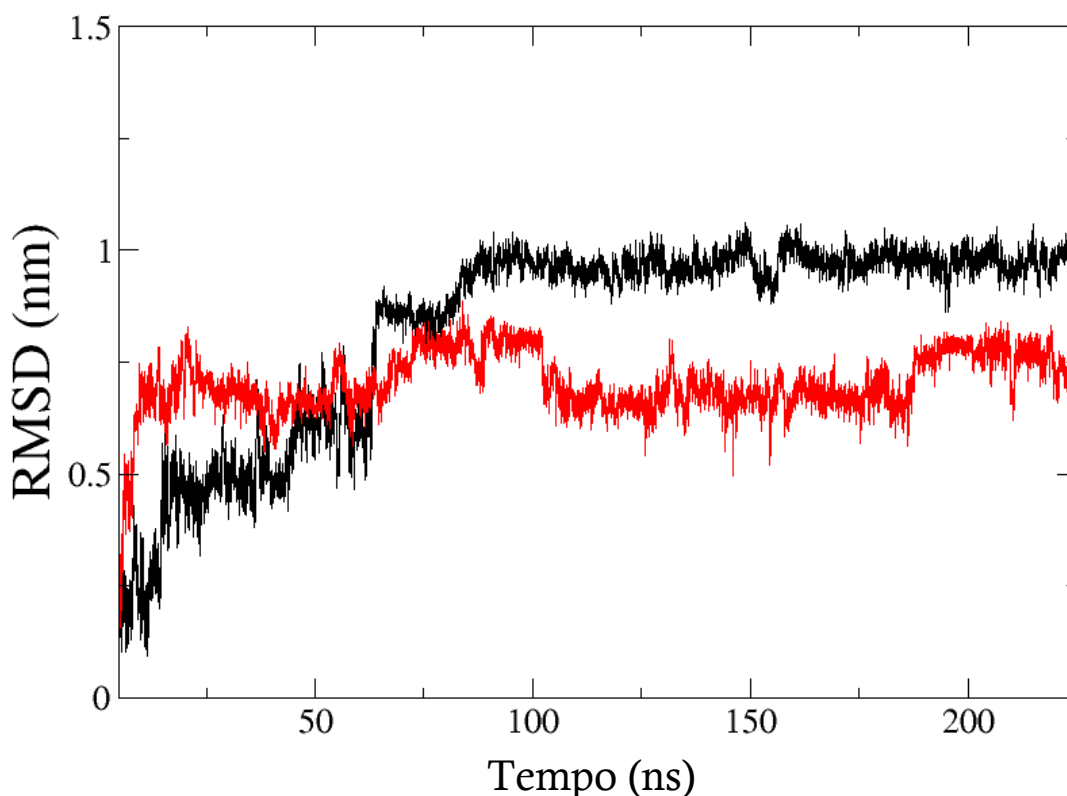


Figura 4.1 – Gráficos de RMSD apresentando o desvio médio da estruturas do peptídeo murino (N27mES) (linha preta) e humano (N27hES) (linha vermelha) em relação às estruturas iniciais ao longo de simulações de dinâmica molecular de 225 ns.

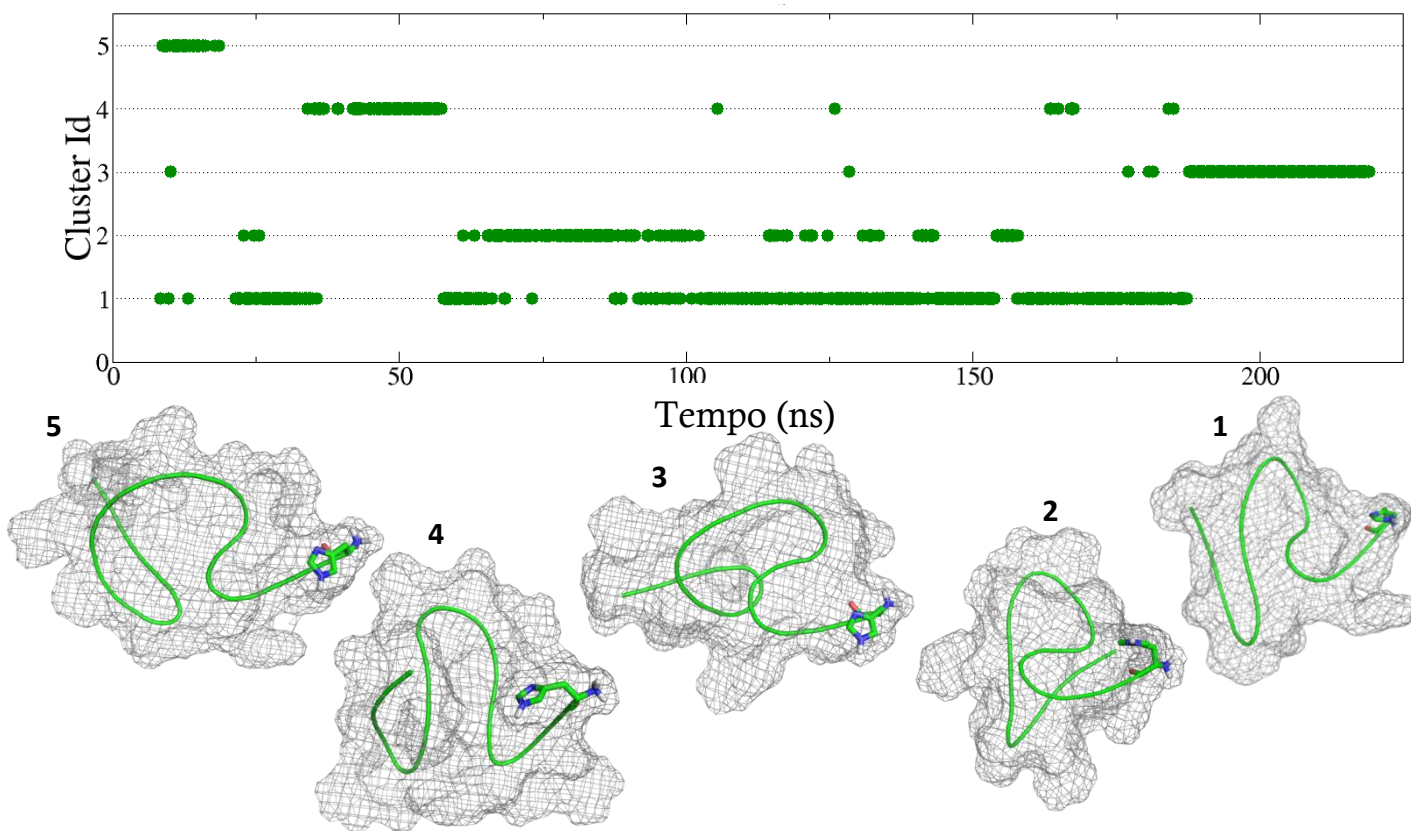


Figura 4.2 – Representação dos 5 maiores clusters de um total de 29 clusters encontrados na simulação do peptídeo humano na presença de  $Zn^{++}$  (N27hES+) e suas respectivas estruturas médias em ordem crescente de prevalência.

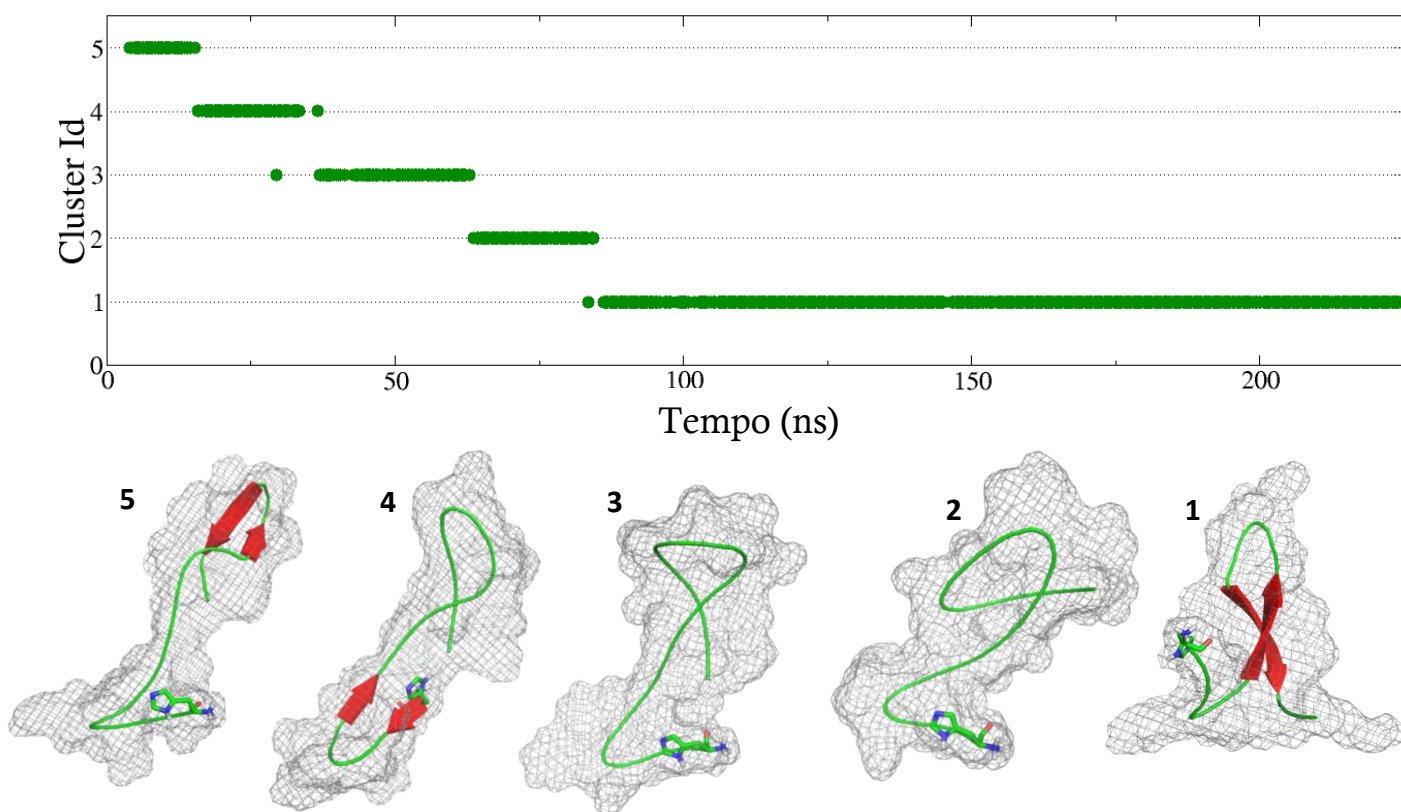


Figura 4.3 – Representação dos 5 maiores clusters de um total de 33 clusters encontrados na simulação do peptídeo murino na presença de  $Zn^{++}$  (N27mES+) e suas respectivas estruturas médias em ordem crescente de prevalência.



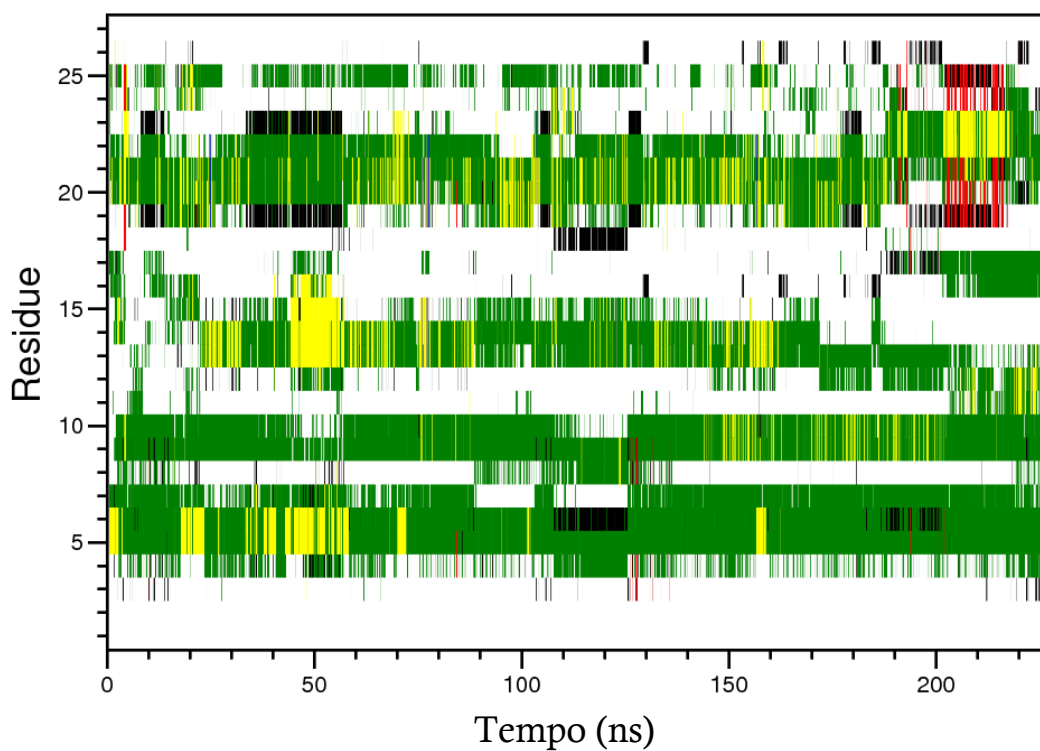
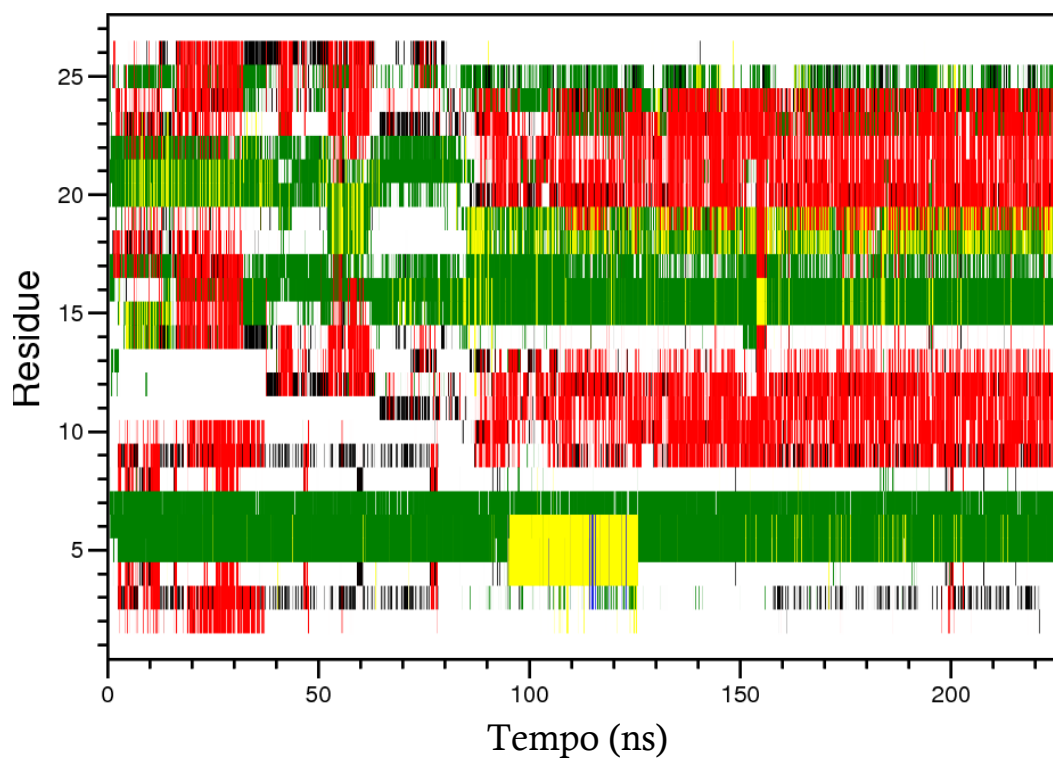


Figura 4.4 – Gráfico de estruturas secundárias do peptídeo humano na presença de Zn<sup>++</sup> (N27hES<sup>+</sup>) ao longo de uma simulação de 225 ns.



Coil
  B-Sheet
  B-Bridge
  Bend
  Turn
  A-Helix
  5-Helix
  3-Helix

Figura 4.5 – Gráfico de estruturas secundárias do peptídeo murino na presença de Zn<sup>++</sup> (N27mES+) ao longo de uma simulação de 225 ns.

4.2. As argininas das posições 4 e 27 exercem repulsão eletrostática no peptídeo humano (N27hES).

Foi formulada a hipótese de que a ausência de estruturas em folha-beta no peptídeo humano devia-se à repulsão entre cargas positivas presentes em ambos os terminais, em decorrência da presença de argininas nas extremidades. Dessa forma, o efeito repulsivo das argininas nas posições 4 e 27 foi testado através da construção de dois peptídeos. O peptídeo N27hES+/R4Q mantém 27 aminoácidos, mas a arginina da posição 4 foi substituída por um resíduo de glutamina. O peptídeo N25hES+ possui 25 aminoácidos, portanto elimina a arginina da posição 27, porém mantém ainda dois resíduos de arginina: um na posição 4 e outro na posição 24 (Tabela 3.1).

A análise das estruturas secundárias mostra que em ambos os sistemas a tendência de formar folhas-beta é restaurada (Figuras 4.6, 4.7 e 4.8). No sistema N25hES+ (Figura 4.7) a formação da folha beta ocorre em aproximadamente 30 ns de simulação, e no sistema N25hES/R4Q em aproximadamente 70 ns.

As análises de RMSF mostram os diferentes graus de estabilidade dos peptídeos testados. Estes resultados sugerem que no peptídeo humano original (N27hES) a repulsão eletrostática ocorre devido a interação da arginina 4 com as argininas 24 e 27, gerando altos níveis de flutuação (média de 0,38 nm, Figura 4.9). Como o peptídeo humano de 25 aminoácidos possui uma arginina em cada terminal, este ainda exibe certo grau de instabilidade nos terminais, mas a média da flutuação é reduzida para 0,25 nm (Figura 4.10). O peptídeo N27hES+/R4Q, assim como o peptídeo murino, não possui arginina no N-terminal, portanto, esse sistema possui os menores valores de RMSF dos três (Figura 4.11).

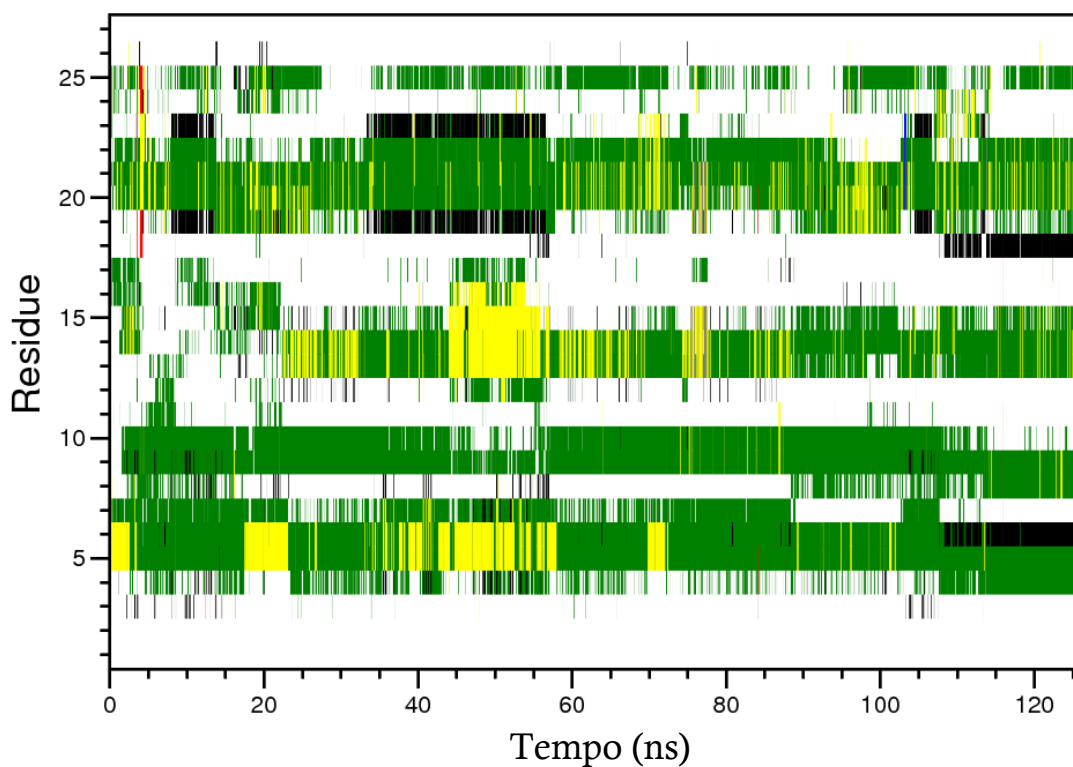


Figura 4.6 – Gráfico de análise de estruturas secundárias do peptídeo humano de 27 aminoácidos na presença de zinco (N27hES+) ao longo de uma simulação de 125 ns.

Coil
  B-Sheet
  B-Bridge
  Bend
  Turn
  A-Helix
  5-Helix
  3-Helix

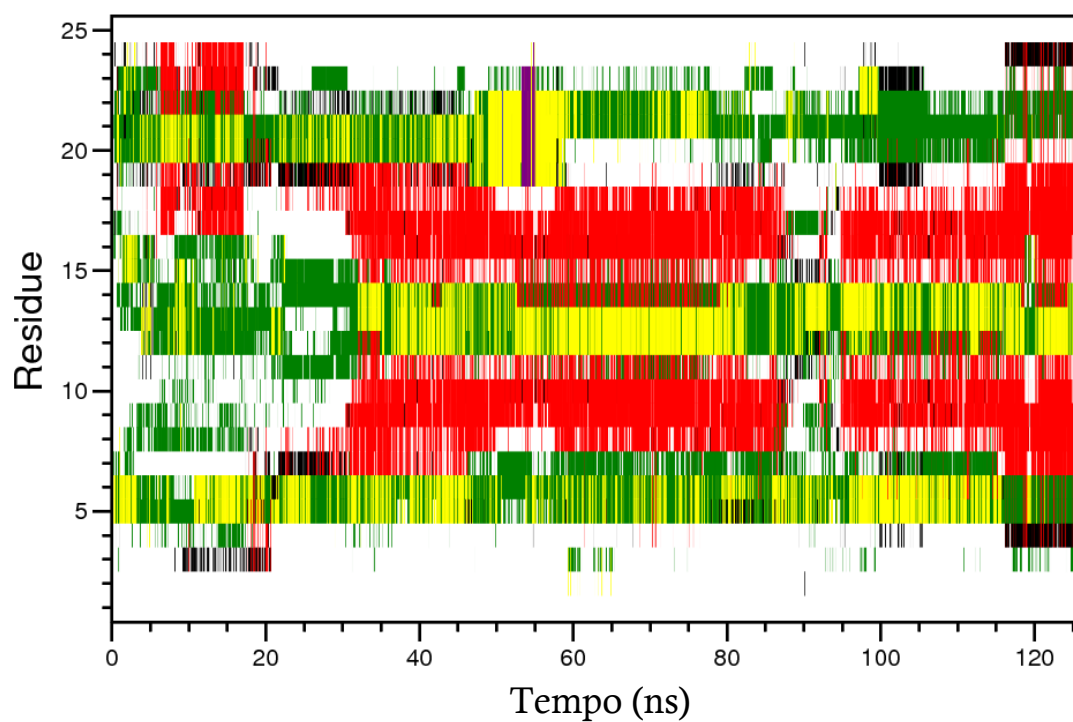


Figura 4.7 – Gráfico de análise de estruturas secundárias do peptídeo de 25 aminoácidos, na presença de zinco (N25hES+) ao longo de uma simulação de 125 ns.

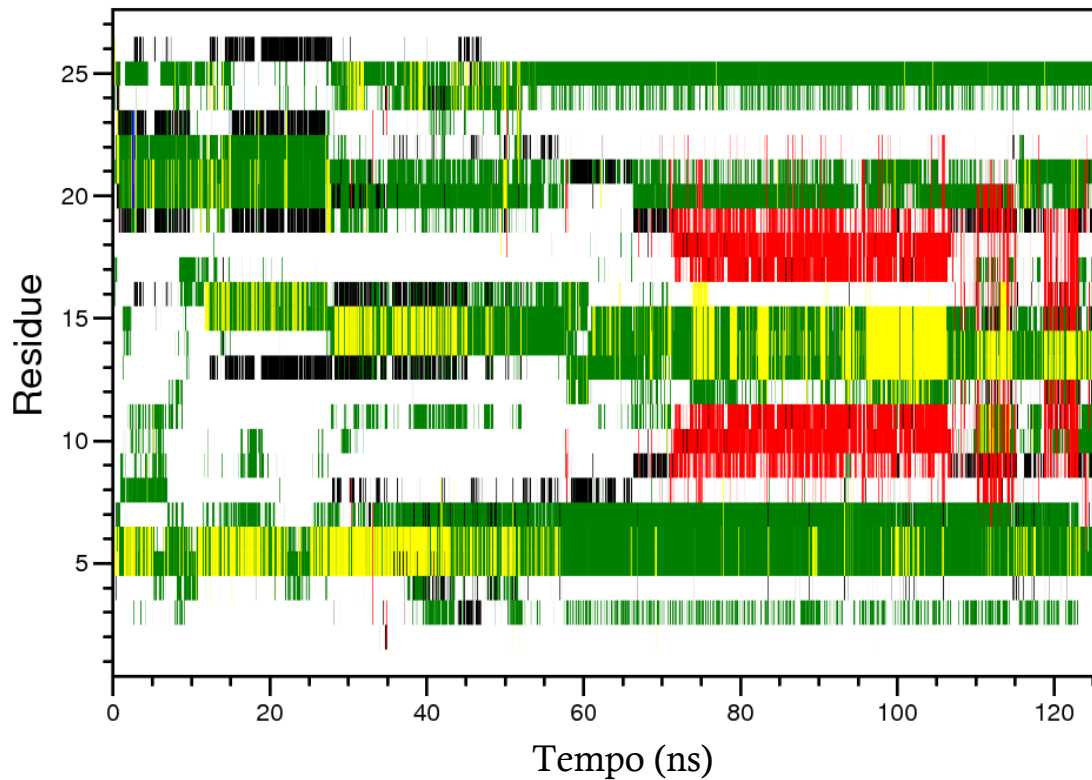


Figura 4.8 – Gráfico de análise de estruturas secundárias do peptídeo de 27 aminoácidos mutado sem a arginina da posição 4, na presença de zinco (N27hES+/R4Q) ao longo de uma simulação de 125 ns.

□ Coil ■ B-Sheet ■ B-Bridge ■ Bend ■ Turn ■ A-Helix ■ 5-Helix ■ 3-Helix

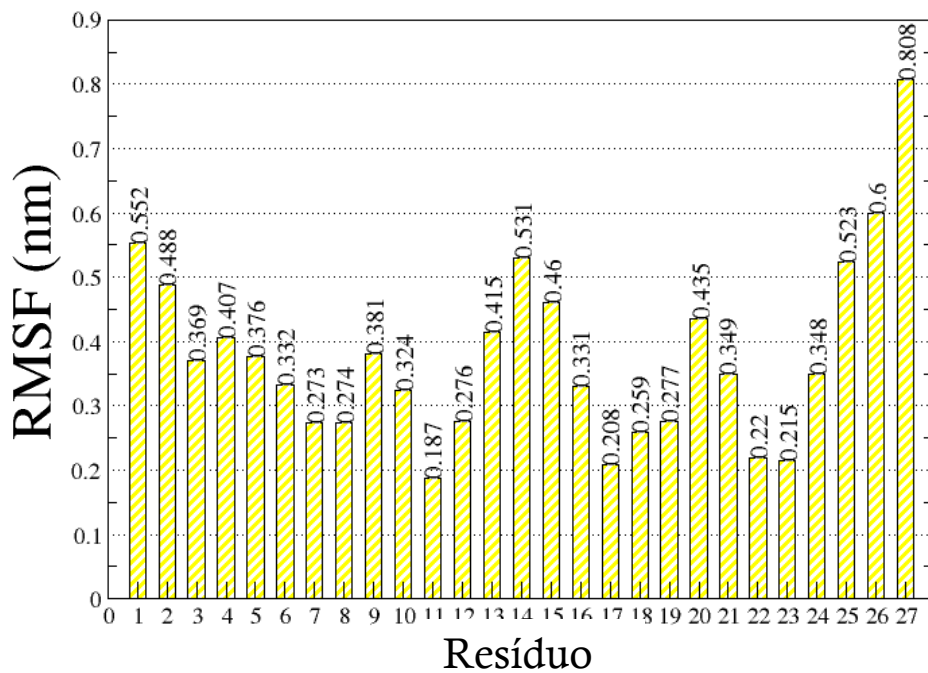


Figura 4.9 – Análise de RMSF do peptídeo humano de 27 aminoácidos na presença de zinco (N27hES+) no intervalo de tempo de 75 a 125 ns. O valor de flutuação de cada resíduo está representado sobre a respectiva barra. A média de flutuação dos resíduos é de 0,38 nm.

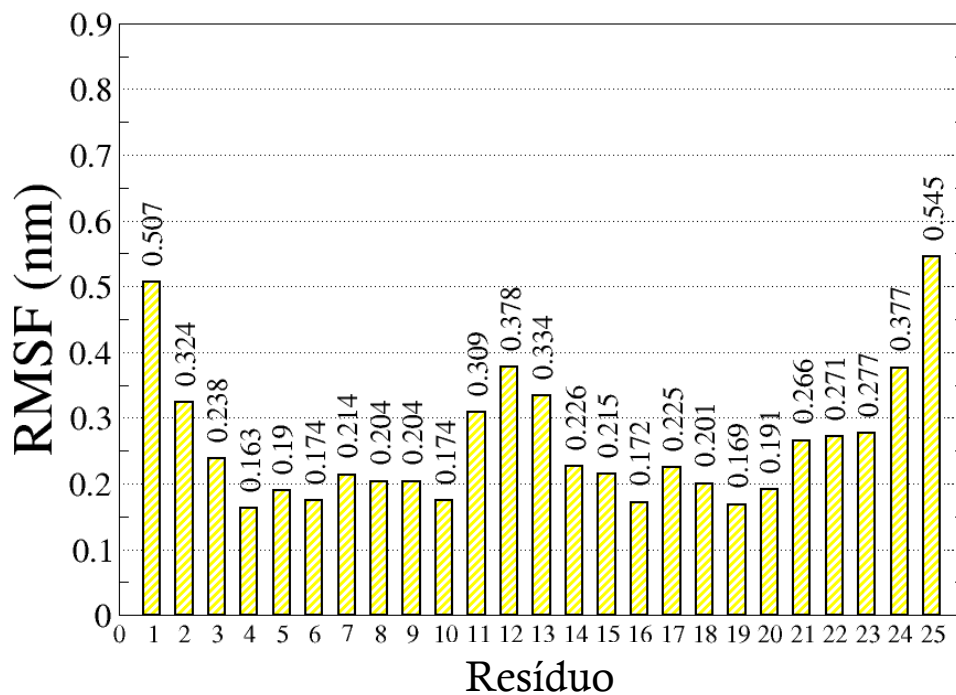


Figura 4.10 – Análise de RMSF do peptídeo humano de 25 aminoácidos na presença de zinco (N25hES+) no intervalo de tempo de 75 a 125 ns. O valor de flutuação de cada resíduo está representado sobre a respectiva barra. A média de flutuação dos resíduos é de 0,25 nm.

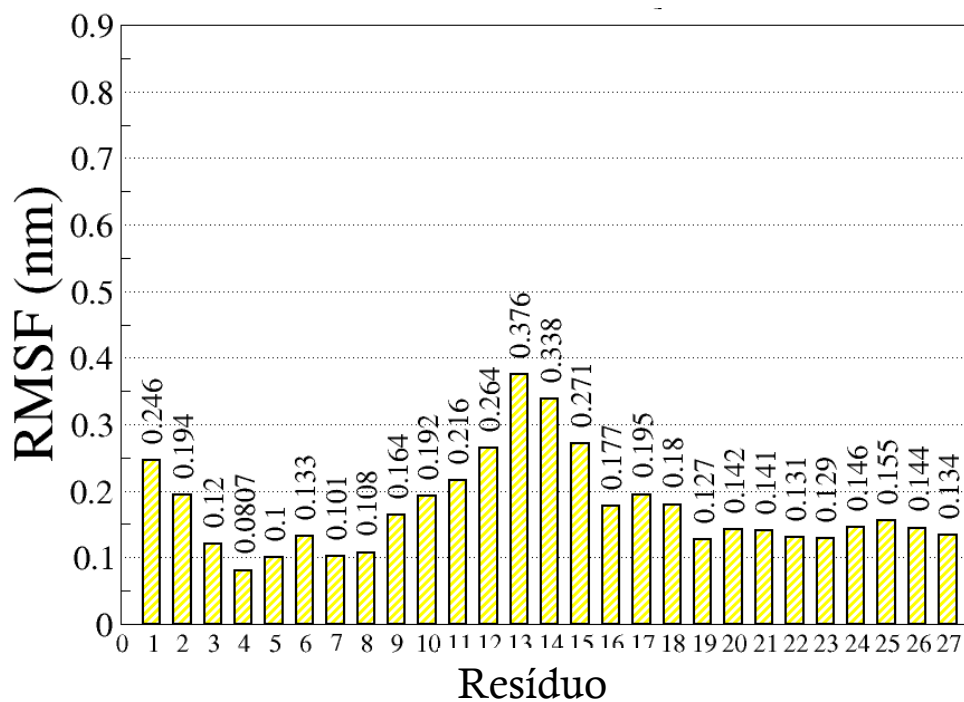


Figura 4.11 – Análise de RMSF do peptídeo humano de 27 aminoácidos sem a arginina na posição 4, na presença de zinco (N27hES+/R4Q) no intervalo de tempo de 75 a 125 ns. O valor de flutuação de cada resíduo está representado sobre a respectiva barra. A média de flutuação dos resíduos é de 0,14 nm.

### 4.3. Coordenação do íon zinco no peptídeo murino (N27mES+) e nos diferentes peptídeos humanos (N27hES+, N25hES+ e N27hES+/R4Q)

Nas análises de dinâmica molecular dos peptídeos N-terminais da endostatina na presença de zinco, este íon é coordenado pelas histidinas 1, 3 e 11 no início de todas as simulações. Para os peptídeos murino (N27mES+) e humano (N27hES+), a coordenação do íon zinco pelas três histidinas é mantida ao longo dos 225 ns de simulação (Figuras 4.12 e 4.13). Já no caso dos peptídeos humanos N25hES+ e N27hES+/R4Q a coordenação é perdida durante a dinâmica, conforme os gráficos a seguir (Figuras 4.14 e 4.15). A razão para a perda da coordenação nesses sistemas ainda não é clara e requer maior investigação.

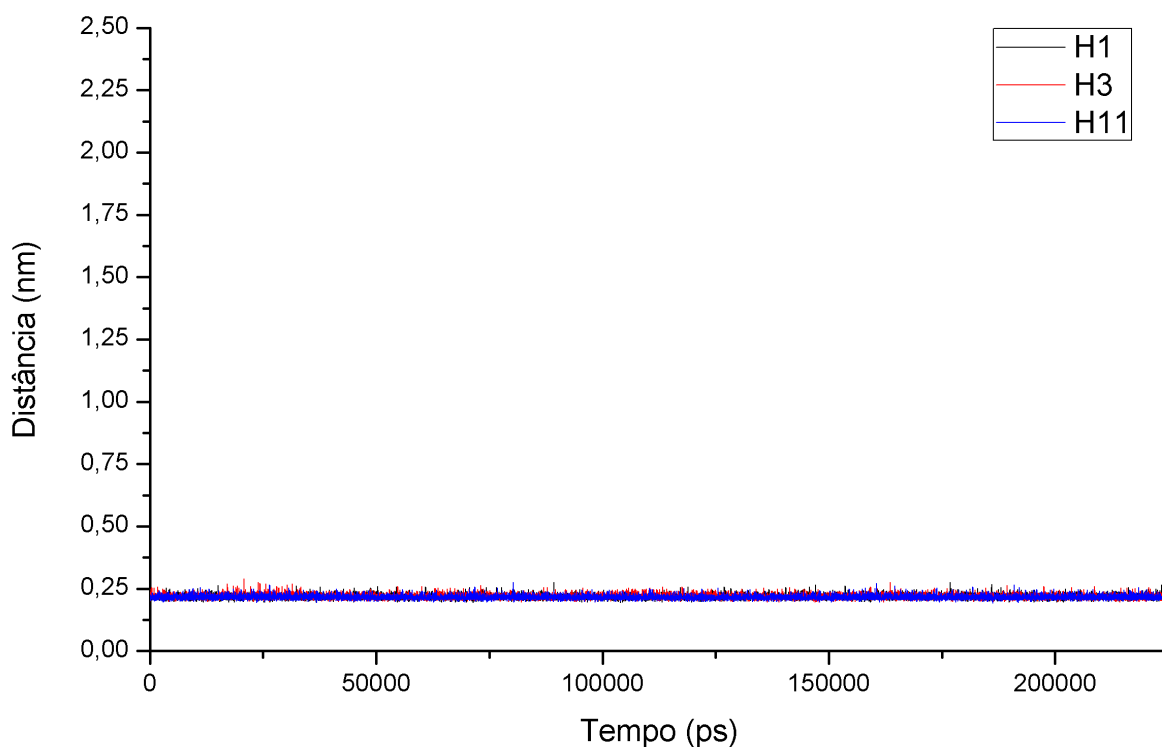


Figura 4.12 - Gráfico de distância entre o íon zinco e os nitrogênios que participam de sua coordenação no peptídeo murino N27mES+. Note que as distâncias do íon a cada um dos nitrogênios são as mesmas e permanecem constantes a longo de toda a simulação (225 ns).

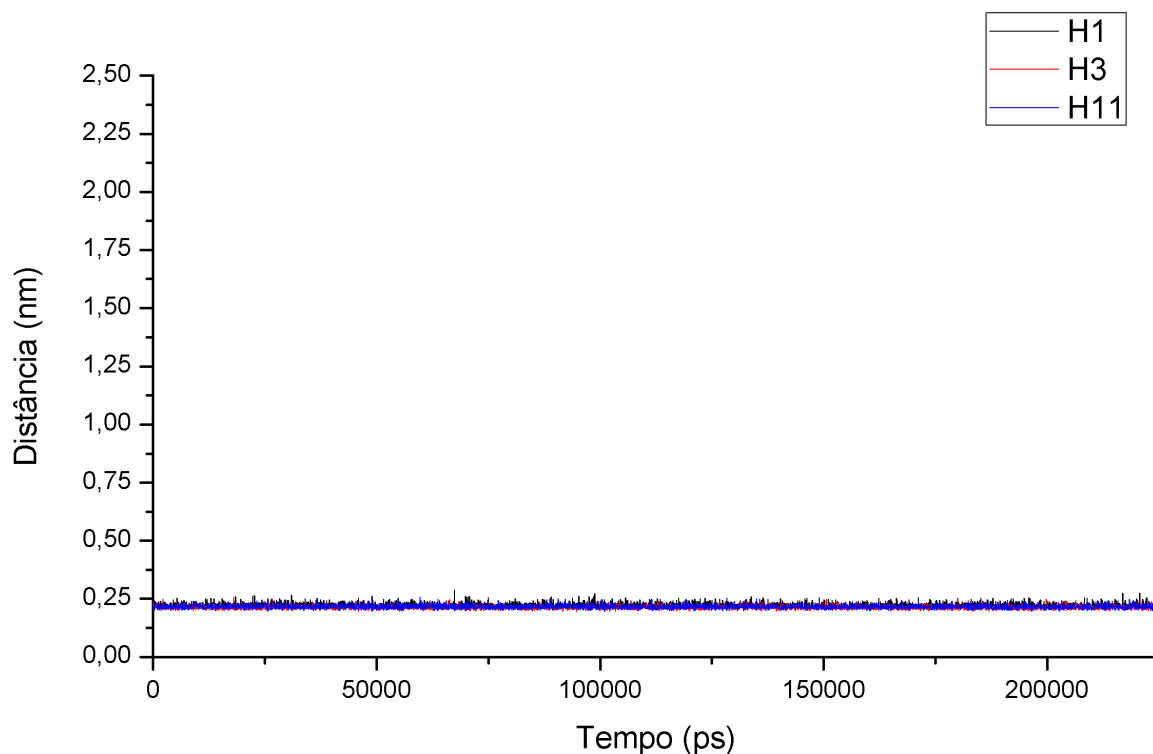


Figura 4.13 – Gráfico de distância entre o íon zinco e os nitrogênios que participam de sua coordenação no peptídeo humano N27hES+. Note que as distâncias do íon a cada um dos nitrogênios são as mesmas e permanecem constantes a longo de toda a simulação (225 ns).

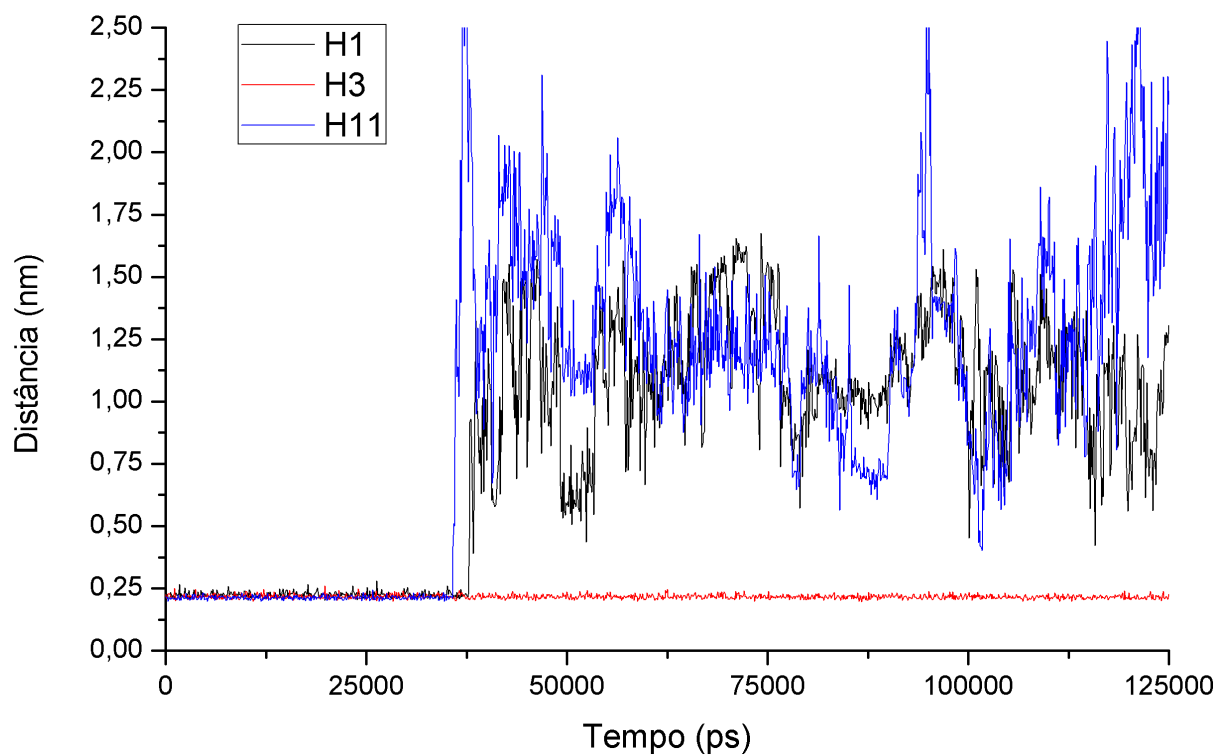


Figura 4.14 - Gráfico de distância entre o íon zinco e os nitrogênios que participam de sua coordenação no peptídeo N25hES+ ao longo de uma simulação de 125 ns. Note que a distância do íon em relação aos nitrogênios das histidinas 1 e 11 aumenta drasticamente em torno de 35 ns de simulação. A partir desse momento o íon passa a ser coordenado apenas pelo resíduo H3.

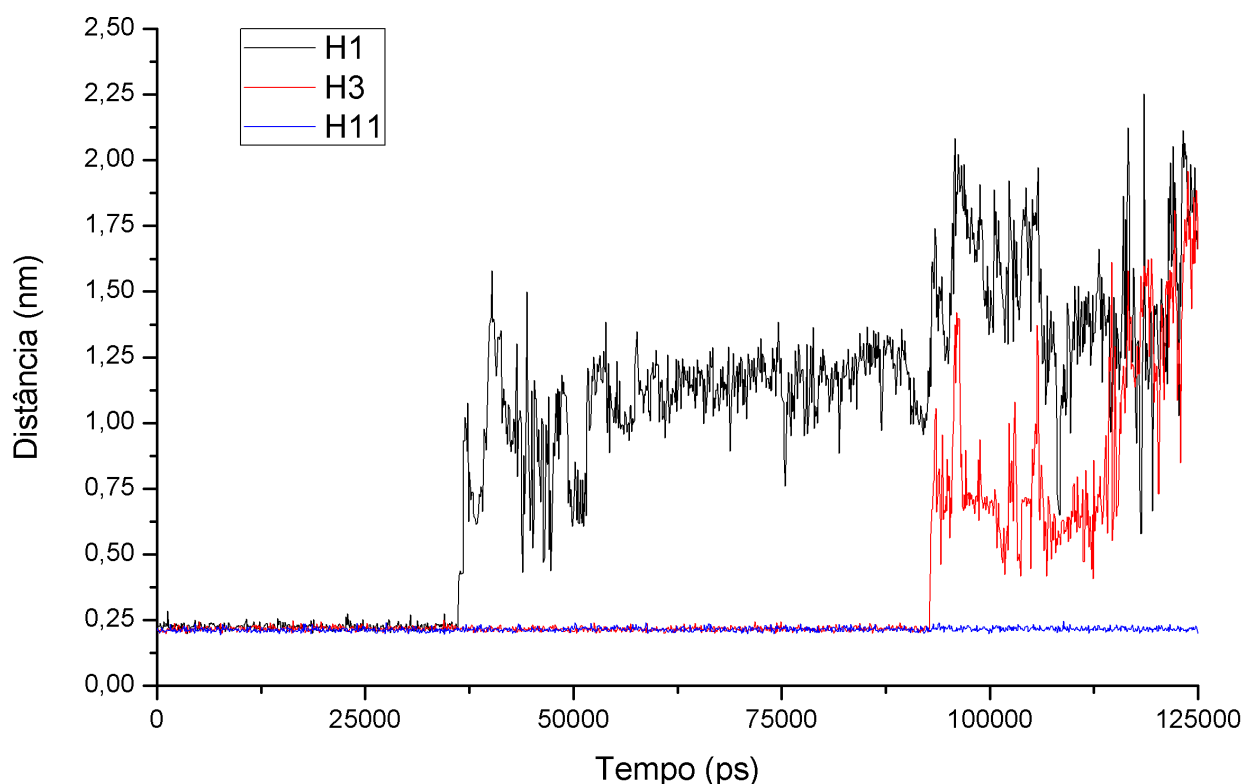


Figura 4.15 – Gráfico de distância entre o íon zinco e os nitrogênios que participam de sua coordenação no peptídeo N27hES+/R4Q ao longo de uma simulação de 125 ns. Note que a distância do íon em relação ao nitrogênio da histidina 1 aumenta drasticamente em torno de 35 ns de simulação e em relação ao nitrogênio da histidina 3 em torno de 90 ns. A partir desse momento o íon passa a ser coordenado apenas pelo resíduo H11.

Nos sistemas que incluíam peptídeos na presença do íon zinco, também foi realizada a análise de distribuição radial de moléculas de água em relação ao íon, para melhor caracterizar seu estado de solvatação. Essa análise foi feita em relação aos átomos de oxigênio das moléculas de água, tomando como referência o íon zinco. No eixo das abscissas está representada a distância em relação ao centro da esfera que representa o íon. No eixo das ordenadas estão representados valores adimensionais que correspondem à probabilidade de haver átomos de oxigênio do solvente a uma distância  $r$  do íon. Conforme a distância aumenta, a probabilidade converge para 1. Na figura 4.16, por exemplo, os picos em 0,2 e 0,4 representam as duas primeiras camadas de solvatação. Entende-se que a 0,2 nm de distância do íon zinco existe aproximadamente 12 vezes mais chance de encontrar oxigênios do solvente do que a 2 nm.

Essa forte tendência dos oxigênios do solvente de estarem a uma distância de 0,2 nm representa a formação das interações de coordenação. Pode-se perceber que nos sistemas N27mES+ (Figura 4.16) e N27hES+ (Figura 4.17) essa tendência é menor do que nos sistemas N25hES+ (Figura 4.18) e N27hES+/R4Q (Figura 4.19). Isto ocorre porque, como mostrado anteriormente, nos dois primeiros



sistemas o íon zinco é coordenado por 3 resíduos de histidina ao longo de toda a dinâmica, ao contrário dos dois últimos sistemas, em que as interações de coordenação são perdidas.

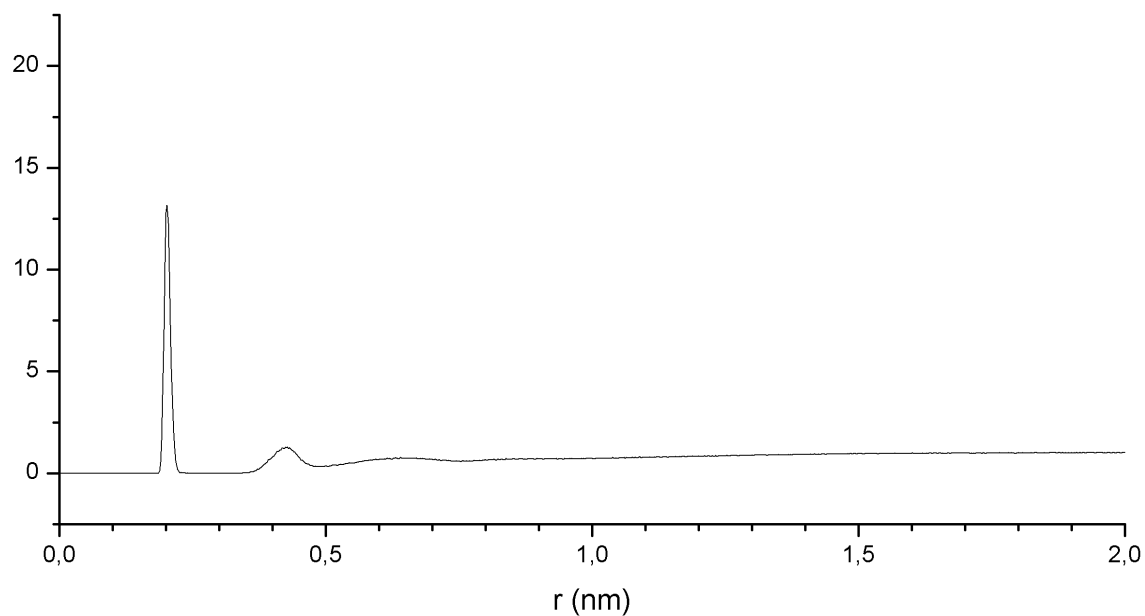


Figura 4.16 - Sistema N27mES+. Gráfico de distribuição radial de oxigênios do solvente em relação ao íon zinco. Os picos representam as camadas de solvatação. Nota-se que é aproximadamente 12 vezes mais provável encontrar átomos de oxigênio à distância de 0,2 nm do que a 2,0 nm (onde  $P=1$ ).

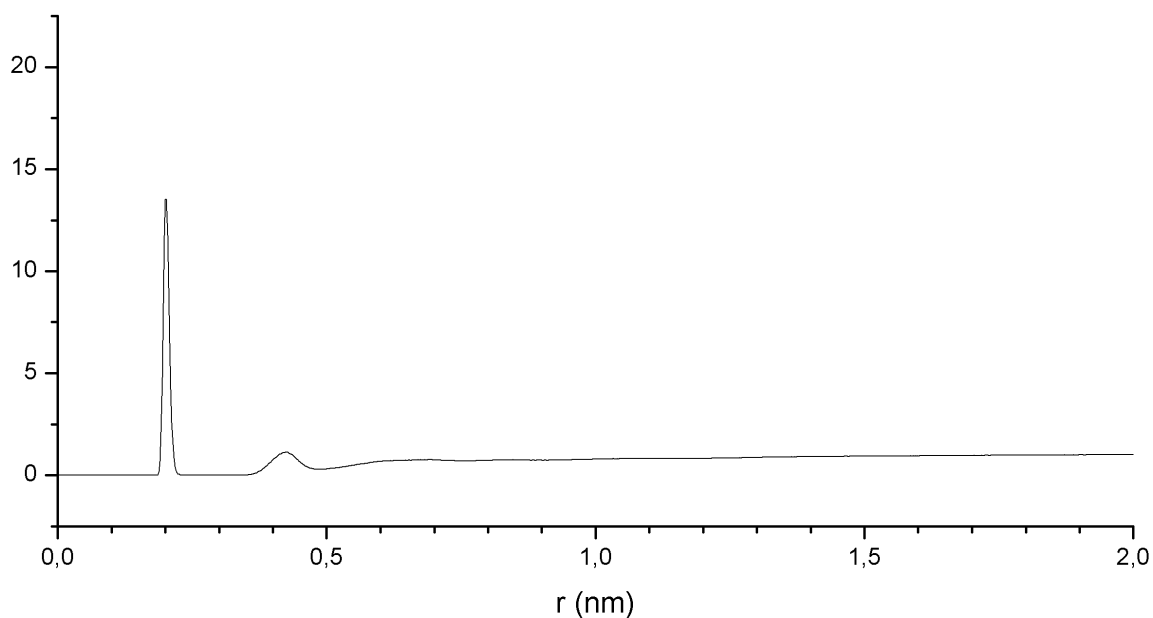


Figura 4.17 - Sistema N27hES+. Gráfico de distribuição radial de oxigênios do solvente em relação ao íon zinco. Os picos representam as camadas de solvatação. Nota-se que é aproximadamente 12 vezes mais provável encontrar átomos de oxigênio à distância de 0,2 nm do que a 2,0 nm (onde  $P=1$ ).

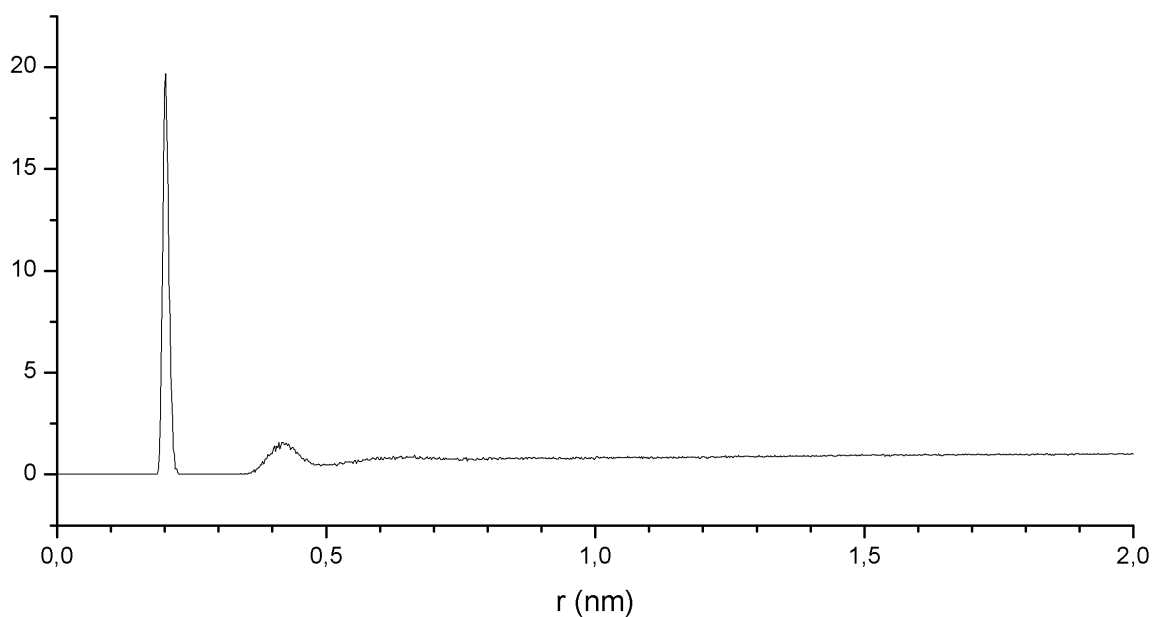


Figura 4.18 - Sistema N25hES+. Gráfico de distribuição radial de oxigênios do solvente em relação ao íon zinco. Os picos representam as camadas de solvatação. Nota-se que é aproximadamente 20 vezes mais provável encontrar átomos de oxigênio à distância de 0,2 nm do que a 2,0 nm (onde  $P=1$ ). Essa diferença ocorre porque as histidinas que coordenam o íon no início da dinâmica dão lugar a moléculas de água a partir de aproximadamente 35 ns.

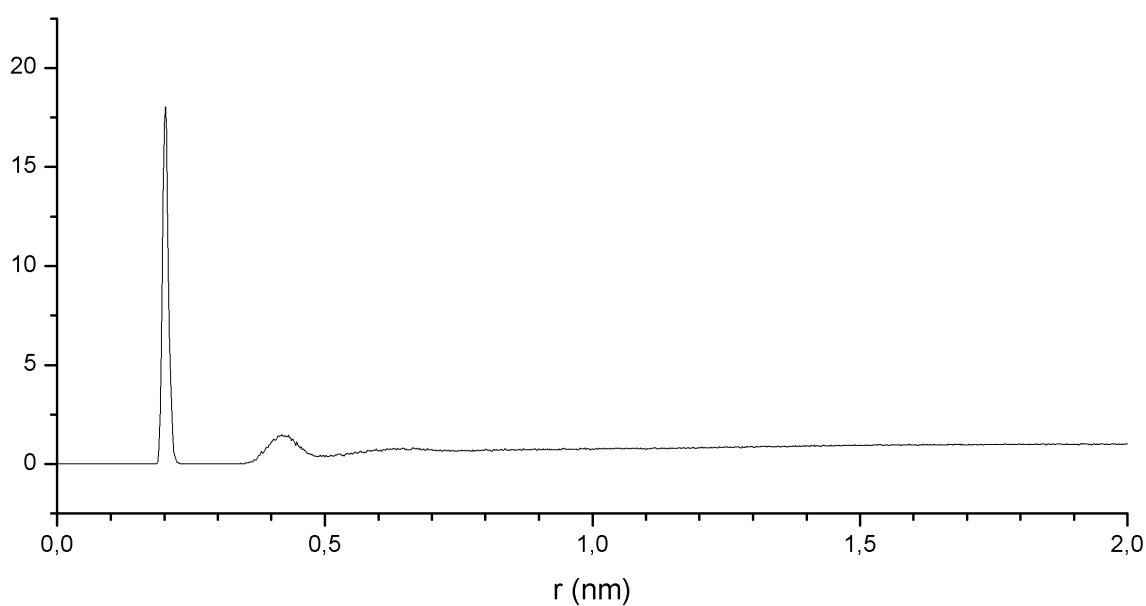


Figura 4.19 - Sistema N27mES+/R4Q. Gráfico de distribuição radial de oxigênios do solvente em relação ao íon zinco. Os picos representam as camadas de solvatação. Nota-se que é aproximadamente 17 vezes mais provável encontrar átomos de oxigênio à distância de 0,2 nm do que a 2,0 nm (onde  $P=1$ ). Nesse sistema, o primeiro pico é menor do que no sistema anterior, já que a perda da coordenação ocorreu gradativamente.

4.4.O peptídeo murino na ausência de zinco (N27mES-) converge rapidamente para uma conformação sabidamente inativa.

O peptídeo murino na ausência do íon zinco apresenta uma rápida mudança (em cerca de 10 ns) nos valores de RMSD ( $\sim 0,25$  nm, Figura 4.20). A seguir, os valores de RMSD oscilam em torno de 0,25 nm ao longo de toda a simulação. Análise de clusters mostra que praticamente todas as estruturas amostradas foram classificadas em um único cluster de 0,3 nm (Figura 4.21). Na presença do íon zinco, como foi visto no item 4.1, o peptídeo apresenta uma mudança gradual nos valores de RMSD até assumir uma conformação de equilíbrio.

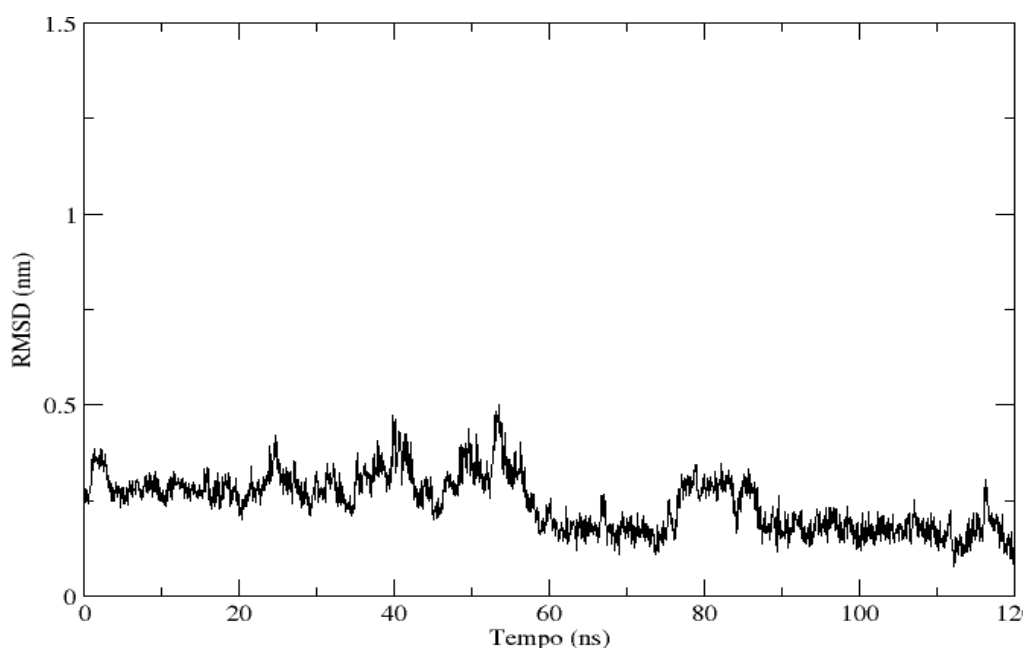


Figura 4.20 - Gráfico de RMSD do peptídeo murino na ausência de zinco N27mES- ao longo de uma dinâmica de 120 ns. A estrutura de referência utilizada foi a estrutura final.

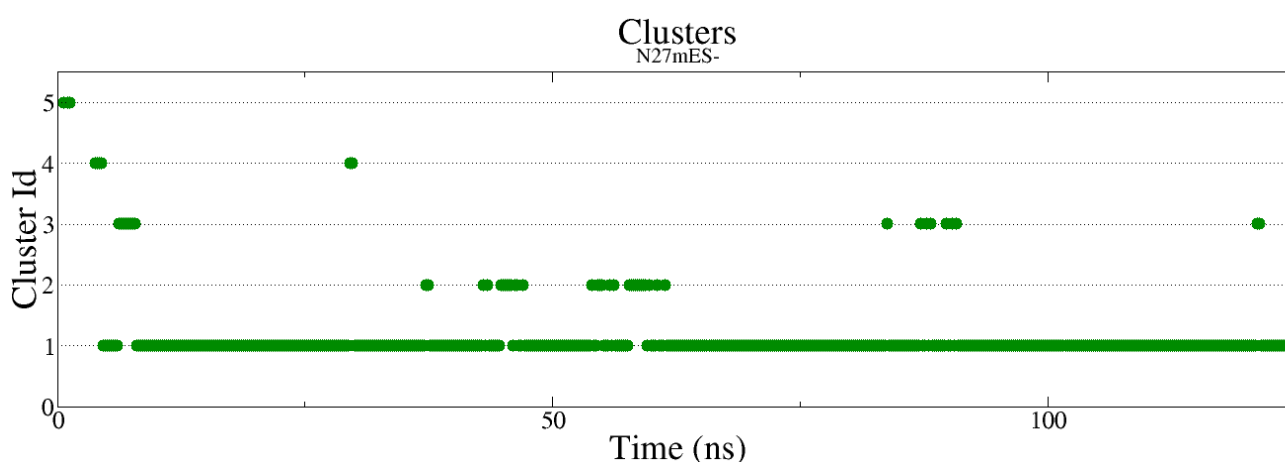


Figura 4.21 – Gráfico apresentando os 5 clusters mais representativos de um total de 16 clusters encontrados para o peptídeo murino na ausência de zinco N27mES- ao longo de uma dinâmica de 125 ns.

#### 4.5. O peptídeo murino na presença de zinco (N27mES+) atinge uma conformação estável em grampo-beta similar ao arresteno.

Como mostrado anteriormente, (item 4.1), após 80 ns de simulação, o peptídeo murino na presença de zinco (N27mES+) assumiu uma conformação em grampo-beta que permaneceu estável até o término de uma simulação de 225 ns (Figura 4.5). Essa folha-beta é formada por interações entre os resíduos 9, 10, 11, 12, 13 e os resíduos 20, 21, 22, 23, 24. O sistema permaneceu nesta conformação por aproximadamente 140 ns.

Com intuito de testar a estabilidade dessa conformação, ela foi utilizada como estado inicial para uma nova simulação de dinâmica molecular com duração de 1  $\mu$ s (Figura 4.22), utilizando uma semente randômica distinta. Mais uma vez, a estrutura de grampo-beta mostrou-se estável.

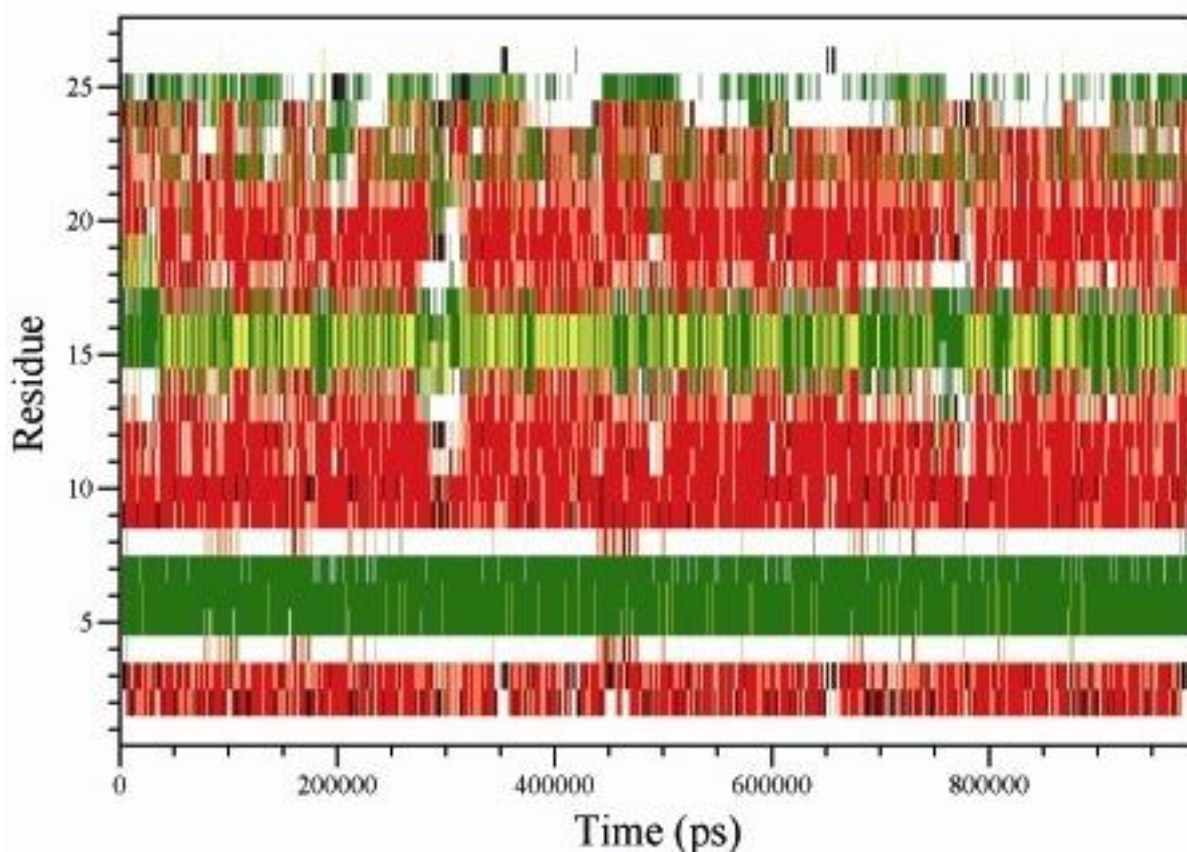


Figura 4.22 Gráfico de análise das estruturas secundárias da simulação de 1  $\mu$ s do sistema N27mES+. Note que as folhas-beta mantêm-se estáveis ao longo de toda a simulação.

Considerando que esta estrutura em grampo-beta, que apresentou grande estabilidade, pudesse ser responsável pela atividade biológica do fragmento N-terminal da endostatina, foi realizada de forma manual uma comparação entre as estruturas de algumas proteínas antiangiogênicas, apresentadas na

seção 1.3. Verificou-se que o peptídeo N27mES+ apresentava considerável similaridade estrutural com a estrutura do arresteno.

O arresteno é uma proteína antiangiogênica derivada da porção não globular do colágeno IV (COLORADO *et al.*, 2000). Sua estrutura apresenta um grampo-beta similar ao formado pelo peptídeo N-terminal da endostatina murina, N27mES+ (Figura 4.23). Alguns resíduos estão em posições espaciais correlacionadas: prolina, lisinas, asparaginas e argininas. Desses, os três primeiros resíduos estão na mesma posição relativa na sequência primária, já as argininas estão deslocadas uma em relação à outra por apenas um resíduo.

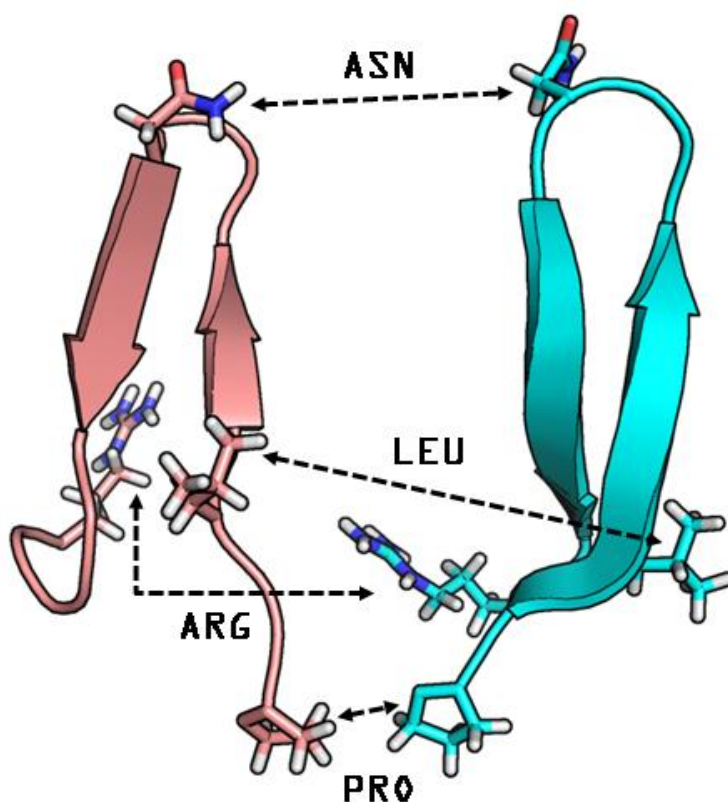


Figura 4.23 – Representação parcial da estrutura cristalográfica do arresteno (em rosa) e do peptídeo murino N27mES+ (ciano). Os resíduos prolina, leucina, asparagina e arginina estão em posições espacialmente correlacionadas.

Além da conformação espacial e da sequência primária, o potencial eletrostático das duas estruturas é também similar, como pode ser visto na figura 4.24, que apresenta a superfície de potencial eletrostático das duas cadeias.

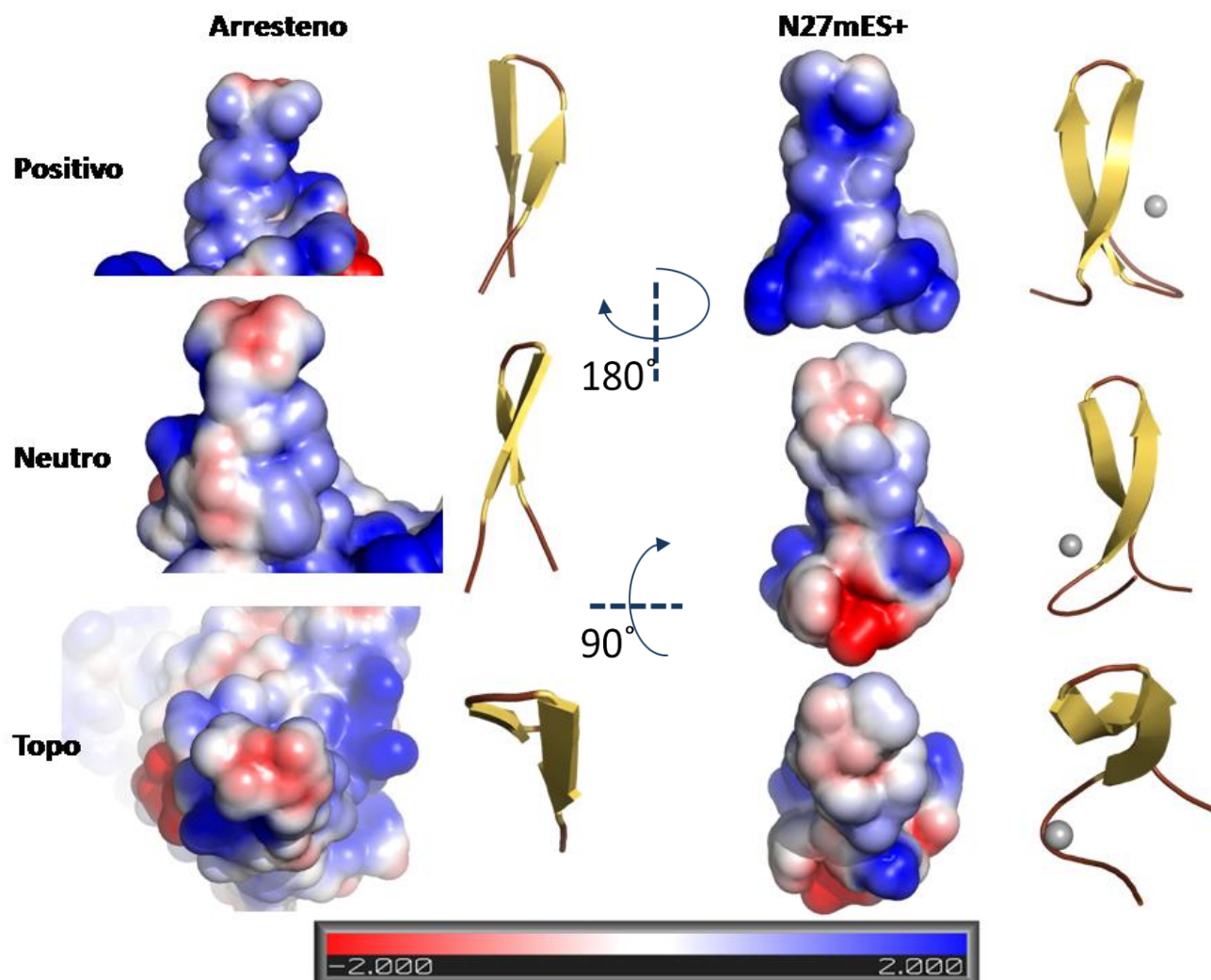


Figura 4. 24 – Potencial eletrostático representado na superfície acessível ao solvente e a respectiva representação em *cartoon* do arresteno (à esquerda) e do peptídeo murino N27mES+ (à direita) em diferentes orientações espaciais.

4.6. Uma vez estabelecida, a folha beta pode ser mantida por um mínimo de 20 aminoácidos.

Para determinar qual seria o menor fragmento do peptídeo murino que poderia manter a conformação em folha-beta, nós restringimos a sequência a um total de 20 resíduos e ainda a apenas 18 resíduos, correspondentes aos resíduos que formam a folha-beta no peptídeo N27mES+. Uma vez que duas das três histidinas que participam na coordenação do íon zinco foram removidas, também removemos o íon de ambos os sistemas.

O peptídeo de 20 resíduos (N20mES-) foi capaz de manter a conformação de grampo-beta estável ao longo de 120 ns de simulação (Figura 4.25), enquanto o peptídeo de 18 resíduos (N18mES-) perdeu as características de uma folha beta aproximadamente em torno dos 50 ns iniciais (Figura 4.26). Em ambos os sistemas, a estrutura inicial dos peptídeos foi derivada da estrutura final do peptídeo N27mES+, ou seja, as folhas-beta já se encontravam estruturadas.

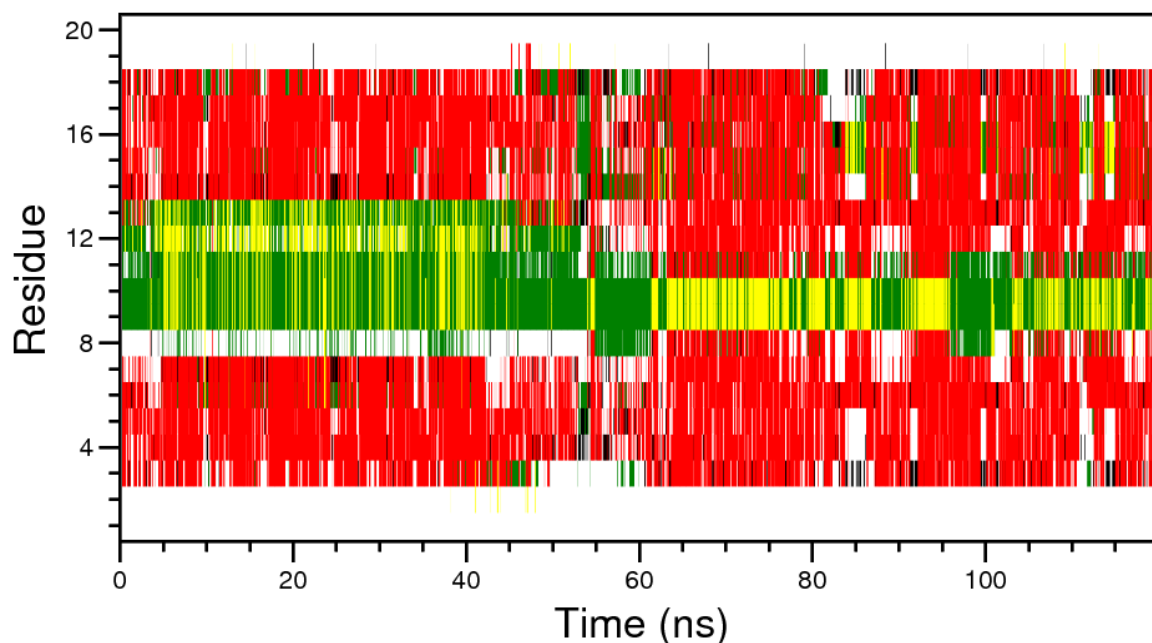


Figura 4.25 – Gráfico de análise de estrutura secundária do peptídeo murino de 20 resíduos (N20mES-) ao longo de uma simulação de 125 ns.

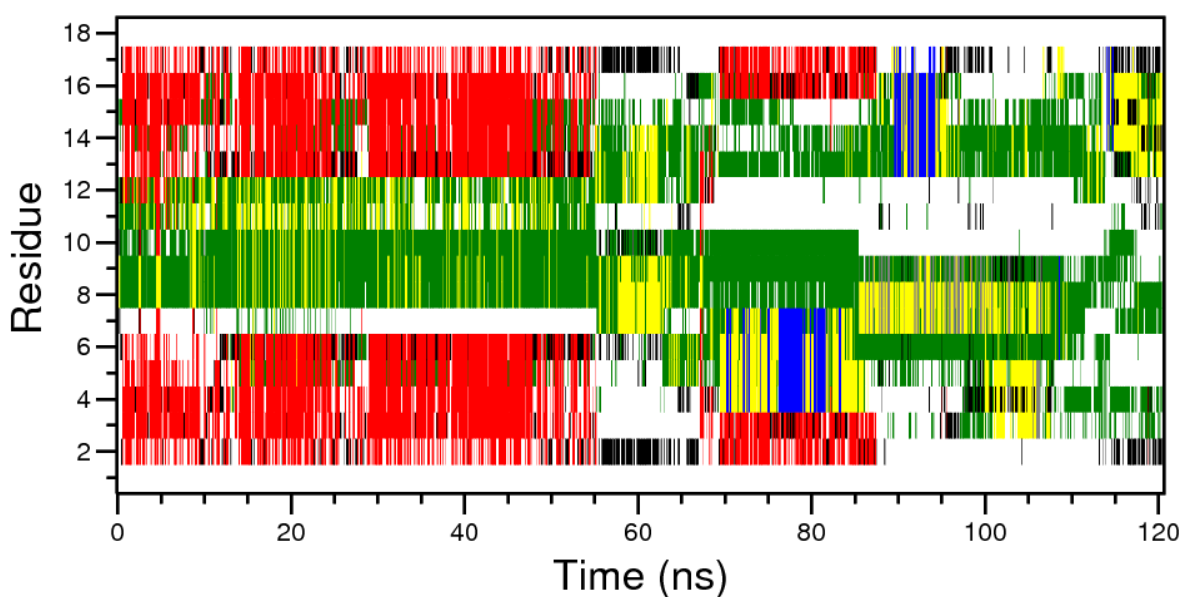


Figura 4.26 – Gráfico de análise de estrutura secundária do peptídeo murino de 18 resíduos (N18mES-) ao longo de uma simulação de 125 ns.

Coil
  B-Sheet
  B-Bridge
  Bend
  Turn
  A-Helix
  5-Helix
  3-Helix

#### 4.7. Análise geral das trajetórias de simulação por dinâmica molecular pela progressão de clusters

Ao longo das seções subsequentes será descrita uma análise das simulações de dinâmica molecular através da observação de grupos de estruturas, sua progressão temporal e prevalência. Serão apresentados os gráficos de *clusters* e as estruturas médias dos cinco clusters mais representativos de cada dinâmica, junto com a sua prevalência, na forma de percentagem de frames em relação ao total de frames presentes nas trajetórias obtidas por simulações de dinâmica molecular de 125 ou 225 ns. Como descrito na secção 3.8, o método utilizado na determinação de clusters foi o *gromos* e o raio de corte utilizado foi de 0,3 nm.

O código de cores foi mantido em todas as figuras; sendo azul-escuro a estrutura média do cluster de maior prevalência, cuja identificação nos gráficos de *cluster* é 1, em vermelho a estrutura média do segundo cluster mais prevalente, cuja identificação é 2, e assim por diante, no sentido horário. Em laranja, nos gráficos de percentagem, estão representados os demais grupos de estruturas, ou seja, aqueles com menor prevalência, que não estão entre os cinco mais representativos.

##### 4.7.1. N27mES+

A estrutura do peptídeo murino na presença de zinco (N27mES+) convergiu para uma conformação estável a partir de aproximadamente 80ns de simulação. Esta conformação preferencial é representada pelo *cluster* 1 na figura 4.27 e pela cor azul-escuro na figura 4.28. Coincidentemente, para esta dinâmica, os grupos estão ordenados temporalmente em ordem decrescente, ou seja, o quinto cluster mais prevalente (*cluster* 5) foi o primeiro a surgir na dinâmica e o cluster mais prevalente (*cluster* 1) foi o último a surgir. Os resultados obtidos sugerem que o peptídeo murino na presença de zinco assume estruturas progressivamente mais estáveis (Figura 4.27), finalmente convergindo para uma conformação em grampo-beta estável que apresenta um resíduo de asparagina na extremidade do grampo (Figura 4.28).



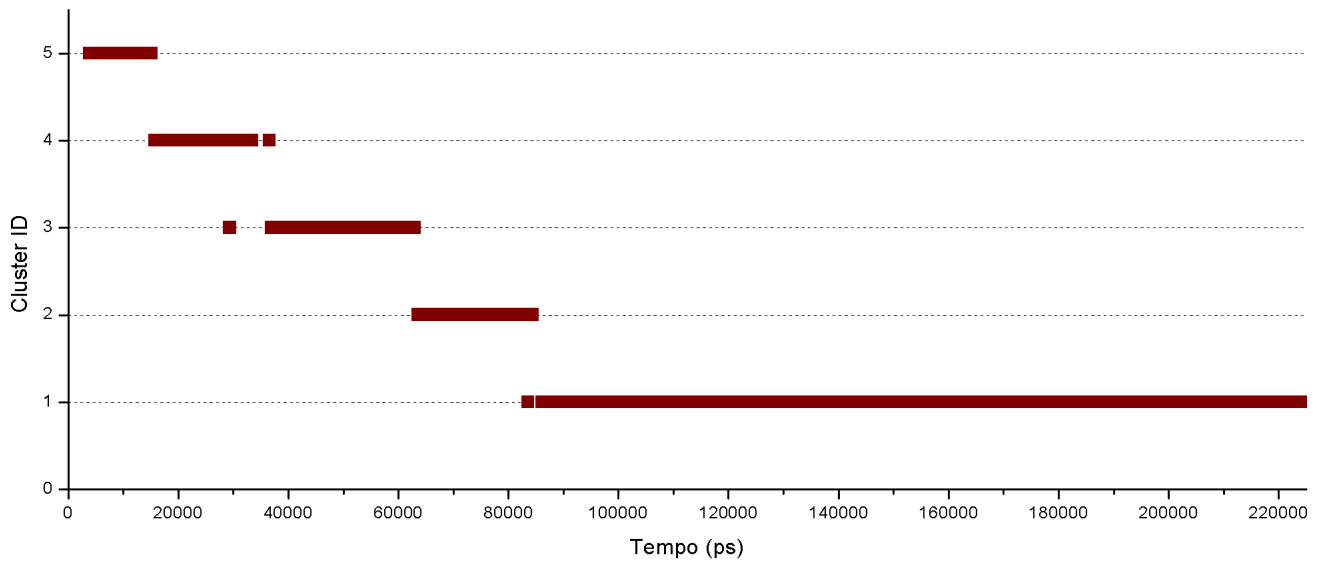


Figura 4.27 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N27mES+ ao longo de 225 ns.

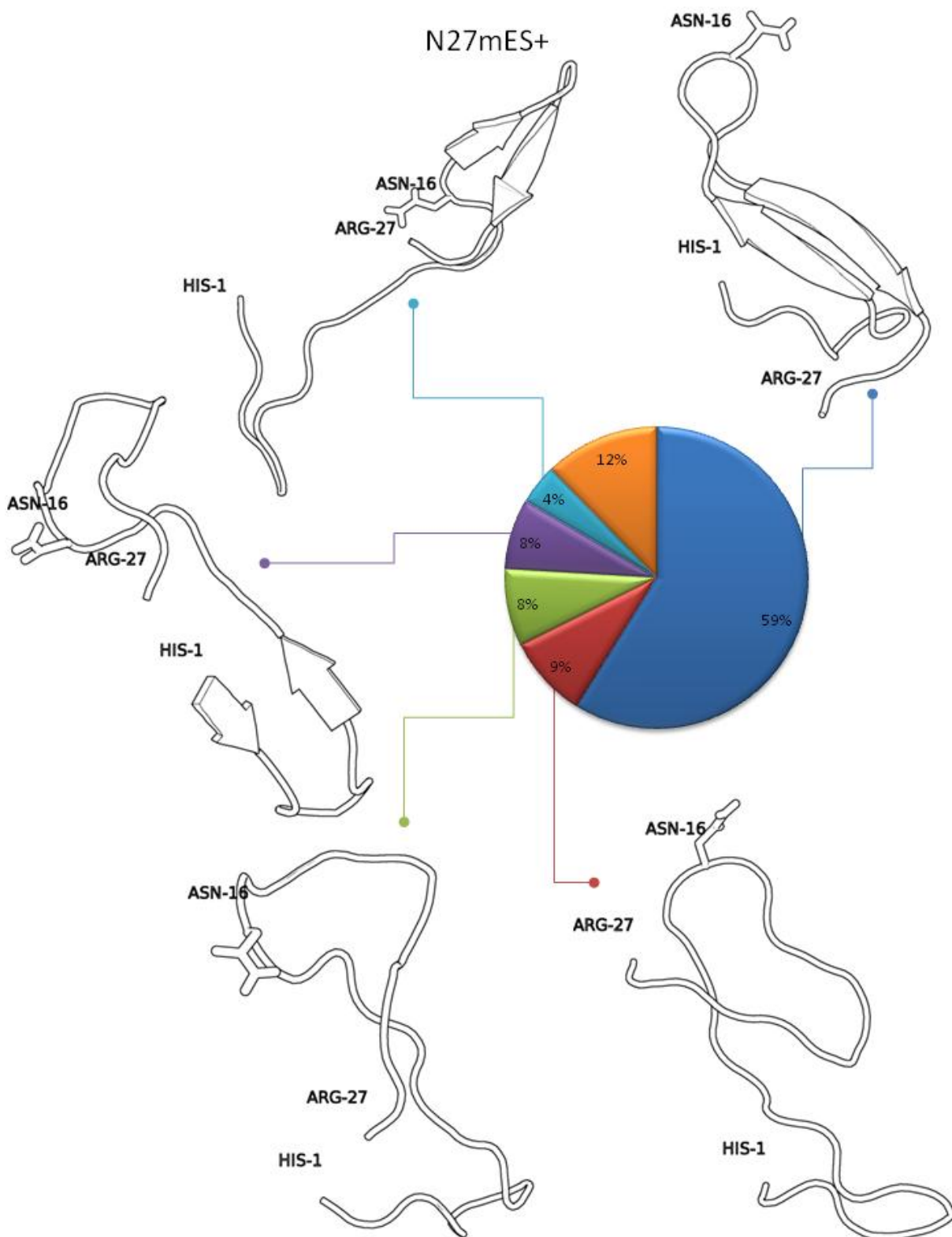


Figura 4.28 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N27mES+.

#### 4.7.2. N27mES-

A estrutura do peptídeo murino na ausência de zinco (N27mES-) assume rapidamente uma conformação estável (Figura 4.29). Esta conformação provavelmente não apresenta atividade biológica, uma vez que já foi relatado que o peptídeo na ausência de zinco não apresenta atividade antiangiogênica (SJIN *et al.*, 2005). Nessa conformação mais prevalente (*cluster* 1) o peptídeo apresenta interações entre os terminais que estabilizam a estrutura como um todo (Figura 4.30). Os grupos 1, 3 e 4 (azul-escuro, verde e lilás, respectivamente) apresentam uma conformação similar, onde existem interações entre os terminais e são formados dois *loops*.

A estrutura do segundo grupo mais representativo (*cluster* 2) apresenta uma fita-beta N-terminal (Figura 4.30) e surge por volta dos 40 ns de simulação, mas é perdida em torno dos 60 ns e não volta a surgir (Figura 4.29). Dessa forma, a conformação representada pelo grupo 1 parece ser consideravelmente estável e aparentemente não se altera sob estas condições de simulação.

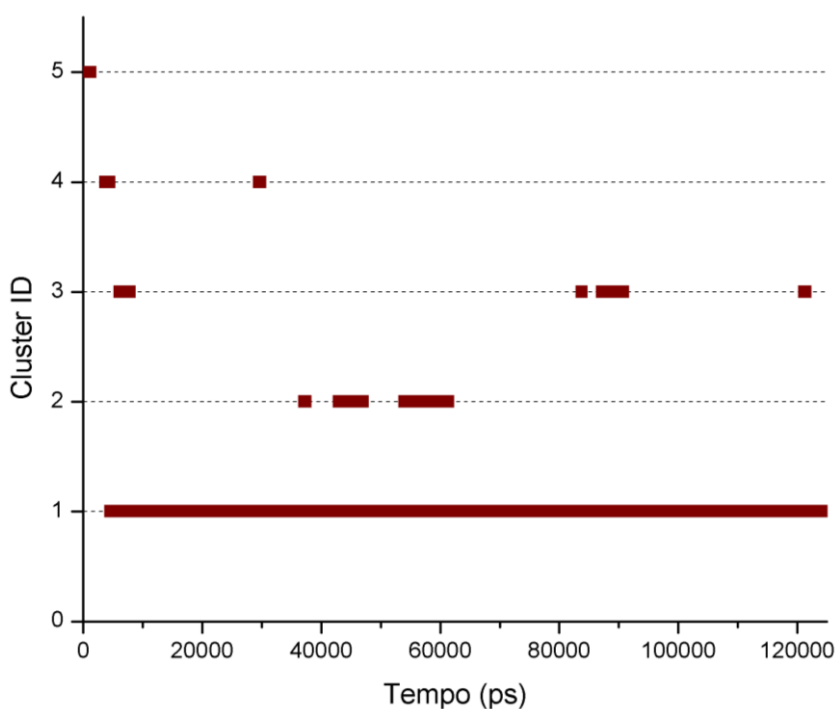


Figura 4.29 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N27mES- ao longo de 125 ns.

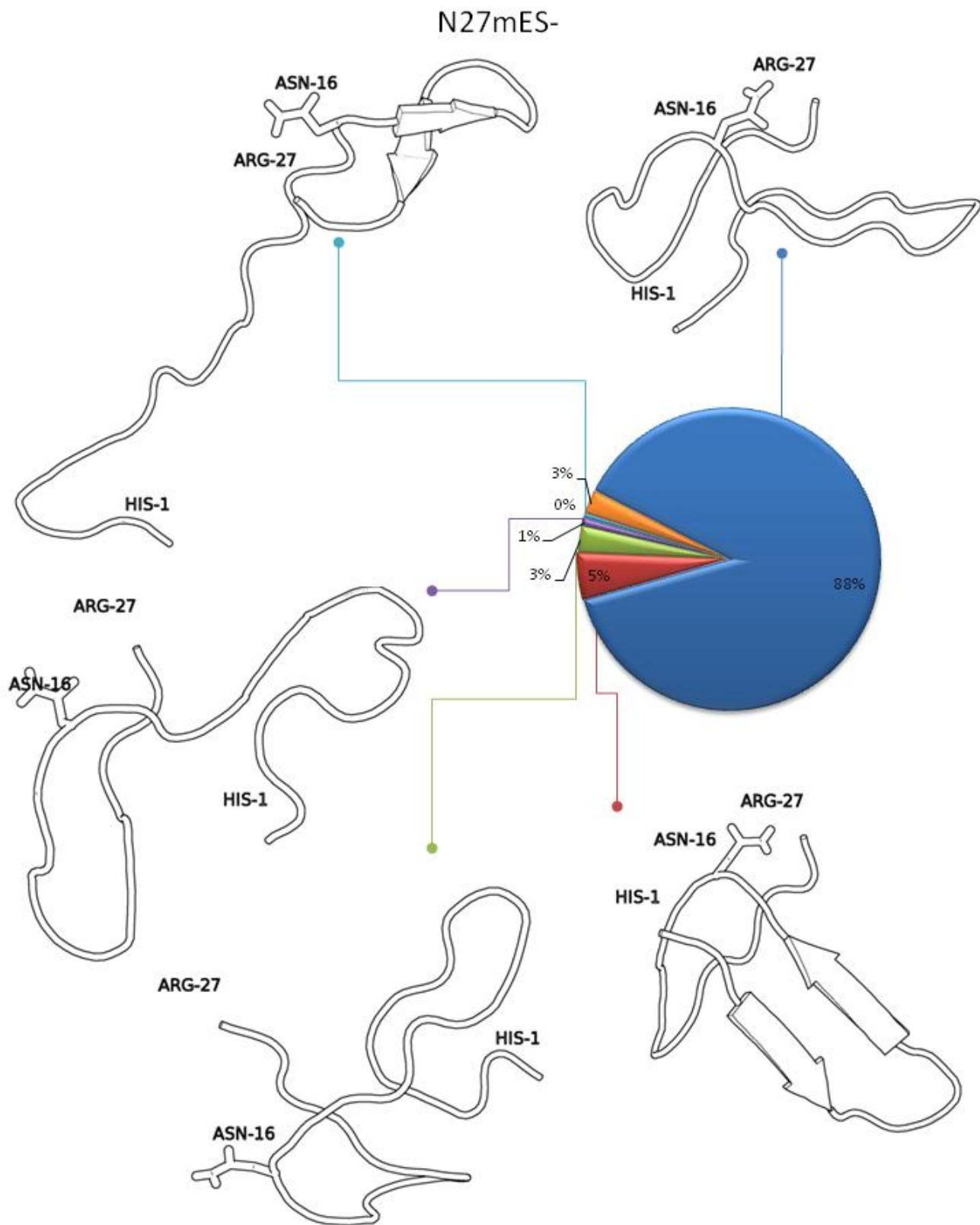


Figura 4.30 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N27mES-.

### 4.7.3. N27hES+

Como mostramos anteriormente (seção 4.2), as argininas presentes nos terminais do peptídeo humano de 27 resíduos apresentam cargas positivas que prejudicam sua estabilidade. Assim, os terminais desse peptídeo tendem a se separar (Figura 4.32), impedindo a formação de uma folha-beta única e estável como a do peptídeo murino.

De forma geral, o grupo estrutural mais prevalente (*cluster* 1) do peptídeo humano de 27 resíduos pode ser considerado uma estrutura de transição, capaz de dar origem a todas as demais estruturas (Figuras 4.31 e 4.32).

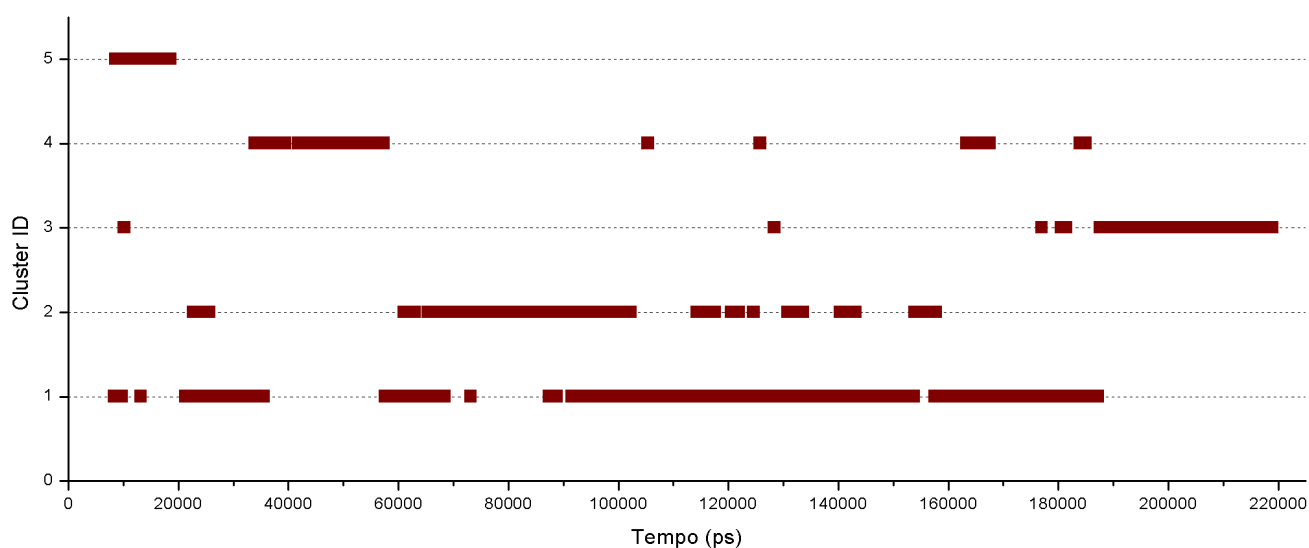
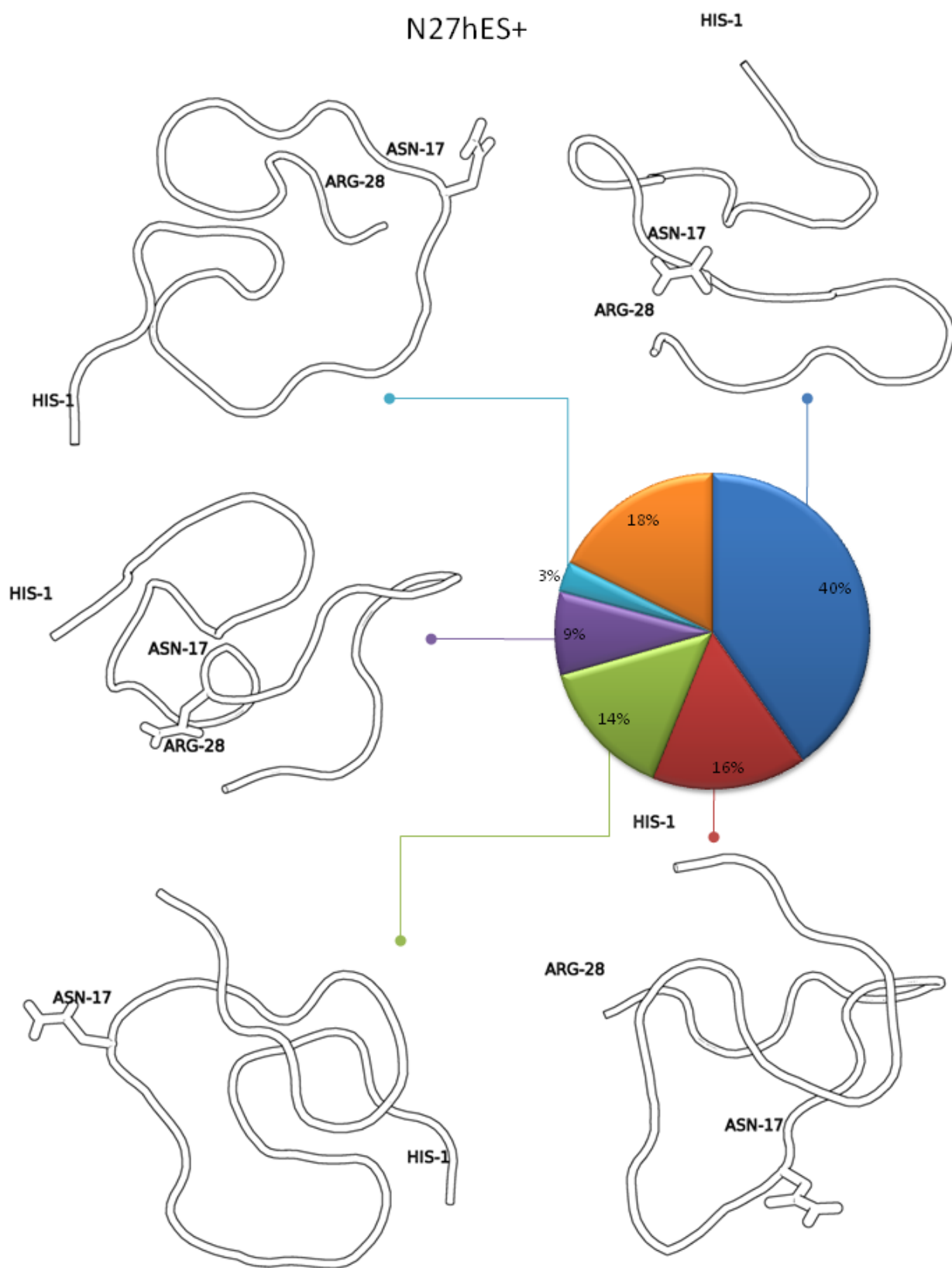


Figura 4.31 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N27hES+ ao longo de 225 ns.



4.32 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N27hES+.

#### 4.7.4. N27hES-

Na ausência do íon zinco, assim como no peptídeo murino, a estrutura do N27hES- assume uma conformação relativamente estável (*cluster* 1), que predomina até aproximadamente 80 ns de simulação. Esta estrutura então é perdida e dá lugar a outros grupos de estruturas. O grupo de estruturas predominante ao término da simulação é a que representa o *cluster* 4, entretanto seria necessário estender o tempo de simulação para entender melhor a dinâmica desse fragmento e verificar se ele alcança ou não uma conformação estável.

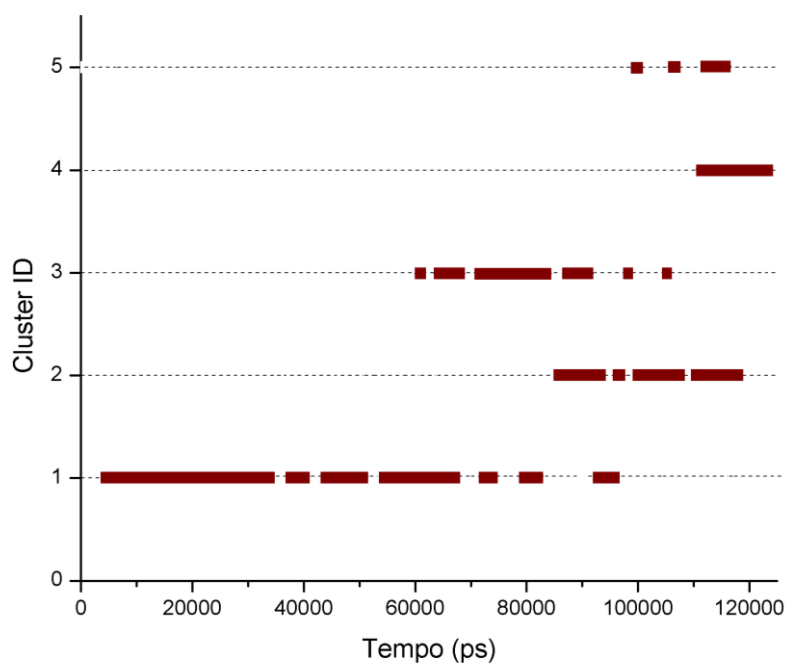


Figura 4.33 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N27hES- ao longo de 125 ns.

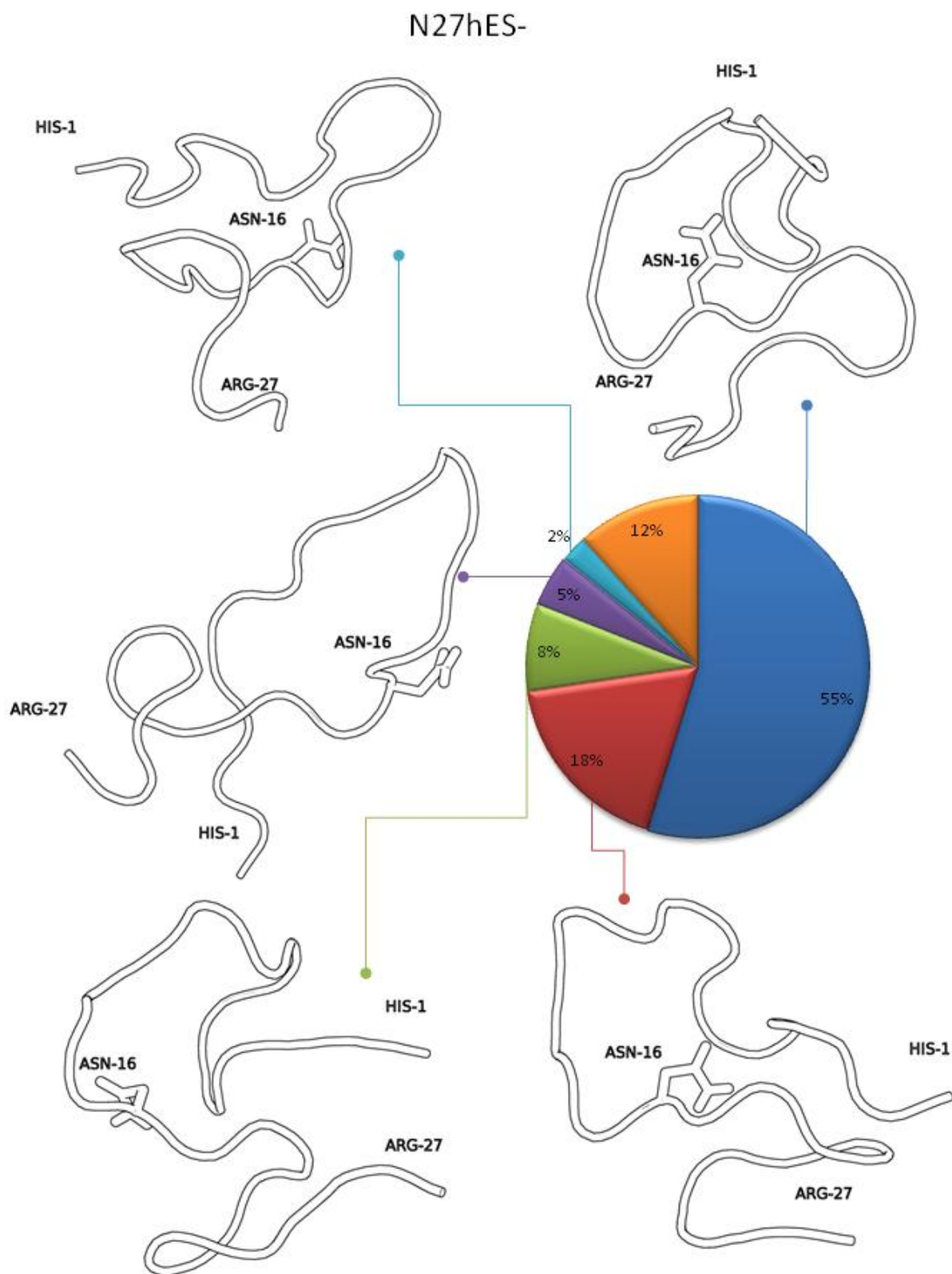


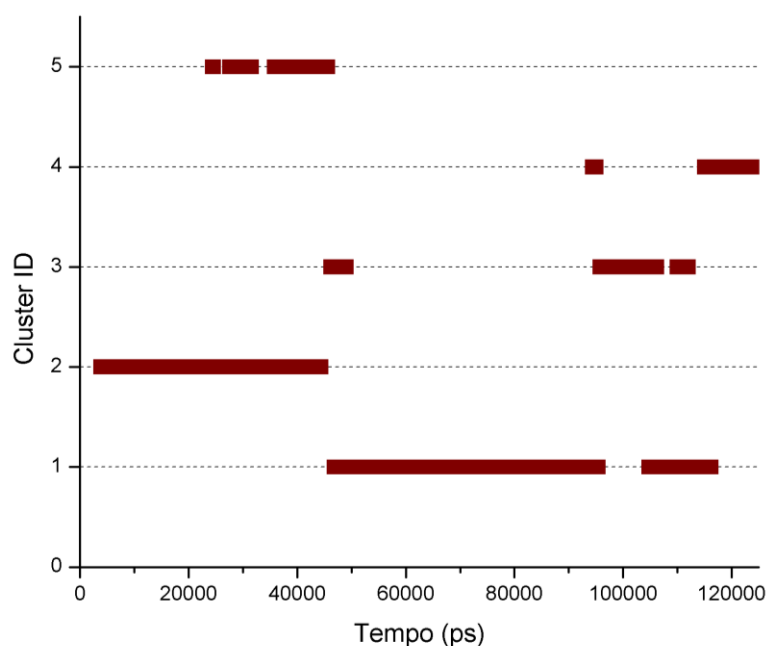
Figura 4.34 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N27hES-.



#### 4.7.5. N25hES+

No peptídeo derivado do N-terminal da endostatina humana no qual foi removida uma das argininas do C-terminal, restam ainda duas argininas, uma em cada extremidade (item 4.2). As estruturas resultantes, na presença de zinco, tendem a formar folhas-beta (Figura 4.36). Entretanto, o grupo mais representativo não é mantido ao longo de toda a dinâmica, mas dá lugar a outros grupos a partir de aproximadamente 90 ns de simulação (Figura 4.35). Nota-se também que a diferença mais clara entre as conformações dos *clusters* 1, 3 e 4, que predominam no final da simulação é a posição dos terminais em relação à folha-beta (Figura 4.36). Esta característica reflete exatamente o que é observado nos gráficos de RMSF no item 4.2. Nota-se também que o resíduo de asparagina não está localizado na extremidade do grampo-beta formado (Figura 4.36), como ocorre no caso do peptídeo N27mES+ (item 4.7.1, Figura 4.28).

Vale lembrar que neste sistema a coordenação do íon zinco não é mantida por todo o tempo de simulação (item 4.3, Figura 4.14).



4.35 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N25hES+ ao longo de 125 ns.

# N25hES+

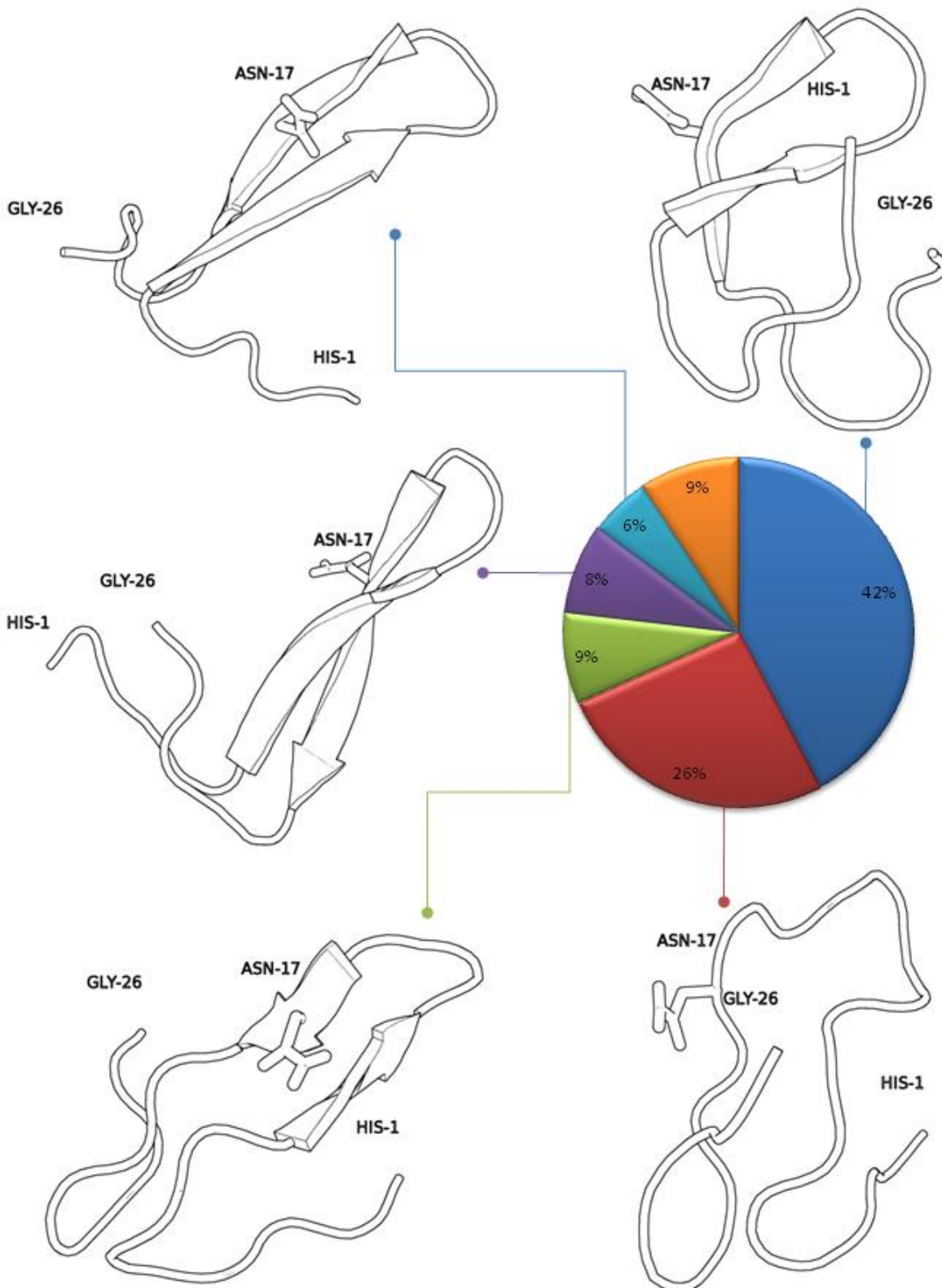


Figura 4.36 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N25hES+.

#### 4.7.6. N27hES+/R4Q

O peptídeo N27hES+/R4Q apresenta o N-terminal da endostatina humana no qual foi inserida uma mutação em que a arginina da quarta posição foi alterada por um resíduo de glutamina. Dessa forma, o N-terminal do peptídeo torna-se livre de argininas e a estabilidade dos terminais aumenta significativamente (item 4.2). Podemos perceber uma tendência a assumir conformações progressivamente mais estáveis, culminando com a estrutura referente ao *cluster* 1, que se mantém estável a partir de aproximadamente 60 ns de simulação (Figura 4.37).

Assim como no item anterior (4.7.5), apesar de ocorrer a formação de folhas-beta na estrutura referente ao *cluster* 1 (Figura 4.38), a posição dessas estruturas na sequência de aminoácidos é ligeiramente distinta daquela referente ao peptídeo N27mES+ (item 4.5). Além disso, assim como ocorre para o sistema N25hES+, também no caso de N27hES+/R4Q observou-se a dissociação do íon zinco do peptídeo durante as simulações de dinâmica molecular (item 4.3, Figura 4.15). Isto sugere que o íon zinco induz a formação de uma folha-beta única, mas a permanência da sua coordenação é necessária à manutenção de uma estrutura específica.

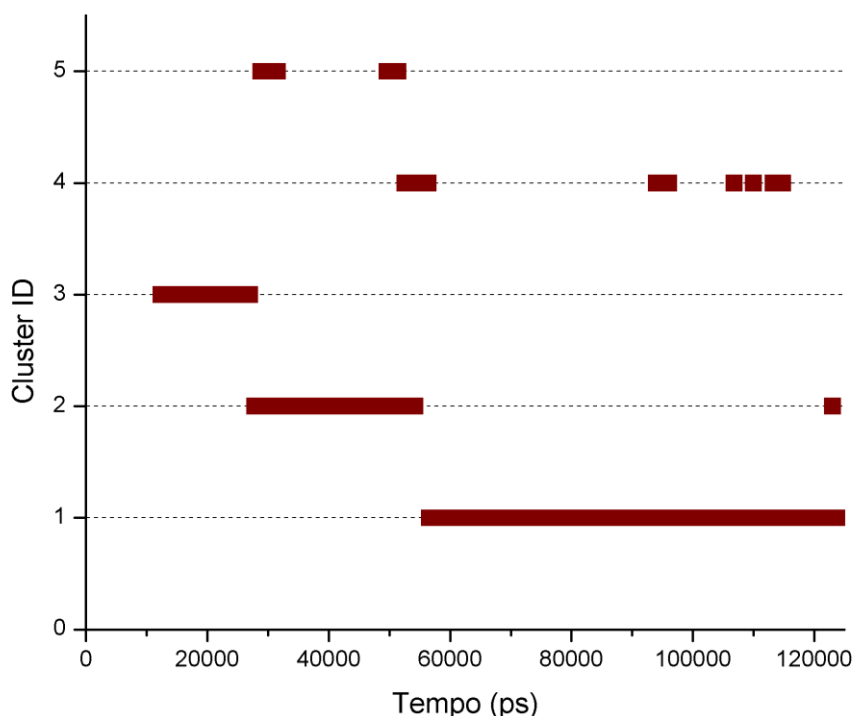


Figura 4.37 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N27mES+/R4Q ao longo de 125 ns.

# N27hES+/R4Q

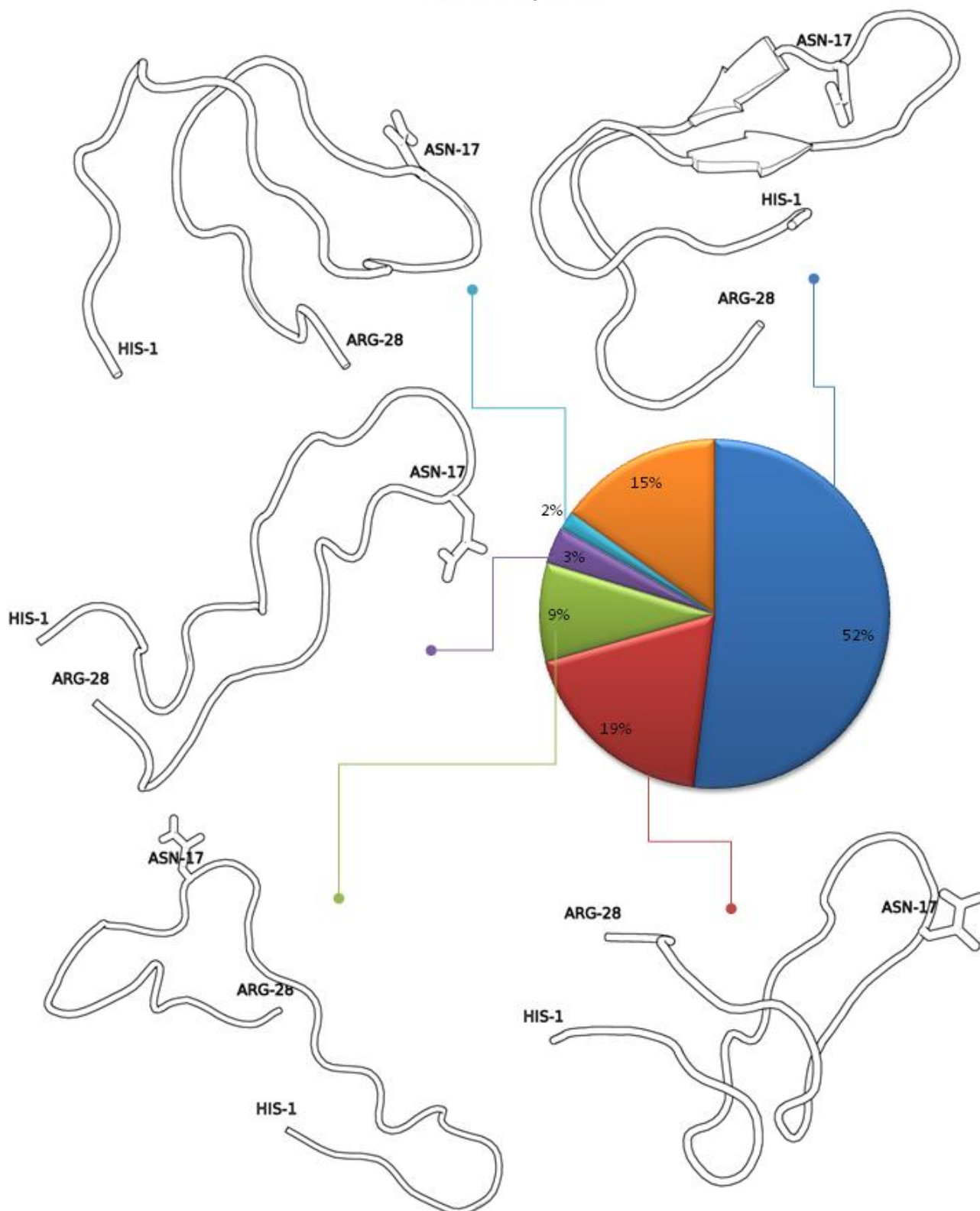


Figura 4.38 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N27hES+/R4Q.

#### 4.7.7. N20mES-

O ensaio do sistema N20mES-, representando um peptídeo murino com apenas 20 resíduos, juntamente com o sistema N18mES-, derivado do peptídeo murino com 18 resíduos, teve como objetivo principal responder a pergunta: qual o menor número de resíduos capaz de manter as características da folha-beta? (item 4.6)

A análise de *clusters* da simulação de N20mES- revelou que 86% dos quadros apresentavam estruturas em folha-beta que foram classificadas em um mesmo grupo de estruturas de 0,3 nm presente ao longo de todo o tempo de simulação (Cluster 1, figura 4.39). Dessa forma, as demais estruturas assumidas representaram apenas 14% do tempo (Figura 4.40).

A estrutura referente ao cluster principal apresentou a conformação de grampo-beta estável mantendo o resíduo de asparagina na extremidade do grampo (Figura 4.40), similar ao observado para o peptídeo murino de 27 aminoácidos (item 4.7.1). É importante notar que mesmo as estruturas minoritárias, ainda que não apresentassem características de folha-beta, mantiveram a dobra da cadeia, com a asparagina 10 (ASN16 na sequência da endostatina íntegra) posicionada no meio do *loop* central da estrutura.

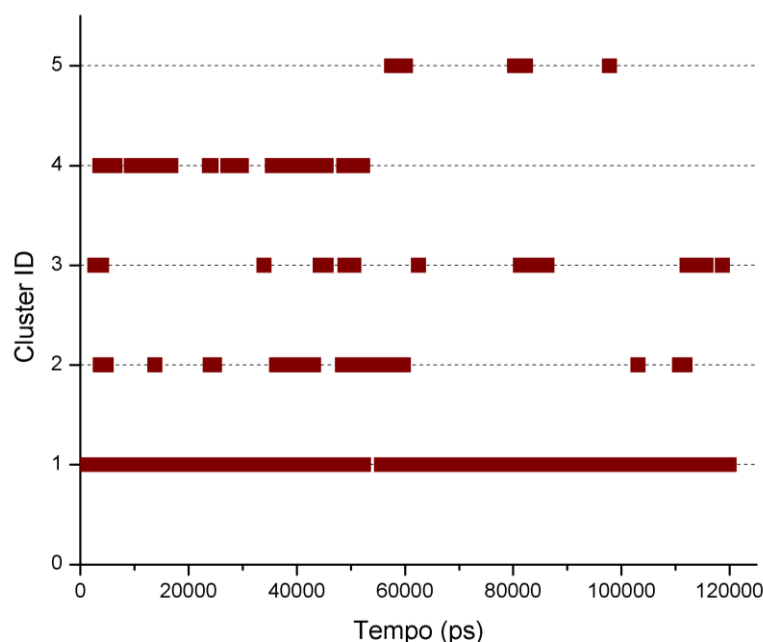


Figura 4.39 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N20mES+ ao longo de 125 ns.

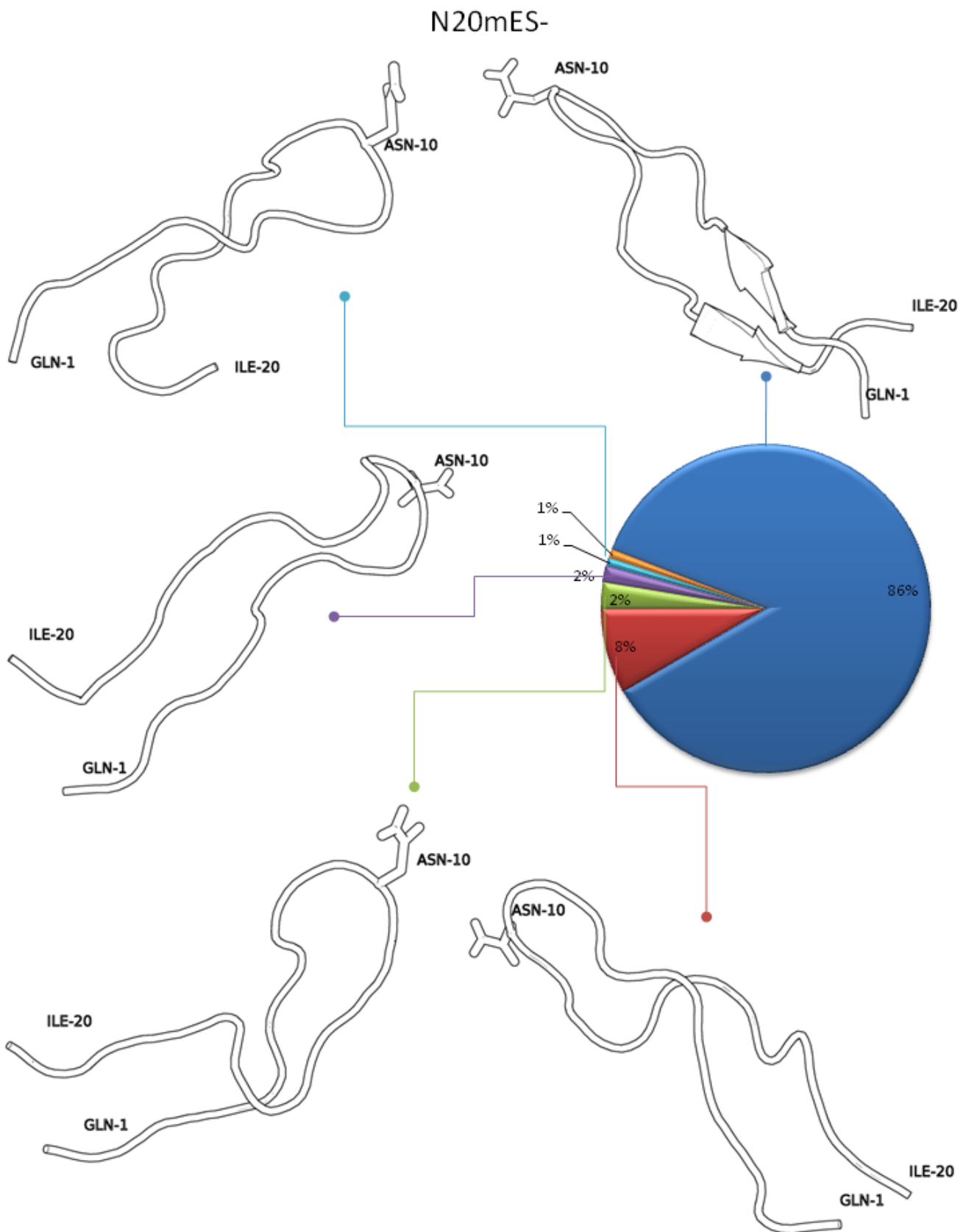
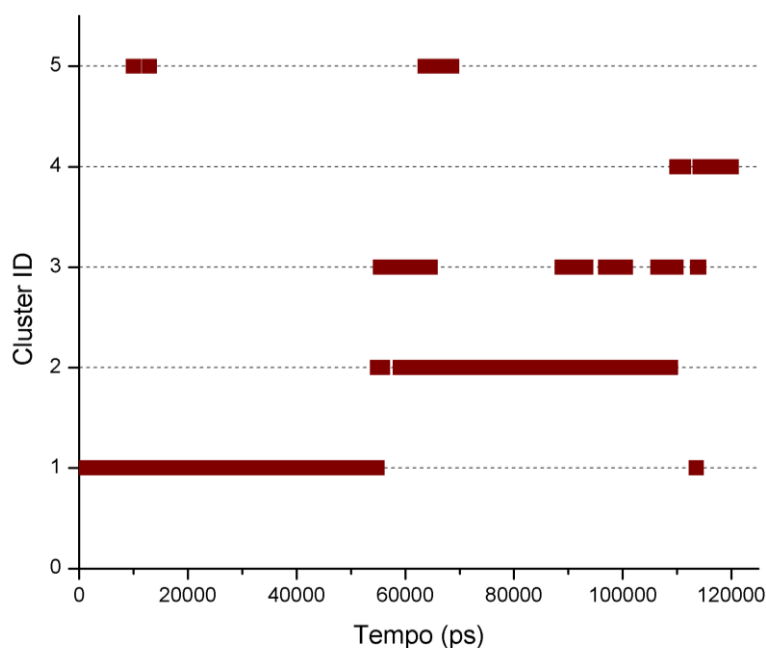


Figura 4.40 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N20mES-.

#### 4.7.8. N18mES-

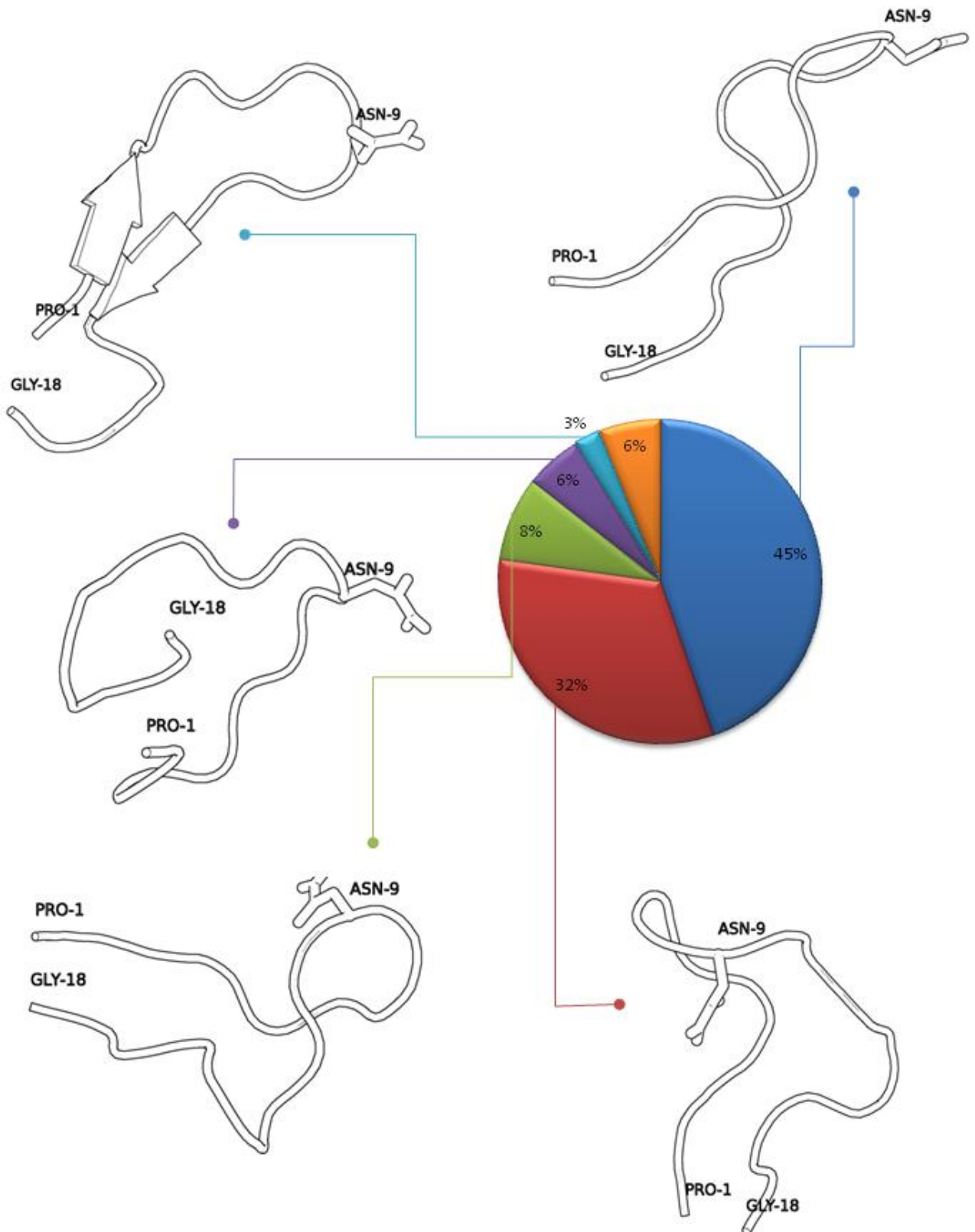
A simulação do peptídeo murino de 18 resíduos mostrou que este não foi capaz de manter a estabilidade do grampo-beta. Pode-se observar que a estrutura média do *cluster* 1 (Figura 4.42, cor azul-escuro), não apresenta uma folha-beta estruturada. Entretanto, a estrutura média do *cluster* 5, que também é observado no início da simulação, apresenta folha-beta. De todos os grupos, é o grupo 5 que possui maior similaridade estrutural com as conformações assumidas pelo N20mEs-, seguido pelo grupo 1.

Aproximadamente a partir de 70 ns de simulação nós pudemos observar uma mudança conformacional grande, a convergência estrutural para o segundo *cluster* e, a partir de então, uma perda progressiva de estrutura e da estabilidade, caracterizada pelo surgimento de *clusters* de estruturas cada vez menores (Figura 4.41). Dessa forma, pode-se perceber que o peptídeo de 18 resíduos não é capaz de manter a estrutura em folha-beta, assim como observado no item 4.6, (Figura 4.26).



4.41 – Distribuição temporal dos 5 clusters mais presentes do sistema N18mES- ao longo de 125 ns.

# N18mES-



4.42 – Estruturas médias dos *clusters* mais representativos do sistema N18hES-.



## 5. Discussão

Neste estudo foram realizadas análises estruturais, utilizando Dinâmica Molecular, de peptídeos correspondentes à porção N-terminal da endostatina, explorando diferenças entre peptídeos derivados da endostatina humana e murina, com o intuito de identificar elementos importantes para a manutenção da sua estabilidade e conseqüentemente, função biológica.

A utilização de algoritmos clássicos de Dinâmica Molecular para avaliar o enovelamento protéico foi escolhida por ser um método relativamente econômico e pelo fato de os fragmentos a serem estudados estarem disponíveis em bancos de dados de estruturas cristalográficas, o que permitia descrever o comportamento a partir da estrutura original.

Diversos outros métodos vêm sendo desenvolvidos para prever estruturas de proteínas e peptídeos. Atualmente, metodologias de predição de estrutura tridimensional por homologia são muito utilizadas e geram resultados satisfatórios. Outra abordagem interessante são métodos estocásticos, cujos algoritmos sorteiam conformações possíveis para uma sequência de aminoácidos e comparam a energia potencial segundo parâmetros pré-definidos aceitando ou refutando a nova conformação gerada.

As simulações de Dinâmica Molecular fornecem dados importantes sobre o comportamento dos sistemas ao longo da simulação, já que incluem informações sobre a trajetória dos átomos além de informações sobre a energia interna, raios de giro, conformações, volume, entre outras. Desse modo, essa metodologia foi escolhida para analisar a estabilidade estrutural dos peptídeos derivados da endostatina.

Em um trabalho anterior, (SJIN *et al.* 2005) verificou-se que peptídeos correspondentes ao N-terminal de endostatina humana (contendo 25 aminoácidos) e murina (contendo 27 aminoácidos), apresentavam atividade antitumoral equivalente a da proteína íntegra. A escolha de diferentes tamanhos para esses peptídeos não foi explicada e, portanto, no presente trabalho optamos por simular peptídeos de 27 resíduos em ambos os casos.

Verificamos que os peptídeos humano e murino se comportam de maneiras distintas. De maneira geral, verificamos que o peptídeo derivado da endostatina murina apresentou forte tendência à formação de folhas-beta e maior estabilidade estrutural, ao contrário do peptídeo derivado da endostatina humana.

Mostramos que, no caso do peptídeo humano, a presença de cargas iguais em ambas as extremidades prejudica a sua estabilidade. Para tal, propusemos de forma inédita uma mutação

eliminando a arginina da extremidade N-terminal. Comparamos também a estabilidade do peptídeo de 25 aminoácidos (N25hES), como utilizado por Sjin em seu estudo funcional (SJIN *et al.*, 2005). Neste caso, a arginina da posição 27 é eliminada enquanto as argininas das posições 4 e 24 são mantidas. Em ambos os peptídeos modificados a tendência de formar folhas-beta foi restaurada. Tanto os valores de RMSF dos resíduos terminais, quanto os valores de média de flutuação dos resíduos, mostraram que a estabilidade do peptídeo de 25 aminoácidos foi intermediária entre o peptídeo mutado, com apenas uma extremidade positiva, e o peptídeo de 27 aminoácidos. Portanto, é possível que a instabilidade causada pela repulsão das extremidades tenha sido o motivo pelo qual Sjin (SJIN *et al.*, 2005) preferiu utilizar o peptídeo humano de 25 resíduos.

Os peptídeos testados, de 27 ou 25 resíduos, possuem os três resíduos de histidina (1, 3 e 11) responsáveis pela coordenação do íon zinco na molécula original. A presença deste íon é crucial para a atividade antiangiogênica dos peptídeos (SJIN *et al.*, 2005) mas sua importância para a função da molécula íntegra de endostatina é controversa (SIM *et al.*, 1999, YAMAGUCHI *et al.*, 1999). Por isso, neste trabalho comparamos o comportamento dos peptídeos derivados de endostatina na presença e ausência de zinco.

Para os peptídeos humano e murino de 27 aminoácidos, a coordenação do íon zinco pelas três histidinas foi mantida ao longo de todo o tempo de simulação. Porém, estes peptídeos apresentaram respostas diferentes quanto à interação com o íon zinco, conforme demonstrado nos gráficos de RMSD (Figura 4.1), *clusters* (Figuras 4.2 e 4.3) e estrutura secundária (Figuras 4.4 e 4.5). O peptídeo derivado da proteína murina alterou seu comportamento de forma drástica ao interagir com o íon zinco. Mostramos que o íon zinco participa da estruturação deste peptídeo de forma bastante acentuada, acarretando a formação de um único grampo-beta. Na ausência do íon, as histidinas tenderam a se afastar, isso permitiu à histidina 11 participar na formação de outro grampo-beta, em outra posição da cadeia peptídica, impedindo a formação do grampo-beta principal. Esta estrutura é representada pelo segundo cluster do sistema N27mES- na ausência de zinco (Figura 4.30, grupo vermelho) e possui certa similaridade estrutural com a estrutura do primeiro cluster do peptídeo derivado da endostatina humana na ausência de zinco.

Sabe-se que o peptídeo N-terminal da endostatina não apresenta atividade antiangiogênica na ausência do íon zinco. Dessa forma, uma vez que a função biológica de uma proteína está intimamente ligada à sua estrutura, podemos supor que a conformação assumida pelo peptídeo murino na ausência de zinco (N27mES-) não é capaz de desempenhar atividade antiangiogênica.

Ao permanecer ligado à estrutura dos fragmentos, o íon zinco provoca uma interferência em suas conformações, criando tensões nos ângulos torcionais da cadeia peptídica que não existiriam na sua ausência. Dessa forma, a presença do íon zinco é responsável por um direcionamento do caminho de enovelamento. Na presença do íon zinco, com exceção do peptídeo humano original, os peptídeos tenderam a assumir conformações progressivamente mais estáveis culminando com a convergência para uma estrutura mais estável em grampo-beta.

Entretanto, descrevemos que, apesar de os peptídeos humanos modificados (N25hES+ e N27hES+/R4Q) assumirem uma estrutura em grampo-beta, a posição dessa estrutura na cadeia é diferente daquela observada no peptídeo murino na presença de zinco (N27mES+). Além disso, também relatamos que a coordenação do íon zinco pelas histidinas 1, 3 e 11 nos sistemas N25hES+ e N27hES+/R4Q não é mantida ao longo dos 125 ns de simulação. Estes resultados sugerem que o íon zinco induz a formação de uma folha-beta única, mas a permanência da sua coordenação é necessária à manutenção de uma estrutura específica.

Acredita-se que pequenos peptídeos não assumam uma estrutura rígida como as grandes proteínas, mas que possuam estruturas preferenciais que sofrem alterações periódicas gerando um equilíbrio conformacional (SARZEDAS *et al.*, 2008). Dessa forma, não foi surpreendente encontrar grande flexibilidade nos peptídeos submetidos às simulações de Dinâmica Molecular. Para provar que a estrutura média do maior *cluster* da dinâmica do peptídeo murino na presença de zinco (N27mES+) é de fato a estrutura preferencial desse fragmento, realizamos uma simulação de Dinâmica Molecular com duração de 1 microssegundo partindo da estrutura estável em grampo-beta, e esta mostrou-se estável durante todo o tempo da simulação.

As análises de distribuição radial de água ao redor do íon zinco mostram que ele possui camadas de solvatação, estando dessa forma em contato com o solvente. Ao acompanhar a dinâmica, pode-se perceber que três moléculas de água participam da coordenação do íon nos sistemas N27mES+ e N27hES+, ao contrário do que ocorre na proteína íntegra onde o íon não entra em contato direto com o solvente (HOHENESTER *et al.*, 2000).

Outro ponto importante a ser discutido é sobre a coordenação do zinco. Nesse estudo a protonação das histidinas foi mantida fixa na mesma posição encontrada no cristal, entretanto, vale ressaltar que a protonação pode ocorrer tanto nos nitrogênios delta quanto nos nitrogênios épsilon, conferindo à cadeia maiores possibilidades conformacionais. Estudos apontam que a endostatina pode ser internalizada a partir da interação com nucleolina e integrina  $\alpha_5$  e transportada até o núcleo onde, posteriormente, são encontrados produtos de degradação da endostatina (SHI *et al.*, 2008). O núcleo

das células animais possui características singulares, distintas do ambiente extracelular ou mesmo do citoplasma como, por exemplo, pH (SEKSEK & BOLARD, 1996), o que pode acarretar diferenças estruturais.

A análise comparativa realizada com a estrutura assumida pelo peptídeo murino N27mES+ (Figura 4.28, grupo azul) com a estrutura terciária da cadeia  $\alpha_1$  do fragmento globular do colágeno IV (RYAN *et al.*, 1998), o arresteno, mostrou similaridade conformacional entre elas (Figura 4.23). Ambas as estruturas apresentam uma folha-beta e uma dobra. Além disso, existem 4 aminoácidos em posições equidistantes em ambas as sequências. Desses aminoácidos conservados, as asparaginas encontram-se em posição apical e poderiam exercer contato com algum receptor biológico. De fato, a tumstatina, que é uma proteína antiangiogênica derivada da cadeia  $\alpha_3$  do colágeno IV, análoga ao arresteno, desempenha seu efeito biológico através de uma folha-beta similar. (MAESHIMA *et al.*, 2001; EIKESDAL *et al.*, 2008). Mostramos também que esta conformação em grampo-beta assumida pelo peptídeo murino, uma vez estabelecida, pode ser mantida por um mínimo de 20 resíduos (item 4.6). Contudo, uma vez que este peptídeo não possui um motivo de ligação ao íon zinco, necessário para induzir a formação da folha-beta, outras modificações, como a síntese de um peptídeo em forma cíclica, poderiam facilitar a formação deste motivo estrutural.

Outra proteína antiangiogênica relatada na literatura é a canstatina (KAMPHAUS *et al.*, 2000). Essa proteína corresponde ao fragmento globular da cadeia  $\alpha_2$  do colágeno IV e também apresenta uma folha-beta similar. Entretanto, nem a tumstatina nem a canstatina apresentam o aminoácido asparagina na extremidade da dobra, apesar de apresentarem os aminoácidos prolina e leucina formando a base da folha-beta.

Para melhor elucidar os mecanismos de ação da endostatina ainda é necessário responder a uma série de perguntas. Alguns de seus receptores como o heparan-sulfato (SASAKI *et al.*, 1999; RICARD-BLUM *et al.*, 2004), a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (WICKSTRÖM, ALITALO & KESKI-OJA, 2002) e nucleolina (SHI *et al.*, 2008) já foram identificados, assim como alguns mecanismos de ação como alterações no citoesqueleto (DIXELIUS *et al.*, 2002), apoptose pela via mitocondrial (YUAN *et al.*, 2008) e ligação à pro-MMP2 (KIM *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002). Entretanto são necessários mais estudos sobre interação das variadas formas biologicamente ativas da endostatina com proteínas celulares. Um estudo desse tipo lançaria luz sobre todos os possíveis receptores celulares da endostatina e abriria portas para outros estudos *in silico* como, por exemplo, estudos de ancoramento molecular.

## 6. Conclusões

Esse estudo mostrou que o peptídeo de 27 aminoácidos derivado da porção N-terminal da endostatina murina, na presença do íon zinco, assume uma estrutura que tende a estabilizar-se com o decorrer das simulações, apresentando uma conformação em grampo-beta que, possivelmente, relaciona-se com sua função biológica.

Já o peptídeo de 27 aminoácidos correspondente ao N-terminal da endostatina humana apresenta instabilidade devido à repulsão eletrostática interna exercida por argininas terminais. Ensaios utilizando uma forma mutante, que elimina uma arginina terminal (R4Q), poderiam superar esta questão.

Nós sugerimos que um peptídeo de apenas 20 aminoácidos seria teoricamente capaz de manter a estrutura de grampo-beta associada à função biológica, entretanto, a presença do zinco mostrou-se necessária à formação desta estrutura. A utilização de fragmentos ainda menores da endostatina, facilitaria o processo de síntese, reduzindo os custos produção de um possível fármaco peptideomimético.

É necessário prosseguir com a investigação estrutural, incluindo outras técnicas, como ressonância magnética e dicroísmo circular, pois essa busca tem como meta ulterior identificar motivos ou conformações com propriedades antiangiogênicas intrínsecas, que poderão então ser sintetizados e utilizados com fins terapêuticos.

## 7. Referências Bibliográficas

- ABDOLLAHI, A.; HANFELDT, P.; MAERCKER, C.; GRÖNE, H.; DEBUS, J.; ANSORGE, W.; FOLKMAN, J.; HLATKY, L. & HUBER, P. E. **Endostatin's Antiangiogenic Signaling Network** *Mol. Cel.*, 13, 649-663, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell** Garland Science, U. S. A., 2008
- ALLEN M. P. & TILDESLEY D. J. **Computer Simulations Of Liquids** Clarendon Press, Oxford, 1987.
- ANGIOLILLO, A. L.; SGADARI, C.; TAUB, D. D.; LIAO, F.; FARBER, J. M.; MAHESHWARI, S.; KLEINMAN, H. K.; REAMAN, G. H. & TOSATO, G. **Human Interferon-Inducible Protein 10 Is A Potent Inhibitor Of Angiogenesis In Vivo** *J. Exp. Med.*, 182(1), 155-162, 1995.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A. & HAAK J. R., **Molecular Dynamics With Coupling To An External Bath** *J. Chem. Phys.*, 3684-3690, 1984.
- BOEHM, T.; FOLKMAN, J.; BROWDER, T. & O'REILLY, M. S. **Antiangiogenic Therapy Of Experimental Cancer Does Not Induce Acquired Drug Resistance** *Nature*, 390(6658), 404-407, 1997.
- CAO, Y.; CHEN, C.; WEATHERBEE, J. A.; TSANG, M. & FOLKMAN, J. **Gro-Beta, A -C-X-C- Chemokine, Is An Angiogenesis Inhibitor That Suppresses The Growth Of Lewis Lung Carcinoma In Mice** *J. Exp. Med.*, 182(6), 2069-77, 1995.
- CATTANEO, M. G.; POLA, S.; FRANCESCATO, P. E.; CHILLEMI, F. & VICENTINI, L. M. **Human Endostatin-Derived Synthetic Peptides Posses Potent Antiangiogenic Properties In Vitro And In Vivo** *Exp. Cel. Res.*, 283, 230-236, 2003.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. **Dissemination And Growth Of Cancer Cells In Metastatic Sites** *Nat. Rev.*, 2, 563-573, 2002.
- CHEN, C.; PARANGI, S.; TOLENTINO, M. J. & FOLKMAN, J. **A Strategy To Discover Circulating Angiogenesis Inhibitors Generated By Human Tumors** *Cancer Res.*, 55(19), 4230-4233, 1995.
- CLAPP, C.; MARTIAL, J. A.; GUZMAN, R. C.; RENTIER-DELURE, F.; & WEINER, R. I. **The 16-Kilodalton N-Terminal Fragment Of Human Prolactin Is A Potent Inhibitor Of Angiogenesis.** *Endocrinology*, 133(3), 1292-1299, 1993.
- COLORADO, P. C.; TORRE, A.; KAMPHAUS, G.; MAESHIMA, Y.; HOPFER, H.; TAKAHASHI, K.; VOLK, R.; ZAMBORSKY, E. D.; HERMAN, S.; SARKAR, P. K.; ERICKSEN, M. B.; DHANABAL, M.; SIMONS, M.; POST, M.; KUFEL, D. W.; WEICHELBAUM, R. R.; SUKHATME, P. V. and KALLURI, R. **Anti-angiogenic Cues from Vascular Basement Membrane Collagen** *Cancer Res.* 60, 2520-2526, 2000.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System** DeLano Scientific, San Carlos, CA, U. S. A. <http://www.pymol.org>, 2002.
- DIXELIUS, J.; LARRSON, H.; SASAKI, T.; HOLMQVIST, K.; LU, L.; ENGSTROM, A.; TIMPL, R.; WELSH, M. & CLAEISSON-WELSH, L. **Endostatin-Induced Tyrosine Kinase Signaling Through The Shb Adaptor Protein Regulates Endothelial Cell Apoptosis** *Blood*, 95, 3403-3411, 2000.
- DING, Y. H.; JAVAHERIAN, K.; LO, K. M.; CHOPRA, R.; BOEHM, T.; LANCIOTTI, J.; HARRIS, B. A.; LI, Y.; SHAPIRO, R.; HOHENESTER, E.; TIMPL, R.; FOLKMAN, J. & WILEY, D. C. **Zinc-Dependent Dimers Observed In Crystals Of Human Endostatin** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(18), 10443-10448, 1998.
- DISTLER, J. W.; HIRTH, A.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; GAY, R. E.; GAY, S. & DISTLER, O. **Angiogenic And Angiostatic Factors In The Molecular Control Of Angiogenesis** *Q. J. Nucl. Med.*, 47, 149-161, 2003.
- DIXELIUS, J.; CROSS, M.; MATSUMOTO, T.; SASAKI, T.; TIMPL, R. & CLAEISSON-WELSH, L. **Endostatin Regulates Endothelial Cell Adhesin And Cytoskeletal Organization** *Cancer Res.*, 62, 1944-1947, 2002.

EDER, J. P. JR.; SUPKO, J. G.; CLARK, J. W.; PUCHALSKI, T. A.; GARCIA-CARBONERO, R.; RYAN, D. P.; SHULMAN, L. N.; PROPER, J.; KIRVAN, M.; RATTNER, B.; CONNORS, S.; KEOGAN, M. T.; JANICEK, M. J.; FOGLER, W. E.; SCHNIPPER, L.; KINCHLA, N.; SIDOR, C.; PHILLIPS, E.; FOLKMAN, J. & KUFEL, D. W. **Phase I Clinical Trial Of Recombinant Human Endostatin Administered As A Short Intravenous Infusion Repeated Daily** J. Clin. Oncol., 20(18), 3772-3784, 2002.

EIKESDAL, H. P.; SUGIMOTO, H.; BIRRHANE, G.; MAESHIMA, Y.; COOKE, V. G.; KIERAN, M.; KALLURI, R. **Identification Of Amino Acids Essential For The Antiangiogenic Activity Of Tumstatin And Its Use In Combination Antitumor Activity** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105(39), 15040-15045, 2008.

ENGERMAN, R. L.; PFAFFENBACH, D. & DAVIS, M. D. **Cell Turn Over of Capillaries** Lab. Invest., 17, 738-743, 1967.

ERGUN, S.; KILIC, N.; WURMBACH, J. H.; EBRAHIMNEJAD, A.; FERNANDO, M.; SEVINC, S.; KILIC, E.; CHALAJOUR, F.; FIEDLER, W.; LAUKE, H.; LAMSZUS, K.; HAMMERER, P.; WEIL, J.; HERBST, H. & FOLKMAN, J. **Endostatin Inhibits Angiogenesis By Stabilization Of Newly Formed Endothelial Tubes** Angiogenesis, 4(3), 193-206, 2001.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P. & PARKIN, D. M. **GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality And Prevalence Worldwide** IARC CancerBase No. 5, version 2.0., Lyon: IARC Press 2004.

FERRERAS, M.; FELBOR, U.; LENHARD, T.; OLSEN, B. R. & DELAISSÉ, J. **Generation And Degradation Of Human Endostatin Proteins By Various Proteinases** FEBS Letters, 486, 274-251, 2000.

FOLKMAN, J. & SHING, Y. **Angiogenesis** J. Biol. Chem., 267(16), 10931-10934, 1992.

FOLKMAN, J. & TAYLOR, S. **Protamine Is An Inhibitor Of Angiogenesis** Nature, 297(5864), 307-312, 1982.

FOLKMAN, J. **Angiogenesis In Cancer Therapy - Endostatin And Its Mechanisms Of Action** – Ex. Cell Res., 312, 594, 2006.

FOLKMAN, J. **Antiangiogenesis In Cancer Therapy-Endostatin And Its Mechanisms Of Actions** Exp. Cell Res., 312(5), 594-607, 2005.

FOLKMAN, J. **Fighting Cancer by Attacking Its Blood Supply** Scientific American, 116-9, 1996.

FOLKMAN, J. **Successful Treatment Of An Angiogenic Disease** N. Engl. J. Med., 320(18), 1211-1212, 1989.

FRANCESCATO, P.; CHILLEMI, F.; RAG, E.; CATTANEO, M. G.; POLA, S. & VICENTINI, L. **Studies On The Structure-Activity Relationship Of Endostatin: Synthesis Of Human Endostatin Peptides Exhibiting Potent Antiangiogenic Activities** J. Med. Chem., 46, 4165-4172, 2003.

GOOD, D. J.; POLVERINI, P. J.; RASTINEJAD, F.; LE BEAU, M. M.; LEMONS, R. S.; FRAZIER, W. A. & BOUCK, N. P. **A Tumor Suppressor-Dependent Inhibitor Of Angiogenesis Is Immunologically And Functionally Indistinguishable From A Fragment Of Thrombospondin** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87(17), 6624-6628, 1990.

GUPTA, S. K.; HASSEL, T. & SINGH, J. P. **A Potent Inhibitor Of Endothelial Cell Proliferation Is Generated By Proteolytic Cleavage Of The Chemokine Platelet Factor 4** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92(17), 7799-7803, 1995.

HAN, Q.; FU, Y.; ZHOU, H.; HE, Y. & LUO, Y. **Contributions Of Zn(II)-Binding To The Structural Stability Of Endostatin** FEBS Letters, 581, 3027-3032, 2007.

HANAHAHAN, D. & FOLKMAN, J. **Patterns And Emerging Mechanisms Of The Angiogenic Switch During Tumorigenesis** Cell, 86, 353-364, 1996.

HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. **The Hallmarks Of Cancer** Cell, 100, 57-70, 2000.

HERBST, R. S.; MULLANI, N. A.; DAVIS, D. W.; HESS, K. R.; MCCONKEY, D. J.; CHARNSANGAVEJ, C.; O'REILLY, M. S.; KIM, H. W.; BAKER, C.; ROACH, J.; ELLIS, L. M.; RASHID, A.; PLUDA, J.; BUCANA, C.; MADDEN, T. L.; TRAN, H. T. & ABBRUZZESE, J. L. **Development Of Biologic Markers Of Response And**

**Assessment Of Antiangiogenic Activity In A Clinical Trial Of Human Recombinant Endostatin** J. Clin. Oncol., 20(18), 3804-14, 2002.

HOBSON, B. & DENEKAMP, J. **Endothelial Proliferation In Tumors And Normal Tissues: Continuous Labeling Studies** Br. J. Cancer, 49, 405-413, 1984.

HOHENESTER, E.; SASAKI, T.; MANN, K. & TIMPL, R. **Variable Zinc Coordination in Endostatin** J. Mol. Biol., 297, 1-6, 2000.

HORI, A.; SASADA, R.; MATSUTANE, E.; NAITO, K.; SAKURA, Y.; FUJITA, T. & KOSAI, Y. **Suppression Of Solid Tumor Growth By Immunoneutralizing Monoclonal Antibody Against Human Basic Fibroblast Growth Factor** Cancer. Res., 51(22), 6180-6184, 1991.

HUANG, X.; WONG, M. K. K.; ZHAO, Q.; ZHU, Z.; WANG, K. Z. Q.; HUANG, N.; YE, C.; GORELIK, E. & LI, M. **Soluble Recombinant Endostatin Purified From *Escherichia coli*: Antiangiogenic Activity And Tumor Effect** Cancer Res., 61, 478-481, 2001.

JACKSON J. D. **Eletrodinâmica Clássica**, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1983.

KAMPHAUS, G. D.; COLORADO, P. C.; PANKA, D. J.; HOPFER, H.; RAMCHANDRAN, R.; TORRE, A.; MAESHIMA, Y.; MIER, J. W.; SUKHATME, V. P. & KALLURI, R. **Canstatin, A Novel Matrix-Derived Inhibitor Of Angiogenesis And Tumor Growth** J. Biol. Chem., 275(2), 1209-1215, 2000.

KANDEL, J.; BOSSY-WETZEL, E.; RADVANYI, F.; KLAGSBRUN, M.; FOLKMAN, J. & HANAHAN, D. **Neovascularization Is Associated With A Switch To The Export Of Bfgf In The Multistep Development Of Fibrosarcoma** Cell 66(6), 1095-1104, 1991.

KIM, Y. M.; JANG, J. W.; LEE, O. H.; YEON, J.; CHOI, E. Y.; KIM, K. W.; LEE, S. T. & KWON, Y. G. **Endostatin Inhibits Endothelial And Tumor Cellular Invasion By Blocking The Activation And Catalytic Activity Of Matrix Metalloproteinase** Cancer Res. 60(19), 5410-5413, 2000.

KISKER, O.; BECKER, C. M.; PROX, D.; FANNON, M.; D'AMATO, R.; FLYNN, E.; FOGLER, W. E., SIM, B. K. L.; ALLRED, E. N.; PIRIE-SHEPHERD, S. R. & FOLKMAN, J. **Continuous Administration Of Endostatin By Intraperitoneally Implanted Osmotic Pump Improves The Efficacy And Potency of Therapy In A Mouse Xenograft Tumor Model** Cancer Res., 61, 7669-7674, 2001.

KUO, C. J.; LAMONTAGNE, K. R.; JR.; GARCIA-CARDENA, G.; ACKLEY, B. D.; KALMAN, D.; PARK, S.; CHRISTOFFERSON, R.; KAMIHARA, J.; DING, Y. H.; LO, K. M.; GILLIES, S.; FOLKMAN, J.; MULLIGAN, R. C. & JAVAHERIAN, K. **Oligomerization-Dependent Regulation Of Motility And Morphogenesis By The Collagen XVIII NC1/Endostatin Domain** J. Cell. Biol., 152(6), 1233-1246, 2001.

LEE, S.; JANG, J.; KIM, Y.; LEE, H. I.; JEON, J. Y.; KWON, Y. & LEE, S. **Endostatin Binds To The Catalytic Domain Of Matrix Metalloproteinase-2** FEBS Letters, 519, 147-152, 2002.

LIMAVERDE, G. S. C. S. **Importância Do Íon  $Zn^{2+}$  Para A Estabilidade E Especificidade Da Proteína Antiangiogênica Endostatina** Tese de Mestrado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2005.

LINDAHL, P.; JOHANSON, B. R.; LEVÉEN, P. & BETSHOLTZ, C. **Pericyte Loss And Microaneurysm Formation In PDGF-B-Deficient Mice** Science, 277 (5323), 242-245, 1997.

LIU, D. L.; WEN, J. X.; TONG, W. C.; & BEN, L. H. **Inhibition Of Lung Adenocarcinoma LA795 In Mice By Recombinant Human Endostatin** Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 21(12), 917-919, 2001.

MAESHIMA, Y.; YERRAMALA, U. L.; DHANABAL, M.; HOLTHAUS, K. A.; BARBASHOV, S.; KHARBANDA, S.; REIMER, C.; MANFREDI, M.; DICKERSON, W. M. & KALLURI, R. **Extracellular Matrix-Derived Peptide Binds To  $\alpha_v\beta_3$  Integrin And Inhibits Angiogenesis** J. Biol. Chem., 276(34), 31959-31968, 2001.



MAIONE, T. E.; GRAY, G. S.; PETRO, J.; HUNT, A. J.; DONNER, A. L.; BAUER, S. I.; CARSON, H. F. & SHARPE, R. J. **Inhibition Of Angiogenesis By Recombinant Human Platelet Factor-4 And Related Peptides** Science, 247(4938), 77-79, 1990.

MARSHALL, E. **Setbacks For Endostatin**, Sci. Cancer Res., 295, 2198–2199, 2002.

MILLAUER, B.; SHAWVER, L. K.; PLATE, K. H.; RISAU, W. & ULLRICH, A. **Glioblastoma Growth Inhibited In Vivo By A Dominant-Negative Flk-1 Mutant** Nature, 367(6463), 576-579, 1994.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; CHILLEMI, F.; GIACHETTI, A. & ZICHE, M. **Angiossuppressive And Angiostimulatory Effects Exerted By Synthetic Partial Sequences Of Endostatin** Clin. Cancer Res., 9, 5358-5369, 2003.

OH, S. P.; KAMAGATA, Y.; MURAGAKI, Y.; TIMMONS, S.; OOSHIMA, A. & OLSEN, B. R. **Isolation And Sequencing Of Cdnas For Proteins With Multiple Domains Of Gly-Xaa-Yaa Repeats Identify A Distinct Family Of Collagenous Proteins** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91(10), 4229-4233, 1994.

O'REILLY, M. S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y.; CHEN, C.; ROSENTHAL, R. A.; CAO, Y.; MOSES, M.; LANE, W. S.; SAGE, E. H. & FOLKMAN, J. **Angiostatin: A Circulating Endothelial Cell Inhibitor That Suppresses Angiogenesis And Tumor Growth** Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol., 59, 471-482, 1994. (a)

O'REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. **Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth** Cell Press, 88, 277-285, 1997.

O'REILLY, M. S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y.; CHEN, C.; ROSENTHAL, R.A.; MOSES, M.; LANE, W.S.; CAO, Y.; SAGE, E.H. & FOLKMAN, J. **Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates The Suppression Of Metastases By A Lewis Lung Carcinoma Cell**, 79(2), 315-328, 1994. (b)

PARANGI, S.; O'REILLY, M. S.; CHRISTOFORI, G.; HOLMGREN, L.; GROSFELD, J.; FOLKMAN, J. & AND HANAHAN, D. **Antiangiogenic Therapy Of Transgenic Mice Impairs De Novo Tumors Growth** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 2002-2007, 1996.

PASCUTTI, P. G. **Introdução À Modelagem E Dinâmica Molecular** <http://www.bioinfo.ufrj.br/biomod/DinamicaMolecular.PDF>, 2002

PEETERS, C. F.; DE GEUS, L. F.; WESTPHAL, J. R.; DE WAAL, R. M.; RUITER, D. J.; WOBBER, T.; OYEN, W. J. & RUERS, T. J. **Decrease In Circulating Anti-Angiogenic Factors (Angiostatin And Endostatin) After Surgical Removal Of Primary Colorectal Carcinoma Coincides With Increased Metabolic Activity Of Liver Metastases** Surgery, 137(2), 246-249, 2005.

RASTINEJAD, F., POLVERINI, P. J., & BOUCK, N. P. **Regulation Of The Activity Of A New Inhibitor Of Angiogenesis By A Cancer Suppressor Gene** Cell, 56(3), 345-355, 1989.

REHN, M., & PIHLAJANIEMI, T. **Alpha 1(XVIII), A Collagen Chain With Frequent Interruptions In The Collagenous Sequence, A Distinct Tissue Distribution, And Homology With Type XV Collagen** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91(10), 4234-4238, 1994.

REITZ J. R.; MILFORD F. J. & CHRISTY R. W. **Fundamentos Da Teoria Eletromagnética**, Editora Campus Lt., Rio de Janeiro, 1982.

RELF, M.; LEJEUNE, S.; SCOTT, P. A.; FOX, S.; SMITH, K.; LEEK, R.; MOGHADDAM, A.; WHITEHOUSE, R.; BICKNELL, R.; HARRIS, A. L. **Expression Of The Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic And Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor B1 Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, And Pleiotrophin In Human Primary Breast Cancer And Its Relation To Angiogenesis** Cancer Res., 57(5), 963–969, 1997.

RICARD-BLUM, S.; FERAUD, O.; LORTAT-JACOB, H.; RENCUROSÌ, A.; FUKAI, N.; DKHISSI, F.; VITTET, D.; IMBERTY, A.; OLSEN, B. R. & VAN DER REST, M. **Characterization Of Endostatin Binding To Heparin And Heparan Sulfate By Surface Plasmon Resonance And Molecular Modeling: Role Of Divalent Cations** J. Biol.

Chem., 279(4), 2927-36, 2004.

RYAN, J. J.; KATBAMNA, I.; MASON, P. J.; PUSEY, C. D. & TURNER A. N. **Sequence Analysis Of The "Goodpasture Antigen" Of Mammals** Nephrol. Dial. Transplant., 13, 602-607, 1998.

SARZEDAS, C. G.; LIMA, C. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VALENTE, A. P.; POIAN, A. T. & ALMEIDA, F. C. L. **A Minor  $\beta$ -Structured Conformation Is The Active State Of A Fusion Peptide Of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein** J. Pept. Sci., 14, 429-435, 2008.

SASAKI, T.; LARSSON, H.; KREUGER, J.; SALMIVIRTA, M.; CLAESSION-WELSH, L.; LINDAHL, U.; HOHENESTER, E.; & TIMPL, R. **Structural Basis And Potential Role Of Heparin/Heparan Sulfate Binding To The Angiogenesis Inhibitor Endostatin**. EMBO J., 18(22), 6240-8, 1999.

SEKSEK, O. & BOLARD, J. **Nuclear pH Gradient In Mammalian Cells Revealed By Laser Microspectrofluorimetry** J. Cel. Sci., 109, 257-262, 1996.

SHI, H.; HUANG, Y.; ZHOU, H.; SONG, X.; YUAN, S.; FU, Y. & LUO, Y. **Nucleolin Is A Receptor That Mediates Antiangiogenic and Antitumor Activity Of Endostatin** Blood, 110(8), 2899-2906, 2008.

SILVA, A. W. S. **Estudo Por Modelagem E Dinâmica Molecular Da Protease De Variantes Do Vírus Da Imunodeficiência Humana Tipo 1 Resistentes A Drogas Antivirais** Tese de Doutorado – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2003.

SIM, B. K.; FOGLER, W. E.; ZHOU, X. H.; LIANG H.; MADSEN, J. W.; LUU, K.; O'REILLY, M. S.; TOMASZEWSKI, J. E. & FORTIER, A. H. **Zinc Ligand-Disrupted Recombinant Human Endostatin: Potent Inhibition Of Tumor Growth, Safety And Pharmacokinetic Profile**, Angiogenesis, 3, 41– 51, 1999.

SJIN, R. M. T. T.; STACHI-FAINARO, R.; BIRSNER, A. E.; RAMANUJAM, V. M. S.; FOLKMAN, J. & JAVAHERIAN, K. **A 27-Amino-Acid Synthetic Peptide Corresponding To The NH<sub>2</sub>-Terminal Zinc-Binding Domain Of Endostatin Is Responsible For Its Antitumor Activity** Cancer Res., 65(9), 3656-3653, 2005.

SMELTZER, S. C. & BARE, B. G. **Brunner & Suddarth Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica** 251-301, Rio de janeiro, Ganabara Koogan, 2002

STAVROVSKAYA, A. A & STROMSKAYA, T. P. **Transport Of The ABC Family And Multidrug Resistance Of Tumor Cells** Biochemistry (Moscow), 73(5), 592-604, 2008.

STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; ARENBERG, D. A.; BURDICK, M. D.; & POLVERINI, P. J. **Interferon Gamma-Inducible Protein 10 (IP-10), A Member Of The C-X-C Chemokine Family, Is An Inhibitor Of Angiogenesis** Biochem. Biophys. Res. Commun., 210(1), 51-57, 1995.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E. & BRENDSEN, H. J. C. **GROMACS: Fast, Flexible And Free** J. Comp. Chem., 26(16), 1701-1718, 2005.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; FEENSTRA, K. A.; VAN DRUNEN, R. & BERENDSEN, H. J. C. **Gromacs User Manual Version 3.2**, www.gromacs.org, 2004.

VAN DER SPOEL, D.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A. L. T. M.; HESS, B.; FEENTRA, K. A.; LINDAHL, E. & VAN DRUNEN, R. **Gromacs User Manual Version 3.0**, Groningen, 2001.

VAN GUNSTEREN, W. F. & BERENDSEN, H. J. C. **Computer Simulation Of Molecular Dynamics: Metodology, Applications And Pespectives In Chemistry** Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 992-1023, 1990.

VAN GUNSTEREN, W. F. & BERENDSEN, H. J. C. **Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual** Biomos, Groningen, 1987.

VERLET, L. **Computer 'Experiments' On Classical Fluids I. Thermodynamical Properties Of Lennard-Jones Molecules** Phys. Rev., 159, 98-103, 1967.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer** Artmed Ed. S.A., São Paulo, SP, Brasil, 2007.

WICKSTRÖM, S. A., ALITALO, K. & KESKI-OJA, J. **Endostatin Associates With Integrin  $\alpha_5\beta_1$  And Caveolin-1, And Activates Src Via A Tyrosyl Phosphatase-Dependent Pathway In Human Endothelial Cells** Cancer Res., 62, 5580-5589, 2002.

WICKSTRÖM, S. A.; ALITALO, K. & KESKI-OJA, J. **An Endostatin-Derived Peptide Interacts With Integrins And Regulates Actin Cytoskeleton And Migration Of Endothelial Cells** J. Biol. Chem., 279(19), 20178-20185, 2004.

XIA, H., ZHANG, L., WEN, J. X., & TONG, W. C. **Expression And Purification Of Human Endostatin In Pichia Pastoris And Its Inhibition On The Growth Of Mouse Pulmonary Adenocarcinoma Cell Line LA795.** Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 22(5), 393-396, 2002.

YAMAGUCHI, N., ANAND-APTE, B., LEE, M., SASAKI, T., FUKAI, N., SHAPIRO, R., QUE, I., LOWIK, C., TIMPL, R., E OLSEN, B. R. **Endostatin Inhibits VEGF-Induced Endothelial Cell Migration And Tumor Growth Independently Of Zinc Binding** EMBO J. 18(16), 4414-4423, 1999.

YUAN, S.; FU, Y.; WANG, X.; SHI, H.; HUAN, Y.; SONG, X.; LI, L.; SONG, N. & LUO, Y. **Voltage Dependent Anion Channel 1 Is Involved In Endostatin-Induced Endothelial Cell Apoptosis** FASEB J., 22, 2809-2820, 2008.

ZHANG, L.; LUO, L. M.; XIA, H.; ZHUANG, L. Q.; TONG, W. C.; & WEN, J. X. **Inhibitory Effects Of Endostatin On Interleukin-6 And Interleukin-8 Release By Human Umbilical Vein Endothelial Cells** Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 22(1), 54-56, 2002.

ZHOU, H.; WANG, W. & LUO, Y. **Contributions Of Disulfide Bonds in A Nested Pattern To The Structure, Stability And Biological Functions Of Endostatin** J. Biol. Chem., 280(12), 11303-11312, 2005.

## 8. Anexo: Arquivos de parâmetros

Abaixo seguem alguns arquivos de parâmetros (.mdp) utilizados nas otimizações de energia e dinâmicas moleculares. Para cada etapa descrita no item 3.3 foi empregado um arquivo “mdp” diferente. As etapas são: otimização de geometria utilizando o algoritmo de máximo declive com restrição de posições, otimização de geometria utilizando o algoritmo de máximo declive sem restrição de posições, otimização de geometria utilizando o algoritmo de gradientes conjugados, dinâmica molecular com restrição de posições e dinâmicas moleculares sem restrição de posições. Será apresentado apenas um “mdp” de cada tipo mencionado.

### 8.1. Máximo Declive com Restrição de Posições

```
; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title          = prsd
; Preprocessor - specify a full path if necessary.
cpp            = /lib/cpp
include        =
define         = -DPOSRES -DFLEXIBLE

;-----

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator     = steep
; Start time and timestep in ps
tinit         = 0
dt             = 0.002 ( dt x nsteps / 1000 = ns )
nsteps        = 5000000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step     = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode     = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm       = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps    =

;-----

; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
; Force tolerance and initial step-size
emtol         = 42.0
emstep        = 0.01
; Max number of iterations in relax_shells
niter         = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep        = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep    = 1000
nbgfscorr     = 10

;-----

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
```

```

nstxout          = 100000
nstvout          = 100000
nstfout         = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint   = 1000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog          = 1000
nstenergy       = 50
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout       = 20000
xtc-precision   = 10000
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps        =
; Selection of energy groups
energygrps      = Protein Non-Protein

;-----
; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nblast          = 5
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type         = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc             = xyz
; nblast cut-off
rlist           = 1.0
domain-decomposition = no

;-----
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype     = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb        = 1.0
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-rf      = 54
epsilon_r       = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type        = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch     = 0
rvdw            = 1.0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr        = No
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension = 1
; Separate tables between energy group pairs
energygrp_table =
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx      = 0
fourier_ny      = 0
fourier_nz      = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order       = 4
ewald_rtol      = 1e-05

```

```
ewald_geometry      = 3d
epsilon_surface     = 0
optimize_fft        = no
```

```
-----
```

```
; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm        = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii         = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgradii is updated every nstlist steps
rgradii            = 2
; Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc        = 0
```

```
-----
```

```
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl             = berendsen
; Groups to couple separately
tc-grps            = Protein Non-Protein
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t              = 0.1 0.1
ref-t              = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl             = berendsen
Pcoupltype         = Isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p              = 1
compressibility    = 4.5e-5
ref-p              = 1
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed      = 815131
```

```
-----
```

```
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel            = no
gen-temp           = 310
gen-seed           = 4890394
```

```
-----
```

```
; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre              = simple
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting    = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed        = no
disre-fc           = 1000
disre-tau          = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout        = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire              = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc           = 0
```

```
orire-tau          = 0
orire-fitgrp       =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout        = 100
; Dihedral angle restraints: No, Simple or Ensemble
dihre              = No
dihre-fc           = 1000
dihre-tau          = 0
; Output frequency for dihedral values to energy file
nstdihreout        = 100
```

```
-----
```

```
; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric            = 0
ld-seed            = 1993
```

```
-----
```

```
; OPTIONS FOR BONDS
constraints         = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR          = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol           = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order         = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter          = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle     = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse               = no
```

```
-----
```

```
; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are excluded
energygrp_excl     =
```

```
-----
```

```
; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM               = no
; Groups treated Quantum Mechanically
QMMM-grps          =
; QM method
QMmethod           =
; QMMM scheme
QMMMscheme         = normal
; QM basisset
QMbasis            =
; QM charge
```

```

QMcharge          =
; QM multiplicity
QMmult           =
; Surface Hopping
SH               =
; CAS space options
CASorbitals      =
CASelectrons     =
SAon             =
SAoff            =
SAsteps         =
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; Optimization of QM subsystem
bOPT             =
bTS              =

;-----
; IMPLICIT SOLVENT (for use with Generalized Born electrostatics)
implicit_solvent = No

;-----
; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing        =
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints =
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time   =
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp   =

;-----
; Free energy control stuff
free-energy       = no
init-lambda      = 0
delta-lambda     = 0
sc-alpha         = 0
sc-power         = 0
sc-sigma        = 0.3

;-----
; Non-equilibrium MD stuff
acc-grps         =
accelerate       =
freezegrps      =
frezedim        =
cos-acceleration = 0
deform          =

;-----
; Electric fields
; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real)
; and a phase angle (real)
E-x             =
E-xt            =

```



```
E-y      =
E-yt     =
E-z      =
E-zt     =
```

```
-----
```

```
; User defined thingies
```

```
user1-grps    =
user2-grps    =
userint1      = 0
userint2      = 0
userint3      = 0
userint4      = 0
userreal1     = 0
userreal2     = 0
userreal3     = 0
userreal4     = 0
```

## 8.2. Máximo Declive com Restrição de Posições

```
; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
```

```
title         = sd
; Preprocessor - specify a full path if necessary.
cpp           = /lib/cpp
include       =
define        = -DFLEXIBLE
```

```
-----
```

```
; RUN CONTROL PARAMETERS
```

```
integrator    = steep
; Start time and timestep in ps
tinit         = 0
dt            = 0.002 ( dt x nsteps / 1000 = ns )
nsteps        = 5000000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step     = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode     = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm       = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps     =
```

```
-----
```

```
; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
```

```
; Force tolerance and initial step-size
emtol         = 42.0
emstep        = 0.01
; Max number of iterations in relax_shells
niter         = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep        = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep    = 1000
nbfgsccorr    = 10
```

```
-----
```

```

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout      = 100000
nstvout      = 100000
nstfout      = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint = 1000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog       = 1000
nstenergy    = 50
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout    = 20000
xtc-precision = 10000
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps     =
; Selection of energy groups
energygrps   = Protein Non-Protein

;-----
; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nstlist      = 5
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type      = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc          = xyz
; nblast cut-off
rlist        = 1.0
domain-decomposition = no

;-----
; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype  = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb     = 1.0
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-rf   = 54
epsilon_r    = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type     = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch  = 0
rvdw         = 1.0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr     = No
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension = 1
; Separate tables between energy group pairs
energygrp_table =
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx    = 0
fourier_ny    = 0
fourier_nz    = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters

```

```
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-05
ewald_geometry = 3d
epsilon_surface = 0
optimize_fft   = no
```

```
-----
```

```
; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm    = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii     = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgradii is updated every nstlist steps
rgradii        = 2
; Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc    = 0
```

```
-----
```

```
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl         = berendsen
; Groups to couple separately
tc-grps       = Protein Non-Protein
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t         = 0.1 0.1
ref-t         = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = Isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p        = 1
compressibility = 4.5e-5
ref-p        = 1
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed = 815131
```

```
-----
```

```
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel       = no
gen-temp     = 310
gen-seed     = 4890394
```

```
-----
```

```
; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre        = simple
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed   = no
disre-fc      = 1000
disre-tau     = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout  = 100
; Orientation restraints: No or Yes
```

```

orire          = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc       = 0
orire-tau      = 0
orire-fitgrp   =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout    = 100
; Dihedral angle restraints: No, Simple or Ensemble
dihre         = No
dihre-fc       = 1000
dihre-tau      = 0
; Output frequency for dihedral values to energy file
nstdihreout    = 100

;-----

; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric        = 0
ld-seed        = 1993

;-----

; OPTIONS FOR BONDS
constraints     = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR      = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol      = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order    = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter     = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse          = no

;-----

; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are excluded
energygrp_excl =

;-----

; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM           = no
; Groups treated Quantum Mechanically
QMMM-grps     =
; QM method
QMmethod      =
; QMMM scheme
QMMMscheme    = normal

```

```

; QM basisset
QMbasis          =
; QM charge
QMcharge         =
; QM multiplicity
QMmult          =
; Surface Hopping
SH               =
; CAS space options
CASorbitals      =
CASelectrons     =
SAon             =
SAoff            =
SAsteps          =
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; Optimization of QM subsystem
bOPT             =
bTS              =

;-----

; IMPLICIT SOLVENT (for use with Generalized Born electrostatics)
implicit_solvent = No

;-----

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing        =
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints =
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time   =
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp   =

;-----

; Free energy control stuff
free-energy       = no
init-lambda      = 0
delta-lambda     = 0
sc-alpha         = 0
sc-power         = 0
sc-sigma         = 0.3

;-----

; Non-equilibrium MD stuff
acc-grps         =
accelerate       =
freezegrps      =
freezedim       =
cos-acceleration = 0
deform           =

;-----

; Electric fields
; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real)

```

```

; and a phase angle (real)
E-x      =
E-xt     =
E-y      =
E-yt     =
E-z      =
E-zt     =

```

```

;-----

```

```

; User defined thingies
user1-grps =
user2-grps =
userint1   = 0
userint2   = 0
userint3   = 0
userint4   = 0
userreal1  = 0
userreal2  = 0
userreal3  = 0
userreal4  = 0

```

### 8.3. Gradientes Conjugados

```

; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title      = cg
; Preprocessor - specify a full path if necessary.
cpp        = /lib/cpp
include    =
define     = -DFLEXIBLE

```

```

;-----

```

```

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator = cg
; Start time and timestep in ps
tinit     = 0
dt        = 0.0002 ( dt x nsteps / 1000 = ns )
nsteps    = 5000000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm   = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps =

```

```

;-----

```

```

; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
; Force tolerance and initial step-size
emtol     = 42.0
emstep    = 0.001
; Max number of iterations in relax_shells
niter     = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep    = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep = 1000
nbfscorr  = 10

```

```

;-----
; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout      = 100000
nstvout      = 100000
nstfout      = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint = 1000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog       = 1000
nstenergy    = 50
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout    = 20000
xtc-precision = 10000
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps     =
; Selection of energy groups
energygrps   = Protein Non-Protein

;-----

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nblast       = 5
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type      = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc          = xyz
; nblast cut-off
rlist        = 1.0
domain-decomposition = no

;-----

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype  = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb     = 1.0
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-rf   = 54
epsilon_r    = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type     = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch  = 0
rvdw         = 1.0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr     = No
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension = 1
; Separate tables between energy group pairs
energygrp_table =
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx    = 0

```

```
fourier_ny      = 0
fourier_nz      = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order       = 4
ewald_rtol      = 1e-05
ewald_geometry  = 3d
epsilon_surface = 0
optimize_fft    = no
```

```
-----
```

```
; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm     = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii      = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgradii is updated every nstlist steps
rgradii         = 2
; Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc     = 0
```

```
-----
```

```
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl          = berendsen
; Groups to couple separately
tc-grps        = Protein Non-Protein
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t          = 0.1 0.1
ref-t          = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = Isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p         = 1
compressibility = 4.5e-5
ref-p         = 1
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed  = 815131
```

```
-----
```

```
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel        = no
gen-temp       = 310
gen-seed       = 4890394
```

```
-----
```

```
; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre          = simple
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed    = no
disre-fc       = 1000
disre-tau      = 0
```



```

; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout      = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire            = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc        = 0
orire-tau       = 0
orire-fitgrp    =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout     = 100
; Dihedral angle restraints: No, Simple or Ensemble
dihre          = No
dihre-fc       = 1000
dihre-tau      = 0
; Output frequency for dihedral values to energy file
nstdihreout    = 100

;-----
; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric        = 0
ld-seed        = 1993

;-----
; OPTIONS FOR BONDS
constraints    = none
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR     = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol     = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order   = 8
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter    = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse        = no

;-----
; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are excluded
energygrp_excl =

;-----
; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM          = no
; Groups treated Quantum Mechanically
QMMM-grps    =
; QM method

```

```

QMmethod          =
; QMMM scheme
QMMMscheme        = normal
; QM basisset
QMbasis           =
; QM charge
QMcharge          =
; QM multiplicity
QMmult            =
; Surface Hopping
SH                =
; CAS space options
CASorbitals       =
CASelectrons      =
SAon              =
SAoff             =
SAsteps           =
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; Optimization of QM subsystem
bOPT              =
bTS               =

;-----

; IMPLICIT SOLVENT (for use with Generalized Born electrostatics)
implicit_solvent  = No

;-----

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing         =
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints =
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time    =
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp    =

;-----

; Free energy control stuff
free-energy        = no
init-lambda       = 0
delta-lambda      = 0
sc-alpha          = 0
sc-power          = 0
sc-sigma          = 0.3

;-----

; Non-equilibrium MD stuff
acc-grps          =
accelerate        =
freezegrps        =
freezedim         =
cos-acceleration  = 0
deform            =

;-----

```

```

; Electric fields
; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real)
; and a phase angle (real)
E-x          =
E-xt        =
E-y         =
E-yt        =
E-z         =
E-zt        =

```

```

;-----

```

```

; User defined thingies
user1-grps   =
user2-grps   =
userint1     = 0
userint2     = 0
userint3     = 0
userint4     = 0
userreal1    = 0
userreal2    = 0
userreal3    = 0
userreal4    = 0

```

#### 8.4. Dinâmica Molecular com Restrição de Posições

```

; VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS
title        = prmd
; Preprocessor - specify a full path if necessary.
cpp          = /lib/cpp
include      =
define       = -DPOSRES

```

```

;-----

```

```

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator   = md
; Start time and timestep in ps
tinit       = 0
dt          = 0.002 ( dt x nsteps / 1000 = ns )
nsteps      = 250000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step   = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode   = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm     = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps   =

```

```

;-----

```

```

; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
; Force tolerance and initial step-size
emtol       = 42.0
emstep      = 0.01
; Max number of iterations in relax_shells
niter       = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints

```

```

fcstep          = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep     = 1000
nbfgsccorr    = 10

;-----

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout        = 100000
nstvout        = 100000
nstfout        = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint  = 1000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog         = 1000
nstenergy      = 50
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout      = 20000
xtc-precision  = 10000
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps       =
; Selection of energy groups
energygrps     = Protein Non-Protein

;-----

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nblast         = 5
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type        = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc            = xyz
; nblast cut-off
rlist          = 1.0
domain-decomposition = no

;-----

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype    = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb       = 1.0
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-rf     = 54
epsilon_r      = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type       = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch    = 0
rvdw           = 1.0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr       = No
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension = 1
; Separate tables between energy group pairs
energygrp_table =

```

```

; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing      = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1e-05
ewald_geometry      = 3d
epsilon_surface     = 0
optimize_fft        = no

;-----

; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm        = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii         = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgradii is updated every nstlist steps
rgradii            = 2
; Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc        = 0

;-----

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl             = berendsen
; Groups to couple separately
tc-grps            = Protein Non-Protein
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t              = 0.1 0.1
ref-t              = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl             = berendsen
Pcoupltype         = Isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p              = 1
compressibility     = 4.5e-5
ref-p              = 1
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed      = 815131

;-----

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel            = yes
gen-temp           = 310
gen-seed           = 4890394

;-----

; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre              = simple
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting    = Conservative

```

```

; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed      = no
disre-fc        = 1000
disre-tau       = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout     = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire           = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc        = 0
orire-tau       = 0
orire-fitgrp    =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout     = 100
; Dihedral angle restraints: No, Simple or Ensemble
dihre          = No
dihre-fc       = 1000
dihre-tau      = 0
; Output frequency for dihedral values to energy file
nstdihreout    = 100

;-----
; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric        = 0
ld-seed        = 1993

;-----
; OPTIONS FOR BONDS
constraints    = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR     = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol     = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order   = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter    = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse        = no

;-----
; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are excluded
energygrp_excl =

;-----
; OPTIONS FOR QMMM calculations

```

```

QMMM          = no
; Groups treated Quantum Mechanically
QMMM-grps     =
; QM method
QMmethod      =
; QMMM scheme
QMMMscheme    = normal
; QM basisset
QMbasis       =
; QM charge
QMcharge      =
; QM multiplicity
QMmult        =
; Surface Hopping
SH            =
; CAS space options
CASorbitals   =
CASelectrons  =
SAon          =
SAoff         =
SAsteps       =
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; Optimization of QM subsystem
bOPT          =
bTS           =

;-----

; IMPLICIT SOLVENT (for use with Generalized Born electrostatics)
implicit_solvent = No

;-----

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing      =
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints =
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time =
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp =

;-----

; Free energy control stuff
free-energy     = no
init-lambda    = 0
delta-lambda   = 0
sc-alpha       = 0
sc-power       = 0
sc-sigma       = 0.3

;-----

; Non-equilibrium MD stuff
acc-grps       =
accelerate     =
freezegrps    =
freezedim     =

```

```

cos-acceleration      = 0
deform                =

;-----

; Electric fields
; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real)
; and a phase angle (real)
E-x                   =
E-xt                  =
E-y                   =
E-yt                  =
E-z                   =
E-zt                  =

```

```

;-----

; User defined thingies
user1-grps            =
user2-grps            =
userint1              = 0
userint2              = 0
userint3              = 0
userint4              = 0
userreal1             = 0
userreal2             = 0
userreal3             = 0
userreal4             = 0

```

## 8.5. Dinâmica Molecular Sem Restrição de Posições

### VARIOUS PREPROCESSING OPTIONS

```

title                 = md
; Preprocessor - specify a full path if necessary.
cpp                   = /lib/cpp
include               =
define                =

```

### ; RUN CONTROL PARAMETERS

```

integrator            = md
; Start time and timestep in ps
tinit                 = 0
dt                    = 0.002 ( dt x nsteps / 1000 = ns )
nsteps                = 2500000
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step             = 0
; mode for center of mass motion removal
comm-mode             = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm               = 1
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps             =

```

### ; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS

```

; Force tolerance and initial step-size
emtol                 = 42.0
emstep                = 0.01

```



```

; Max number of iterations in relax_shells
niter          = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep        = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep    = 1000
nbfgrscorr    = 10

;-----

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout       = 100000
nstvout       = 10000
nstfout       = 0
; Checkpointing helps you continue after crashes
nstcheckpoint = 1000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog        = 1000
nstenergy     = 50
; Output frequency and precision for xtc file
nstxtcout     = 20000
xtc-precision = 10000
; This selects the subset of atoms for the xtc file. You can
; select multiple groups. By default all atoms will be written.
xtc-grps      =
; Selection of energy groups
energygrps    = Protein Non-Protein

;-----

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; nblast update frequency
nstlist       = 5
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type       = grid
; Periodic boundary conditions: xyz (default), no (vacuum)
; or full (infinite systems only)
pbc           = xyz
; nblast cut-off
rlist         = 1.0
domain-decomposition = no

;-----

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype   = PME
rcoulomb-switch = 0
rcoulomb      = 1.0
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-rf    = 54
epsilon_r     = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type      = Cut-off
; cut-off lengths
rvdw-switch   = 0
rvdw          = 1.0
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr      = No
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off

```

```

table-extension      = 1
; Seperate tables between energy group pairs
energygrp_table     =
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing      = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1e-05
ewald_geometry      = 3d
epsilon_surface     = 0
optimize_fft        = no

;-----
; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm        = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii         = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgradii is updated every nstlist steps
rgradii            = 2
; Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc        = 0

;-----
; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
Tcoupl              = berendsen
; Groups to couple separately
tc-grps             = Protein Non-Protein
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t               = 0.1 0.1
ref-t               = 310 310
; Pressure coupling
Pcoupl              = berendsen
Pcoupltype          = Isotropic
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p               = 1
compressibility     = 4.5e-5
ref-p               = 1
; Random seed for Andersen thermostat
andersen_seed       = 815131

;-----
; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel             = no
gen-temp            = 310
gen-seed            = 1735345

;-----
; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble

```

```

disre                = No
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting      = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed          = no
disre-fc             = 1000
disre-tau            = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout          = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire                = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc             = 0
orire-tau            = 0
orire-fitgrp         =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout          = 100
; Dihedral angle restraints: No, Simple or Ensemble
dihre                = No
dihre-fc             = 1000
dihre-tau            = 0
; Output frequency for dihedral values to energy file
nstdihreout          = 100

```

-----

```

; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric              = 0
ld-seed              = 1993

```

-----

```

; OPTIONS FOR BONDS
constraints           = all-bonds
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = Lincs
; Do not constrain the start configuration
unconstrained-start = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR            = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol            = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order          = 8
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter           = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle      = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse                = no

```

-----

```

; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are excluded
energygrp_excl      =

```

```

;-----
; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM          = no
; Groups treated Quantum Mechanically
QMMM-grps     =
; QM method
QMmethod      =
; QMMM scheme
QMMMscheme    = normal
; QM basisset
QMbasis       =
; QM charge
QMcharge      =
; QM multiplicity
QMmult        =
; Surface Hopping
SH            =
; CAS space options
CASorbitals   =
CASelectrons  =
SAon          =
SAoff         =
SAsteps       =
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; Optimization of QM subsystem
bOPT          =
bTS           =

;-----

; IMPLICIT SOLVENT (for use with Generalized Born electrostatics)
implicit_solvent = No

;-----

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing      =
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints =
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time =
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp =

;-----

; Free energy control stuff
free-energy     = no
init-lambda    = 0
delta-lambda   = 0
sc-alpha       = 0
sc-power       = 0
sc-sigma       = 0.3

;-----

; Non-equilibrium MD stuff
acc-grps      =

```

```
accelerate      =  
freezegrps     =  
freezedim      =  
cos-acceleration = 0  
deform         =
```

```
;------
```

```
; Electric fields  
; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real)  
; and a phase angle (real)
```

```
E-x            =  
E-xt          =  
E-y           =  
E-yt          =  
E-z           =  
E-zt          =
```

```
;------
```

```
; User defined thingies
```

```
user1-grps     =  
user2-grps     =  
userint1       = 0  
userint2       = 0  
userint3       = 0  
userint4       = 0  
userreal1      = 0  
userreal2      = 0  
userreal3      = 0  
userreal4      = 0
```

9. Anexo: Manuscrito em desenvolvimento para publicação

# **Endostatin N-Terminal Fragment Structural Analysis: A Molecular Dynamics Study**

Torres, P. H. M.; Limaverde, G. S. C. S.; Pascutti, P. G.

## Abstract

Endostatin is a potent antiangiogenic protein derived from collagen XVIII which mechanism of action is still not completely understood. It has been shown that the 27 amino acid N-terminal fragment of murine endostatin has antitumor, antimigration and antipermeability activities comparable to the full soluble protein. In order to understand how this peptide can exert such elaborate function, we performed structural analysis using molecular dynamics to evaluate the behavior of this fragment in aqueous environment. Here we show that the N-terminal peptide of murine endostatin is able to assume a well-defined structure, folding into a zinc-dependent  $\beta$ -hairpin conformation. Based on structural information, we found why the N-terminal peptide of human endostatin with the same length failed to acquire a stable conformation and we were able to predict the successful folding of the R4Q mutant and of a shorter 25 residue long form of the human peptide. Finally, we show that the  $\beta$ -hairpin conformation assumed by the peptide of murine endostatin with zinc has a high structural similarity with the integrin-binding domain of the NC1  $\alpha_1$  chain of collagen IV, termed arresten.

## 1 - Introduction

The generation of new blood vessels, a process called angiogenesis, is a fundamental key step in the development of the body, but is also pathologically active in several diseases including cancer<sup>1</sup>. Endostatin is a 20KDa globular protein derived from collagen XVIII which was first described in 1997 as a potent antiangiogenic protein. The results obtained on the first two papers by Judah Folkman group were very promising as an insoluble *E. coli*-expressed endostatin preparation could inhibit tumor growth and even promote tumor regression showing no significant side effects<sup>2</sup>.

Endostatin is highly conserved in different species displaying 87% of identity between human and mouse sequences<sup>3</sup>. Moreover, some groups reported that human endostatin was successfully applied in murine models, suggesting well conserved structural and functional correlation.

Although one of the most studied endogenous anti-angiogenic factors, the mechanism of action of endostatin is still not completely known. Because the endostatin preparations successfully used in the first experiments were expressed in bacteria, a common strategy used by several groups is to focus on biologically active endostatin-derived peptides<sup>4,5,6,7</sup>. In 2005 Tjin and collaborators showed that the N-terminal fragment from mouse endostatin exhibited antitumoral activity analogous to the full length endostatin. This peptide successfully inhibited tumor growth, VEGF-induced endothelial cell migration and VEGF-induced vascular permeability in mice bearing Lewis Lung Carcinoma<sup>8</sup>. Further studies showed that the administration of this peptide ameliorated symptoms of several angiogenesis-dependant disorders<sup>9</sup>.

This fragment is 27 residues long, and has three of the four residues (His 1, His 3 and His 11) responsible for the coordination of a zinc ion on the parent molecule. The metal was found to be crucial for the peptide antiangiogenic activity but its importance on the full endostatin molecule is still a matter of debate.

On the premise that structure and function are strictly correlated, in this work we studied the behavior of the N-terminal fragment of human and mouse endostatin using molecular dynamics with the aim of characterize structural key elements that may affect its stability in order to contribute in the determination of its mechanism of action.

## 2 - Methods

In order to understand the behavior of the N-terminal fragment of endostatin we built eight distinct systems depicted on the table below. We took as models for the human and murine endostatin the crystallographic structures 1BNL<sup>10</sup> and 1DY1<sup>11</sup>, respectively, from the RCSB<sup>12</sup> protein databank. The table 1 explains the particularities of each system. The uppercase "H" or "M" refers to human and murine endostatin respectively. The numbers correspond to the length of the simulated peptide and the uppercase "ZN" indicates the presence of Zn<sup>++</sup>.



All models and images were made with the PyMol<sup>13</sup> software and the molecular dynamics simulations were carried out by the GROMACS 4.04 software package<sup>14</sup>.

After we cut the peptides from the native crystallographic structure, they were solvated in a dodecahedral box containing explicit SPC water. The solvated peptides were submitted preliminary energy minimization consisting of 10000 steps of steepest descent with position restraints followed by another 10000 steps of steepest descent without the position restraints and finally by a 5000 steps of conjugate gradient.

Because the dynamics of peptides involves mainly rapid changes in structure, the equilibration time was also analyzed along with the data of the productive dynamics. The systems were simulated under the NPT ensemble conditions, using the GROMOS96 43a1 force field with a 2 fs time step. We used the Lincs algorithm to constrain all-atoms, and employed the berendsen algorithm to control temperature and pressure coupling to reference values of 310K (37° C) and 1 bar respectively. To treat long-range electrostatics we used the PME algorithm and set both the Van der Waals and Coulomb cut-offs to 1 nm.

To analyze the trajectories we also employed the GROMACS packages programs. For the clusters generation, we chose the cut-off of 0.3 nm and the gromos method. Second structure analysis were made using the DSSP algorithm<sup>15</sup>, the electrostatic potential surface was generated with the APBS algorithm and displayed with PyMol.

### 3 - Results

#### 3.1 - The murine and human peptides behave differently throughout the dynamic.

Based on the RMS deviation (Figure 1A), cluster analysis (Figures 1B and 1C) and on the secondary structure graphs (Figures 1D and 1E) one can assume the behavior of the murine and human peptides are quite distinct. The most notable difference is the tendency of the murine peptide to form beta-structures which is far superior to the tendency of the human peptide. Based on this difference, we hypothesized that this lack of beta structures on the human peptide was due to internal electrostatic repulsion between N and C-terminal arginines

#### 3.2 - The arginines exert repulsive electrostatic interactions.

We hypothesized that human endostatin was unlikely to form beta-sheets because of repulsive electrostatic interactions between N-terminal and C-terminal arginines. Therefore we tested the effect of the arginines in positions 4 and 27 by building the peptides H27/R4Q-ZN and H25-ZN respectively.

Secondary structure analysis shows that these two systems have the tendency to form beta-sheets restored (Figure 2A, 2B and 2C). RMS fluctuation analysis reveals a cumulative instability effect because in the trajectory of H25-ZN, where there is one arginine in each terminal, the terminals fluctuation is intermediate

between H27/R4Q-ZN and H27-ZN (Figure 3A, 3B and 3C). The peptide H27/R4Q-ZN, as the murine peptide, has no arginine in its N-terminal and is the system which has the smallest values of RMSF on both ends.

### 3.3 - The influence of Zn<sup>++</sup>.

In the molecular dynamics of the N-terminal fragments of endostatin in the presence of Zn<sup>++</sup>, the ion is coordinated by histidines 1, 3 and 11 in the initial configuration of all systems. For the long native human peptide (H27-ZN) and for the murine peptide (M27-ZN), the coordination is maintained during the 225 ns simulation time (Figure 4A), however, for the shorter human peptide (N25-ZN) and for the mutated human peptide (H27/R4Q-ZN), the ion coordination is not maintained (Figures 4B and 4C).

In these systems, the beta-sheet is formed in a slightly distinct position. For the M27-ZN peptide, the amino acids located in the loop are leucine-15 and asparagines-16 (Figure 4D) while for M25-ZN (Figure 4E) and M27/R4Q-ZN (Figure 4F) the loop is formed by valine-13 and alanine-14. We refer to this phenomenon as the “zinc detachment shift”.

The murine peptide, in the absence of Zn<sup>++</sup> (M27) displays a abrupt change in RMSD ( $\approx 0,25$  nm, Figure 5A) which then oscillates around this value for virtually the entire MD simulation. The cluster analysis shows that almost all structures sampled fall into a 0.3 nm-wide RMS cluster (Figure 5B).

Taken altogether, these data suggest a very specific mechanism performed by the zinc ion. First, the ion must be present in order for the main single beta-sheet to be formed. Secondly, it is unlikely that the peptide loses the beta-sheet conformation once it has been assumed, even if the zinc ion is removed. And finally, if the ion coordination is lost, although the beta conformation remains stable, it is slightly repositioned on the sequence.

### 3.4 - The M27-ZN peptide reaches a stable beta-hairpin conformation which is similar to arresten.

After 80 ns simulation time, this peptide assumed a beta-hairpin conformation which remained stable throughout the whole simulation time. This main beta sheet is formed between the residues 9,10,11,12,13 and 20,21,22,23,24. The system remained in this conformation for approximately 140 ns. In order to further test the stability of this conformation we used it as initial state for a new MD simulation, with a distinct generation seed, lasting 1  $\mu$ s in which this structure also remained stable (Data not shown).

We looked for a similar beta-structure among the known antiangiogenic proteins which had their crystallographic structures resolved and deposited in de RSCB PDB Databank. These comparisons were made manually according to the following criteria: the antiangiogenic protein should have a solvent-exposed beta-hairpin, being approximately of the same length as M27-ZN and displaying conserved amino-acids. The search pointed to a family of globular proteins derived from collagen IV, specifically to arresten.

Arresten is an endogenous antiangiogenic protein present in the NC1 domain of collagen IV<sup>16</sup>. Its structure displays a beta-sheet that resembles the one formed by M27-ZN (Figure 6). Some residues are in spatially correlated positions: proline, lysine, asparagine and arginine, as shown in figure 6. The former three residues also have the same relative positions in the primary sequence of the chains.

Besides the tridimensional structure and chemical composition, the electrostatic potential of these structures is also similar as can be seen in figure 7 which shows the electrostatic potential surface of both chains.

3.5 - Once established, the beta-sheet can be maintained by at least 20 residues.

To determine what was the smallest fragment of the peptide that could retain the beta-sheet conformation, we restricted the sequence to 20 and further to 18 residues corresponding to the ones that formed the sheet in the peptide M27-ZN.

Because two histidines of the site of Zn<sup>++</sup> coordination were removed, we also removed the zinc ion from both shortened peptides system.

M20 was able to maintain the beta-sheet conformation throughout 120 ns simulation time (Figure 8A) whereas M18 lost the characteristics of the sheet within approximately 50 ns (Figure 8B).

#### 4 - Discussion

Our goal was to study the dynamics of the N-terminal fragment of endostatin, to describe its properties and to predict its spatial conformation highlighting the differences between human and murine endostatin and analyzing the influence of the zinc ion.

Taken altogether our data suggest that the zinc ion induces a particular beta-hairpin folding on the studied peptide. Without the ion there may be beta-sheet formation but only in its presence the peptides could form large and stable sheets. In other words, we found that under zinc influence there is the structuring of a main sheet whereas in zinc free systems there may be the formation of less prevalent sheets or no significant beta structures.

Once formed it is unlikely that the main sheet conformation is lost, but it can smoothly shift in the sequence because of the transient establishment and rupture of hydrogen bonds.

Arresten<sup>16</sup> is a globular fragment of collagen IV as are canstatin<sup>17</sup> and tumstatin<sup>18</sup>. All of them are known angiogenesis inhibitors and, for canstatin and tumstatin, it has been proved that the antiangiogenic activity is carried out by the M27-ZN-like beta-sheet<sup>19</sup>. Considering that endostatin is also derived from collagen molecules, it is possible that these proteins are functionally related. The similarity between the conformations of M27-ZN and the beta-sheet in arresten may point to a common biological ligand which could be alpha1-beta1 integrin, a protein known to interact with arresten<sup>20</sup>.

Another important factor is that the stability of this fragment and the capacity to form the main beta-sheet is affected by electrostatic repulsion mediated by arginine residues in human peptides. We simulated N25hES not only because it had no N-terminal arginines, but also because this was the fragment used in the tests for human endostatin in Sjin's work, proving that the 27 residues long N-terminal fragment of murine endostatin and the 25 residues long N-terminal fragment of human endostatin could perform the same antiangiogenic effect of the whole molecules.

We also tried to determine what was the smallest sequence that could maintain the beta-conformation. We found that the M20 peptide maintained a stable sheet whereas when we cut two more residues, one from each terminal, the peptide lost the beta configuration. This information is important because, if the hairpin is the biologically active structure, theoretically, there would be no need for the 27 initial residues to deliver the antiangiogenic effects.

It might seem contradicting the fact that the main sheet remained stable in the absence of  $Zn^{++}$  but could not be formed under such condition. Although, we can hypothesize a plausible explanation: the ion drives the folding of the chain into a beta sheet, but is not responsible for its stability once it is already established.

Many authors have studied endostatin fragments and their biological activities, including in distinct positions of endostatin chain. These findings point to a theoretical multifactorial mechanism of action, compatible with the environment in which endostatin's antiangiogenic activity takes place: the protease-rich extracellular matrix. We suggest in the present work that the N-terminal fragment of endostatin acts through a particular beta-hairpin conformation and we hope that this information proves useful in developing new endostatin-based drugs.

## 5- References

1. FOLKMAN, J. & SHING, Y. **Angiogenesis** *J. Biol. Chem.*, 267(16), 10931-10934, 1992.
2. O'REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. **Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth** Cell Press, 88, 277-285, 1997.
3. OH, S. P.; KAMAGATA, Y.; MURAGAKI, Y.; TIMMONS, S.; OOSHIMA, A. & OLSEN, B. R. **Isolation And Sequencing Of Cdnas For Proteins With Multiple Domains Of Gly-Xaa-Yaa Repeats Identify A Distinct Family Of Collagenous Proteins** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(10), 4229-4233, 1994.
4. CATTANEO, M. G.; POLA, S.; FRANCESCATO, P. E.; CHILLEMI, F. & VICENTINI, L. M. **Human Endostatin-Derived Synthetic Peptides Posses Potent Antiangiogenic Properties In Vitro And In Vivo** *Exp. Cel. Res.*, 283, 230-236, 2003.
5. FRANCESCATO, P.; CHILLEMI, F.; RAG, E.; CATTANEO, M. G.; POLA, S. & VICENTINI, L. **Studies On The Structure-Activity Relationship Of Endostatin: Synthesis Of Human Endostatin Peptides Exhibiting Potent Antiangiogenic Activities** *J. Med. Chem.*, 46, 4165-4172, 2003.
6. MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; CHILLEMI, F.; GIACHETTI, A. & ZICHE, M. **Angiossuppressive And Angiostimulatory Effects Exerted By Synthetic Partial Sequences Of Endostatin** *Clin. Cancer Res.*, 9, 5358-5369, 2003.
7. WICKSTRÖM, S. A.; ALITALO, K. & KESKI-OJA, J. **An Endostatin-Derived Peptide Interacts With Integrins And Regulates Actin Cytoskeleton And Migrtion Of Endothelial Cells** *J. Biol. Chem.*, 279(19), 20178-20185, 2004.
8. SJIN, R. M. T. T.; STACHI-FAINARO, R.; BIRSNER, A. E.; RAMANUJAM, V. M. S.; FOLKMAN, J. & JAVAHERIAN, K. **A 27-Amino-Acid Synthetic Peptide Corresponding To The NH<sub>2</sub>-Terminal Zinc-Binding Domain Of Endostatin Is Responsible For Its Antitumor Activity** *Cancer Res.*, 65(9), 3656-3653, 2005.
9. TANABE, K.; MAESHIMA, Y.; ICHINOSE, K.; KITAYAMA, H., TAKAZAWA, Y., HIROKOSHI, K., KINOMURA, M., SUGIYAMA, H. AND MAKINO, H. **Endostatin Peptide, An Inhibitor Of Angiogenesis, Prevents The Progression Of Peritoneal Sclerosis In A Mouse Experimental Model.** *Kidney Int.*, 71, 227-238, 2005.
10. DING, Y. H.; JAVAHERIAN, K.; LO, K. M.; CHOPRA, R.; BOEHM, T.; LANCIOTTI, J.; HARRIS, B. A.; LI, Y.; SHAPIRO, R.; HOHENESTER, E.; TIMPL, R.; FOLKMAN, J. & WILEY, D. C. **Zinc-Dependent Dimers Observed In Crystals Of Human Endostatin** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(18), 10443-10448, 1998.
11. HOHENESTER, E.; SASAKI, T.; MANN, K. & TIMPL, R. **Variable Zinc Coordination in Endostatin** *J. Mol. Biol.*, 297, 1-6, 2000.
12. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne **The Protein Data Bank** *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242, 2000.
13. DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System** DeLano Scientific, San Carlos, CA, U. S. A. <http://www.pymol.org>, 2002.
14. VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E. & BERENDSEN, H. J. C. **Gromacs: Fast, Flexible and Free** *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701-1718, 2005.
15. KABSCH, W. and SANDERS, C. **Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen Bonded and Geometrical Features** *Biopolymers*, 22, 2577-2637, 1983.

16. COLORADO, P. C.; TORRE, A.; KAMPHAUS, G.; MAESHIMA, Y.; HOPFER, H.; TAKAHASHI, K.; VOLK, R.; ZAMBORSKY, E. D.; HERMAN, S.; SARKAR, P. K.; ERICKSEN, M. B.; DHANABAL, M.; SIMONS, M.; POST, M.; KUFE, D. W.; WEICHSELBAUM, R. R.; SUKHATME, P. V. and KALLURI, R. **Anti-angiogenic Cues from Vascular Basement Membrane Collagen** *Cancer Res.* 60, 2520-2526, 2000.
17. KAMPHAUS, G. D.; COLORADO, P. C.; PANKA, D. J.; HOPFER, H.; RAMCHANDRAN, R.; TORRE, A.; MAESHIMA, Y.; MIER, J. W.; SUKHATME, V. P. & KALLURI, R. **Canstatin, A Novel Matrix-Derived Inhibitor Of Angiogenesis And Tumor Growth** *J. Biol. Chem.*, 275(2), 1209-1215, 2000.
18. MAESHIMA, Y.; COLORADO, P. C.; TORRE, A.; HOLTHAUS, K. A.; GRUNKEMEYER, J. A.; ERICKSEN, M. B.; XIAO, Y.; STILLMAN, I. E. and KALLURI, R. **Distinct Antitumor Properties of a Type IV Collagen Domain Derived from Basement Membrane** *J. Biol. Chem.*, 275(28), 21340-21348, 2000.
19. EIKESDAL, H. P.; SUGIMOTO, H.; BIRRANE, G.; MAESHIMA, Y.; COOKE, V. G.; KIERAN, M.; KALLURI, R. **Identification Of Amino Acids Essential For The Antiangiogenic Activity Of Tumstatin And Its Use In Combination Antitumor Activity** [\*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.\*](#), 105(39), 15040-15045, 2008.
20. NYBERG, P.; XIE, L.; SUGIMOTO, H.; COLORADO, P.; SUND, M.; HOLTHAUS, K.; SUDHAKAR, A.; SALO, T. and KALLURI, R. **Characterization of the Antia-Angiogenic Properties of Arresten, an  $\alpha 1\beta 1$  Integrin-Dependent Collagen-Derived Tumor Suppressor** *Exp. Cel. Res.*, 314(18), 3292-3305, 2008.

## 6 – Figures and Tables

Table 1

	Peptide	Rationale
H27-ZN	HSRDFQPVLHLVALNAPLSGGMRGIR ZN	We wanted to detect differences between human and murine fragments behavior and whether the systems had any particular stable or meta-stable preferential conformations. We also wanted to describe the influence of the Zn <sup>++</sup> ion on both systems.
H27	HSRDFQPVLHLVALNAPLSGGMRGIR	
M27-ZN	HTHQDFQPVLHLVALNTPLSGGMRGIR ZN	
M27	HTHQDFQPVLHLVALNTPLSGGMRGIR	
H25	HSRDFQPVLHLVALNAPLSGGMRG ZN	These systems were created in order to determine the influence of the arginines on the behavior of the human peptide.
H27/R4Q-ZN	HSHQDFQPVLHLVALNAPLSGGMRGIR ZN	
M20	QPVLHLVALNTPLSGGMRGI	After the stabilization of the beta-sheet of N27mES+ we cut the sequence in order to find out the minimum number of residues that could maintain the beta-conformation.
M18	PVLHLVALNTPLSGGMRG	

Figure 1

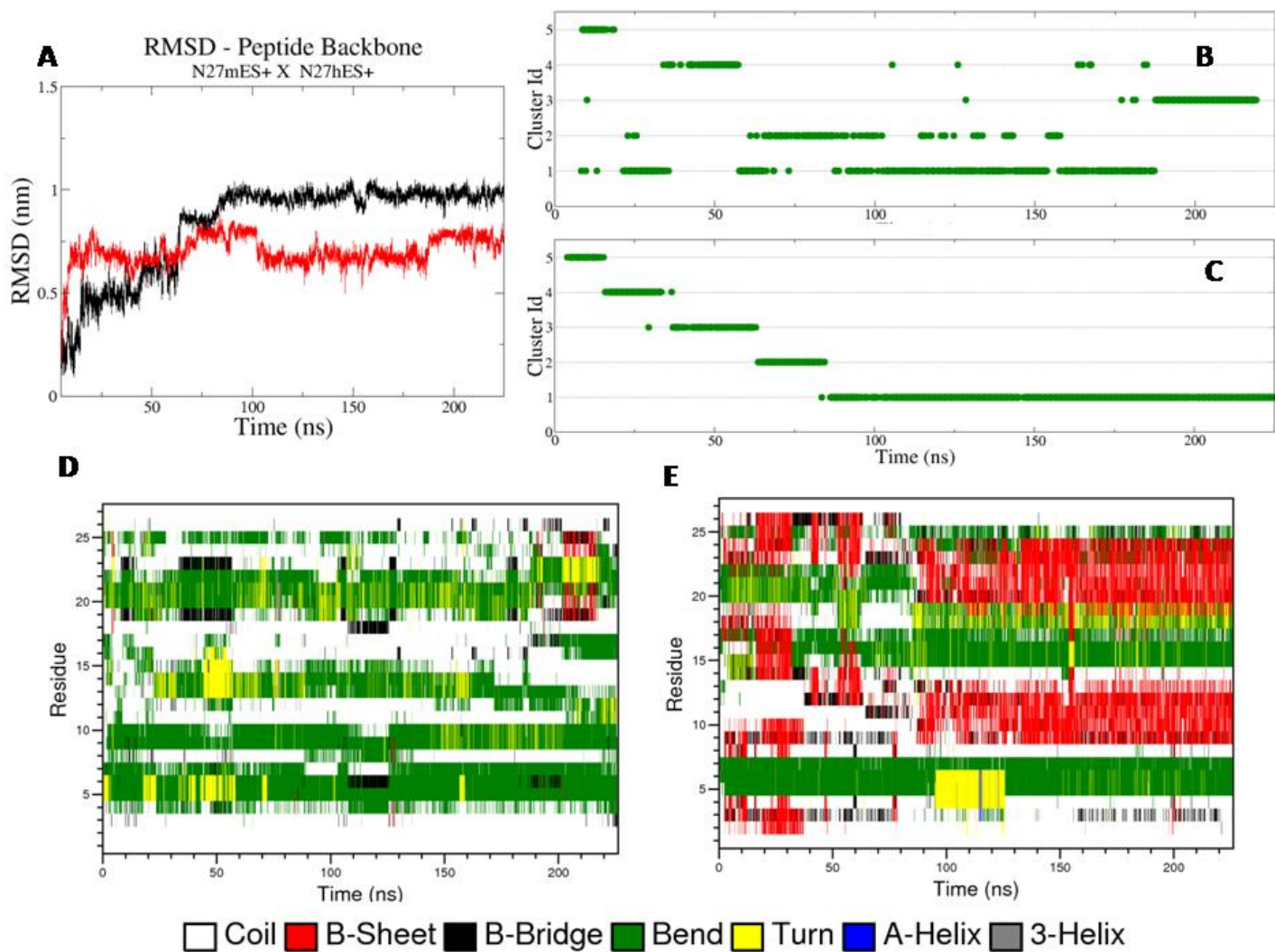




Figure 2

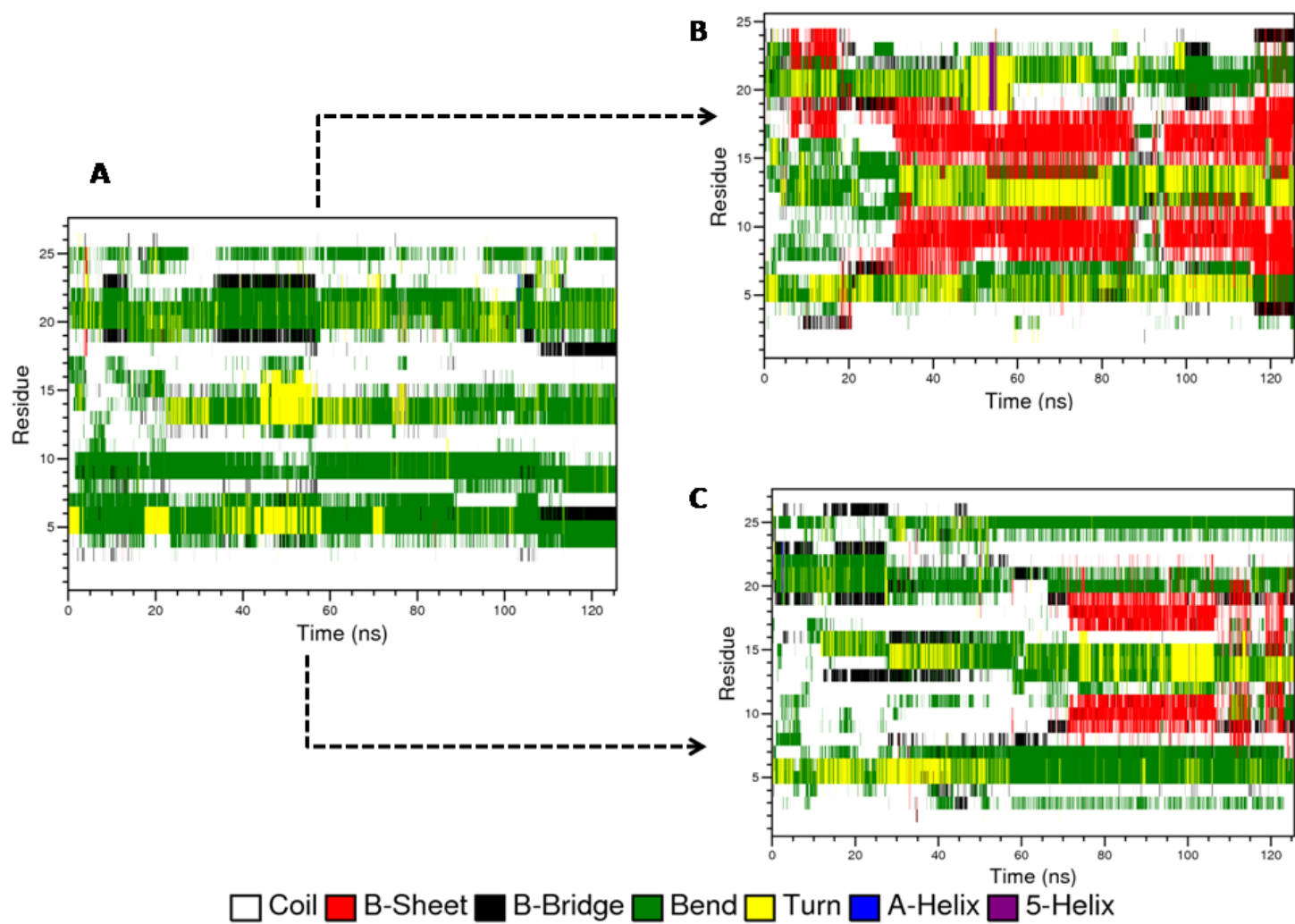


Figure 3

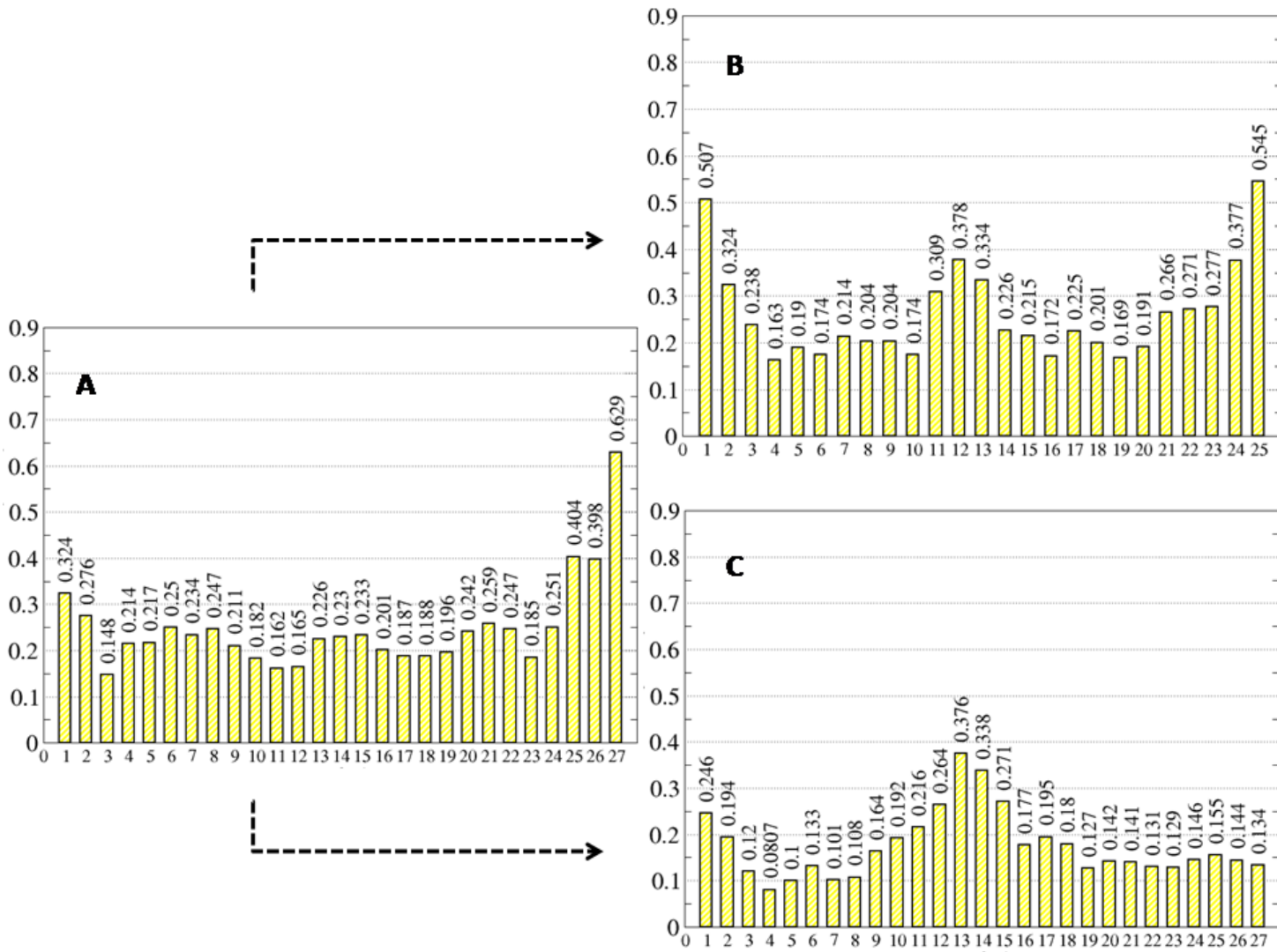


Figure 4

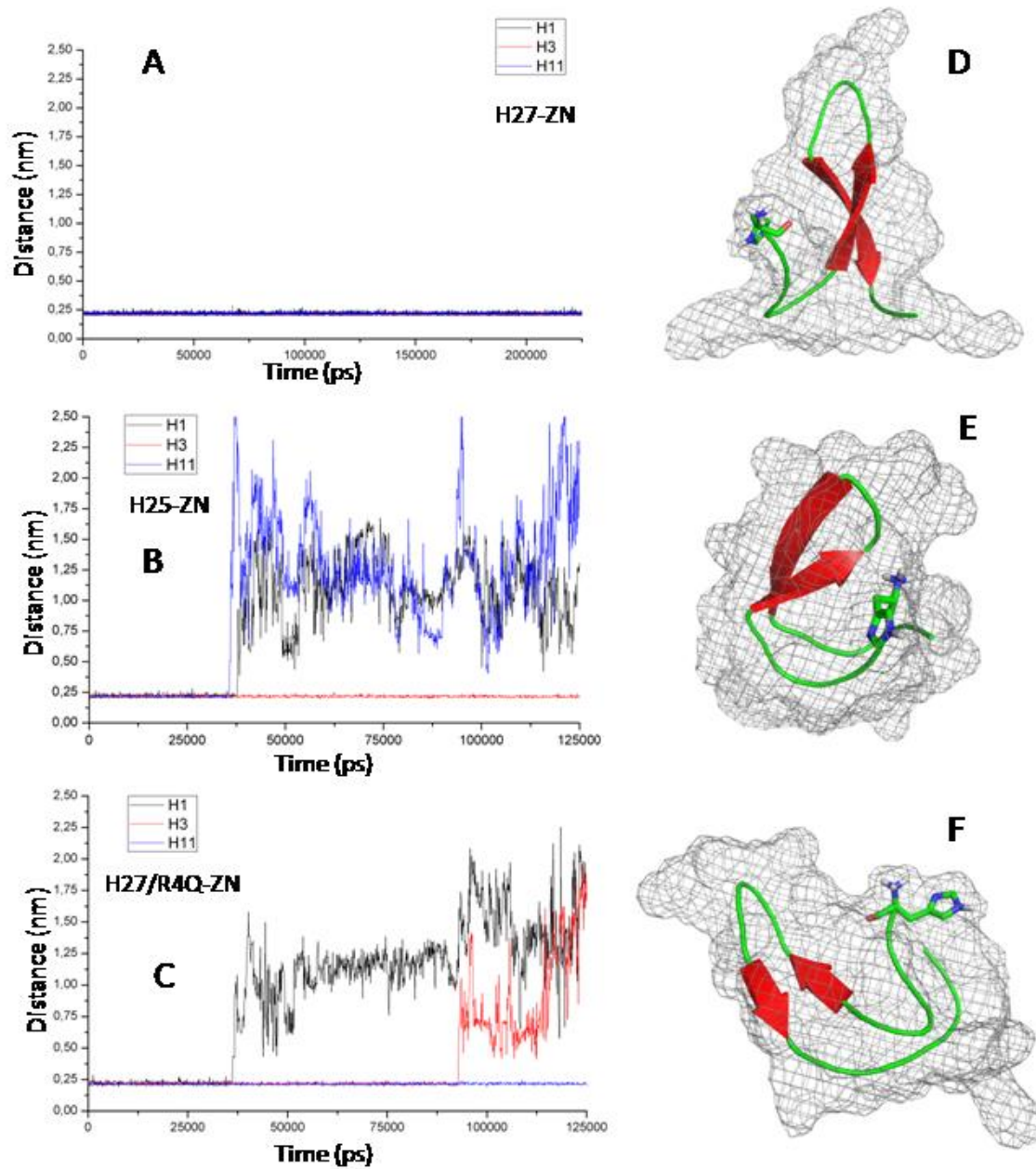


Figure 5

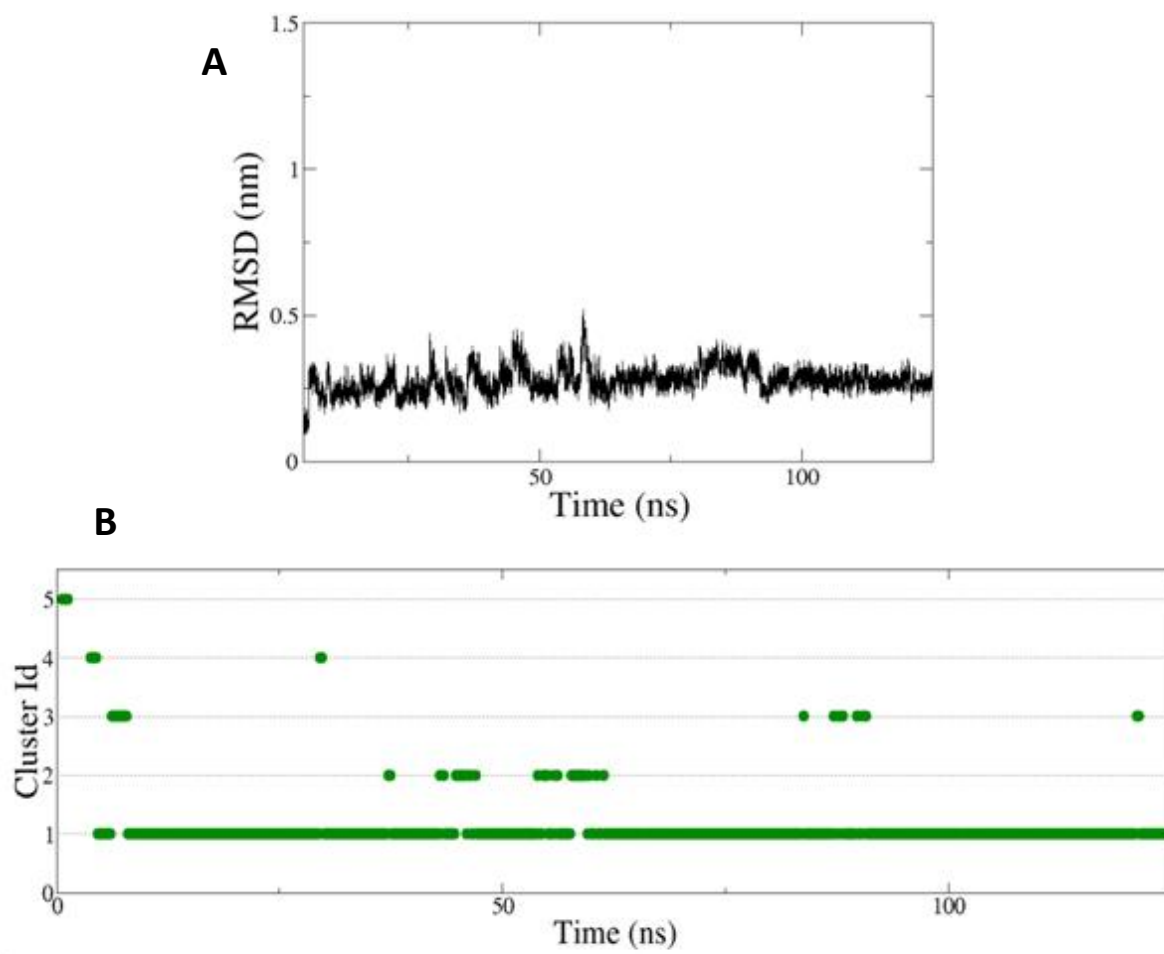


Figure 6

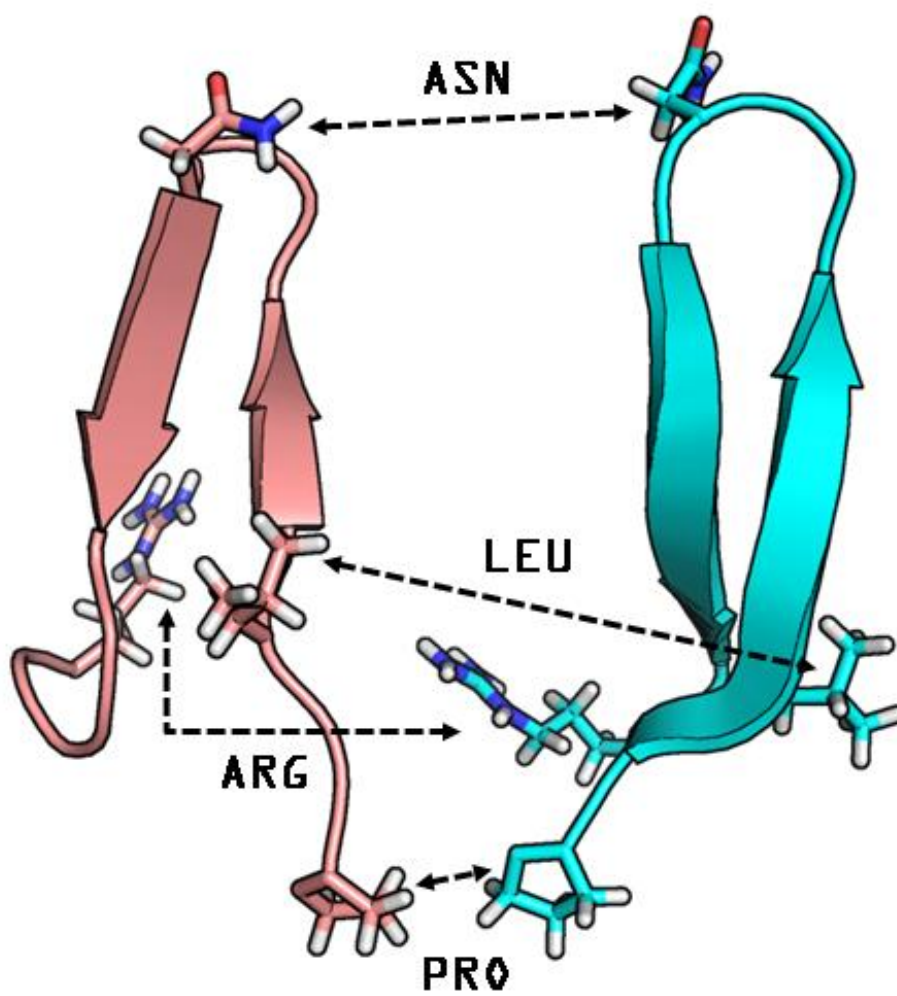


Figure 7

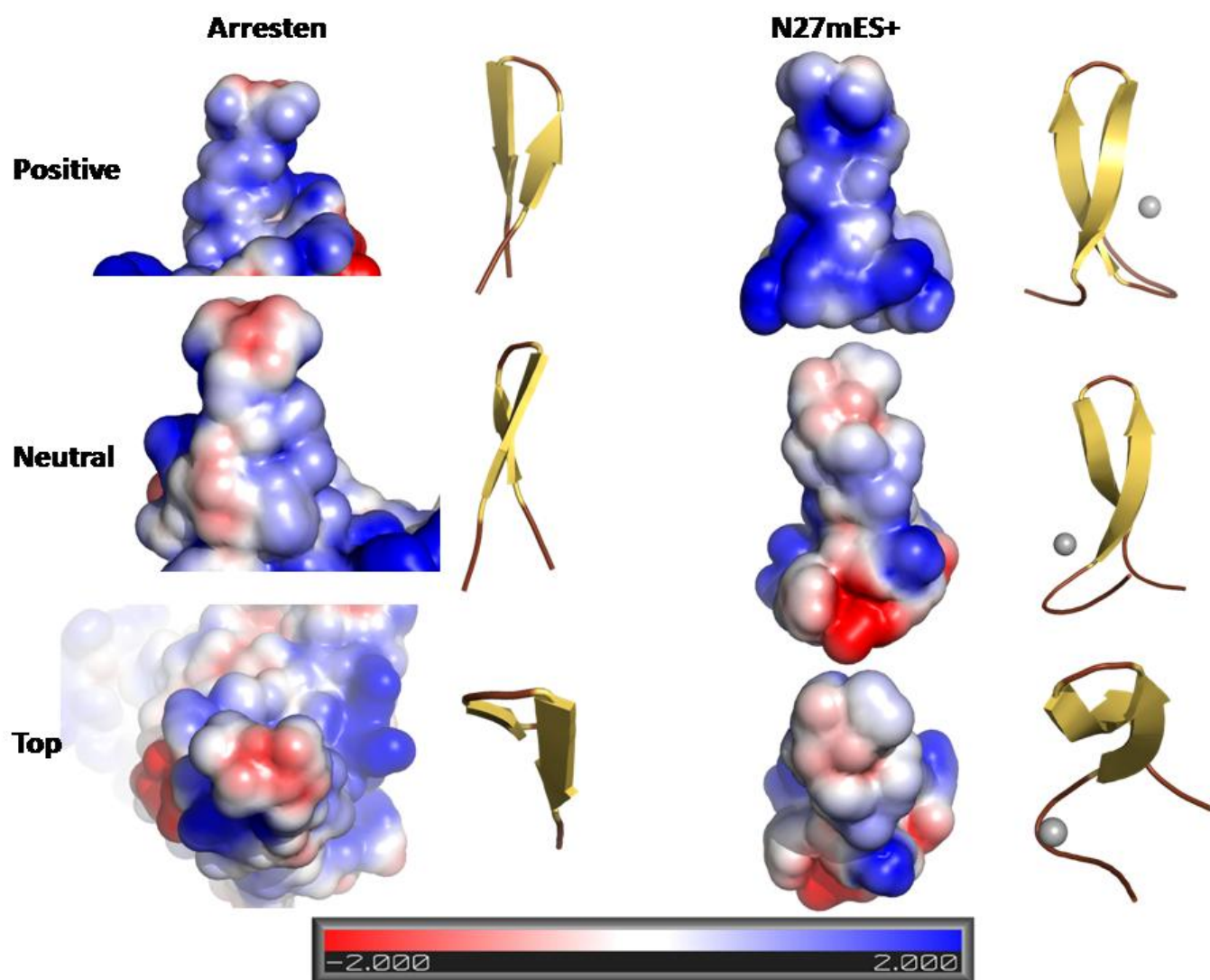
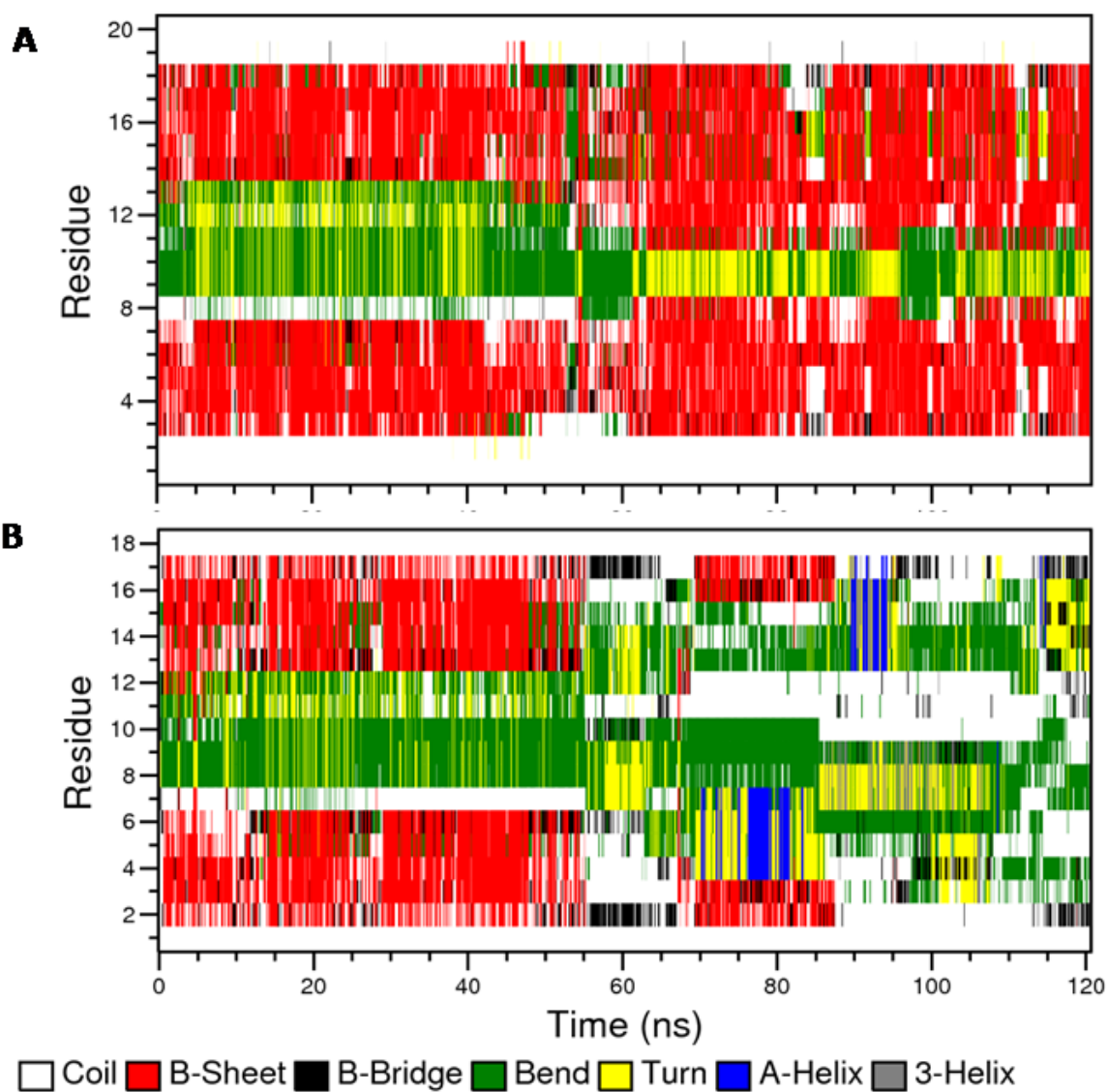


Figure 8

## Secondary structure





# 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](#)